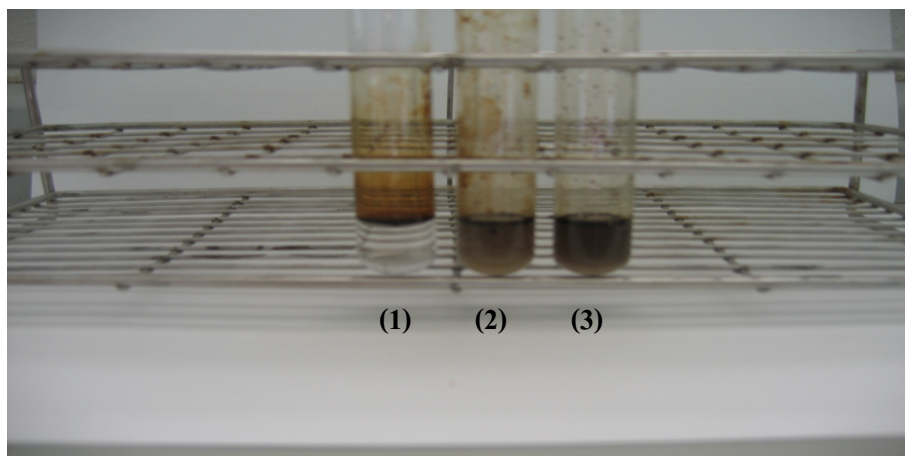


บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil ของตัวเซลล์และส่วนใส

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



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

Figure 5. Emulsification activity of weathered crude oil by control (buffer) (1) cell suspension (2) supernatant (3).

2. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7

2.1 สูตรอาหาร

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

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

Table 3. Optimal medium for biosurfactant production by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 after cultivated at 48 h.

Media	Emulsification activity (%)	
	<i>n</i> -hexadecane	Glucose
minimal salt medium	37.50±2.61 ^a	0
seawater medium	34.78±3.77 ^a	0

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2.2 แหล่งคาร์บอน

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

สำหรับวิธีการนำ *n*-alkanes ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์มี 3 แบบ ได้แก่ monoterminal oxidation pathway ($RCH_3 \rightarrow RCH_2OH \rightarrow RCHO \rightarrow RCOOH$), biterminal oxidative pathway ($H_3CRCH_3 \rightarrow H_3CRCH_2OH \rightarrow HOCH_2RCH_2OH \rightarrow HOOCRCHOH$) และ subterminal oxidation pathway ($RCH_2CH_3 \rightarrow RCH(OH)CH_3 \rightarrow RC(O)CH_3$) (Markovetz, 1979; May and Katoposis, 1990; Rehm and Reiff, 1981) โดยทั้ง 3 วิธี จะเริ่มต้นการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ hydroxylase (monooxygenase) เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิหรือทุติยภูมิ แต่สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. จะมีวิธีการนำ *n*-alkanes ไปใช้เป็น

แหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างออกไป โดยในช่วงต้นของการย่อยสลายจะใช้เอนไซม์ dioxygenase แทน monooxygenase ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ dioxygenase จะต้องใช้ให้ออกซิเจนในการออกซิเดชัน *n*-alkanes ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น *n*-alkyl hydroperoxide และออกซิไดซ์ต่อไปได้เป็น alkyl aldehyde (Maeng *et al.*, 1996) ดังนั้นความจำเพาะต่อ *n*-alkanes ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ dioxygenase ต่อ *n*-alkanes ซึ่งจากการทดลองในตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่า *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ความจำเพาะกับ *n*-alkanes ที่มีคาร์บอนมากกว่า 16 อะตอม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Maeng และคณะ (1996) ซึ่งมีการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์สำหรับออกซิเดชัน *n*-alkanes ของจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. ต่อ *n*-alkanes ชนิดต่างๆ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความจำเพาะต่อ *n*-hexadecane ซึ่งมี relative activity เท่ากับ 100%

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

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

Table 4. Effect of carbon sources on biosurfactant production by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 after cultivated at 48 h.

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

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2.3 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

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

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของ *n*-heptadecane ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

Table 5. Effect of *n*-heptadecane concentration on biosurfactant production by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 after cultivated at 48 h.

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

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2.4 แหล่งไนโตรเจน

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

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

Table 6. Effect of nitrogen sources on biosurfactant production by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 after cultivated at 48 h.

N-source (0.1%)	Final pH	Emulsification activity (%)	Total cell protein (mg/ml)
NH ₄ NO ₃	5.67±0.08	42.54±3.85 ^{b*}	0.34±0.07
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.55±0.12	38.55±3.38 ^b	0.41±0.03
NH ₄ HCO ₃	6.58±0.02	48.67±1.15 ^a	0.47±0.04

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2.5 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โดยใช้ความเข้มข้น 0.1%, 0.2% และ 0.3% ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1% ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 58.33% (ตารางที่ 7) ส่วนแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.5% ไม่มีการเจริญของเชื้อเนื่องจากความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่สูงเกินไปทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเป็น 9.05 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยปกติแบคทีเรียมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

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

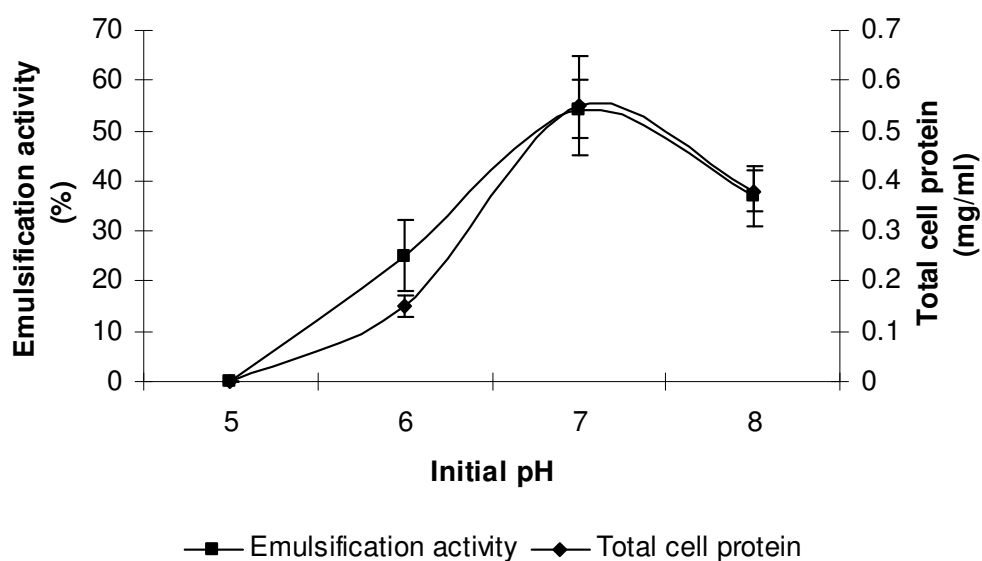
Table 7. Effect of NH_4HCO_3 concentration on biosurfactant production by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 after cultivated at 48 h.

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

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2.6 พิเอชเริ่มต้น

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1% โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 6 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เชื้อมีการเจริญสูงสุดและให้ค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 54.22% และที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 เชื้อไม่มีการเจริญและไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่ำไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรด (Suttivanitchakul *et al.*, 1999) และจะเห็นได้ว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ



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

Figure 6. Effect of initial pH on biosurfactant production by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* after cultivated at 48 h.

2.7 อุณหภูมิ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ในอาหาร minimal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.3% และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1% โดยพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง และ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่อุณหภูมิห้อง โดยค่า emulsification activity สูงที่สุดคือ 52.78% ดังแสดงในตารางที่ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ ถ้าแบคทีเรีนั้นแยกมาได้จากแหล่งที่มีอุณหภูมิสูง เช่น ทะเลทรายหรือน้ำพุร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะสูงไปด้วย เช่น Gurjar และคณะ (1995) แยกเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* VR-8 จากน้ำพุร้อน พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วง 45-70 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Yakimov และคณะ (1995) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* BAS 50 คืออุณหภูมิ

ในช่วง 35-45 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลเหนือ (North Sea) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ 20 องศาเซลเซียส (Schulz *et al.*, 1990)

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

Table 8. Effect of temperature on biosurfactant production by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 after cultivated at 48 h.

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

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2.8 การให้อากาศ

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

ตารางที่ 9 ผลของการให้อากาศต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ที่เวลา 48 ชั่วโมง

Table 9. Effect of agitation rate on biosurfactant production by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 after cultivated at 48 h.

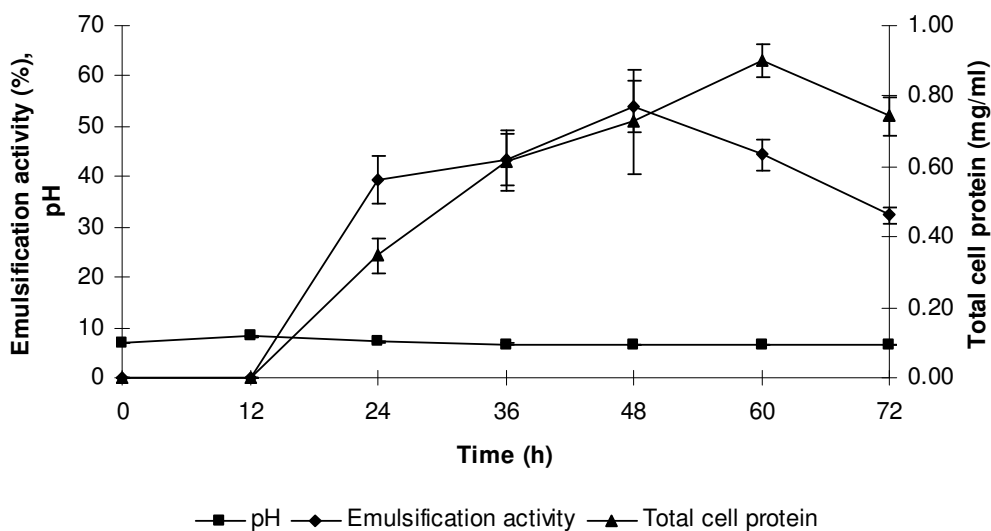
Agitation rate (rpm)	Final pH	Emulsification activity (%)	Total cell protein (mg/ml)
100	7.17±0.05	42.82±8.67 ^{a*}	0.34±0.09
200	6.66±0.05	50.72±1.25 ^a	0.89±0.16
300	6.65±0.06	43.05±8.67 ^a	0.81±0.05

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

2.9 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่าเชื้อเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้ค่า total cell protein สูง และมีค่า emulsification activity เท่ากับ 53.86% ซึ่งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อ ซึ่งให้เห็นว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 เป็นแบบที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ (growth – associate production) ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเชื้อมีการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน (Rosenberg *et al.*, 1979b) และการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. radioresistens* KA53 พบว่า สัดส่วนของกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ต่อน้ำหนักเซลล์ในระหว่างการผลิตเพิ่มขึ้นจาก 5.3 เป็น 7.3 และ 11.6 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง, 64 ชั่วโมง และ 87 ชั่วโมง ตามลำดับ (Navon-venezia *et al.*, 1995) นอกจากนี้ Kaplan และคณะ (1982) พบว่าการเจริญและการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* BD413 มีอัตราการเจริญเฉลี่ย 4.5 ชั่วโมง ในช่วง 20 ชั่วโมงแรก และเริ่มเข้าสู่

stationary phase ในชั่วโมงที่ 22 โดยเชื้อผลิตอิมัลชันไฟด์เออร์ชีวภาพหลังจากชั่วโมงที่ 10 จนกระทั่ง ชั่วโมงที่ 33 กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 55 U/ml



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

Figure 7. Time course of growth, culture pH and emulsification activity by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 grown in minimal salt medium (pH 7) with 0.3% *n*-heptadecane and 0.1% ammonium hydrogen carbonate at 30°C and agitation rate 200 rpm.

3. ศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเหวี่ยงเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสมาเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือและตัวทำละลาย เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. โดยส่วนใหญ่เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง (Sar and Rosenberg, 1983) โดยศึกษาวิธีการตกตะกอน 4 วิธี ได้แก่ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนด้วยอะซิโตน ตกตะกอนด้วยเมทานอล และตกตะกอนด้วยเอทานอล ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 พบว่าการตกตะกอนด้วยเอทานอล อะซิโตน และเมทานอลสามารถตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2.94 กรัมต่อลิตร, 1.04 กรัมต่อลิตร และ 0.76 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลให้ปริมาณตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุด เนื่องจากการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายจะต้องเติมตัวทำละลายที่มีค่า dielectric constant ต่ำกว่าน้ำเพื่อทำให้ค่า dielectric constant ของน้ำลดต่ำลง (Castillo and Lopez-Munguia, 2004) เมื่อเปรียบเทียบค่า dielectric constant ของเอทานอลและเมทานอล พบว่าเอทานอลมีค่า dielectric constant ที่ต่ำกว่าเมทานอลและยังเป็นตัวทำละลายที่เป็น polar protic solvent ซึ่งแตกต่างกับอะซิโตนที่เป็น polar aprotic solvent ดังนั้นเอทานอลจึงสามารถตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (critical emulsifier concentration) พบว่าการตกตะกอนด้วยเอทานอลให้ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันต่ำที่สุด คือ 0.04 กรัมต่อมิลลิตร รองลงมา คือ เมทานอล และอะซิโตน โดยมีค่าเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร และ 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตไม่สามารถตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมัก แต่โดยทั่วไปการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Acinetobacter* sp. จะใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 40% ถึง 65% (Navon-venezia *et al.*, 1995; Rosenberg *et al.*, 1979b; Rosenberg *et al.*, 1988)

เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอลและสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Tween 80 ซึ่งเป็นตัวแทนของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มประจุลบ และไม่มีประจุตามลำดับ พบว่า SDS มีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันน้อยที่สุด คือ 0.03 กรัมต่อมิลลิตร โดยมีค่า emulsification activity เท่ากับ 65.91% ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 และ Tween 80 มีค่า ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชันเท่ากับ 0.04 กรัมต่อมิลลิตร และมีค่า emulsification activity เท่ากับ 65.58% และ 71.54% ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

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

Table 10. Methods for recovery of biosurfactant produced by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7

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

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

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

Table 11. Critical emulsifier concentration of biosurfactant produced by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7 and chemically synthetic surfactants.

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

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

4.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

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

ตารางที่ 12 ผลของพีเอชต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟค์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7, SDS และ Tween 80

Figure 12. Effect of pH on emulsification activity of biosurfactant crude extract from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7, SDS and Tween 80.

pH	Emulsification activity (%)		
	Crude extract	SDS	Tween80
2	48.24±3.36 ^{D*b**}	50.30±0.44 ^{Fb}	58.72±0.86 ^{Da}
3	46.53±4.34 ^{Db}	55.11±0.70 ^{Ea}	60.33±0.56 ^{Da}
4	49.31±1.20 ^{Dc}	60.07±0.80 ^{Db}	64.84±0.61 ^{Ca}
5	53.08±1.09 ^{Cc}	64.55±1.35 ^{Cb}	68.46±0.57 ^{Ba}
6	63.26±0.75 ^{Bc}	67.47±1.57 ^{ABb}	70.92±1.27 ^{Aa}
7	66.22±0.39 ^{ABc}	69.24±0.92 ^{Ab}	72.39±0.84 ^{Aa}
8	65.97±1.21 ^{ABb}	67.98±0.93 ^{ABb}	72.80±0.92 ^{Aa}
9	67.37±1.38 ^{Ab}	67.93±0.43 ^{ABb}	71.53±0.36 ^{Aa}
10	66.89±2.12 ^{ABb}	67.47±1.57 ^{ABb}	71.34±1.89 ^{Aa}
11	67.31±1.32 ^{Ab}	66.16±0.44 ^{BCb}	71.04±2.01 ^{Aa}
12	67.15±1.06 ^{Ab}	66.42±0.88 ^{Bb}	70.82±2.17 ^{Aa}

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.2 ความคงตัวของอณูของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 ซึ่งมีความเข้มข้น 0.04 กรัมต่อมิลลิลิตร มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วทดสอบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane พบว่าอณูภูมิมีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งจะสังเกตเห็นได้จากค่า emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส ค่า emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงมีค่าสูงกว่า 60 % (ตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องกับผลของอณูภูมิต่อ SDS ในขณะที่ Tween 80 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30-100 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 และ SDS ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอณูภูมิมีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นั่นคือ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้สูญเสียกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 ในขณะที่การทดลองของ Toren และคณะ (2001) ศึกษาผลของอณูภูมิต่อความคงตัวของ alasan และ โปรตีนของ alasan ขนาด 45-kDa โดยบ่มที่อุณหภูมิ 27, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่า emulsification activity ของ alasan เพิ่มขึ้น 30% ส่วนโปรตีนของ alasan มีความคงตัวต่ออณูภูมิน้อยกว่า alasan โดยค่า emulsification activity ของโปรตีนขนาด 45-kDa ลดลง 40% หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟค์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7, SDS และ Tween 80

Table 13. Effect of temperature on emulsification activity of biosurfactant crude extract from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7.

Temperature (°C)	Emulsification activity (%)		
	Crude extract	SDS	Tween 80
30	65.50±2.27 ^{AB*b**}	67.71±1.62 ^{Ab}	72.19±0.94 ^{Aa}
40	65.96±2.13 ^{ABb}	67.18±1.16 ^{ABb}	72.72±0.62 ^{Aa}
50	65.52±1.06 ^{ABb}	67.19±1.71 ^{ABb}	72.19±0.50 ^{Aa}
60	66.42±2.47 ^{Abb}	67.02±1.81 ^{ABb}	72.25±1.85 ^{Aa}
70	68.28±0.41 ^{Ac}	66.93±0.88 ^{ABb}	72.93±0.35 ^{Aa}
80	66.44±1.55 ^{ABb}	66.93±0.88 ^{Ab}	72.53±1.64 ^{Aa}
90	63.25±3.03 ^{Bb}	65.70±0.84 ^{ABb}	71.55±1.89 ^{ABa}
100	63.97±1.13 ^{Bb}	66.42±0.88 ^{ABb}	71.55±1.89 ^{ABa}
110	63.63±2.43 ^{Bb}	65.67±1.13 ^{ABb}	69.63±0.12 ^{Ba}
121	60.15±0.66 ^{Bc}	65.16±0.74 ^{Bb}	69.29±1.09 ^{Ba}

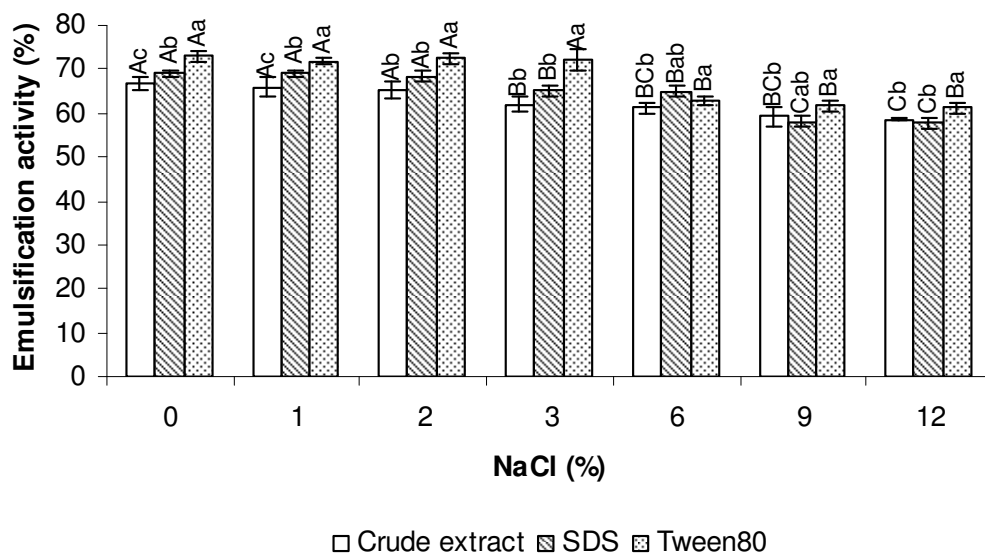
* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

** ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเล โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำทะเลอาจมีผลต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นจึงต้องศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 แสดงดังภาพที่ 8 พบว่าที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2% ไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ แต่กิจกรรมในการอิมัลซิไฟต์ *n*-hexadecane ลดลงเมื่อโซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้น 12% แต่อย่างไรก็ตามค่า emulsification activity ยังคงมีค่ามากกว่า 60% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมีผลให้ค่า emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดต่ำลง สำหรับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีก็ให้ผลสอดคล้องในทิศทางเดียวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้โดยพบว่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟต์ *n*-hexadecane ของ SDS และ Tween 80 มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น



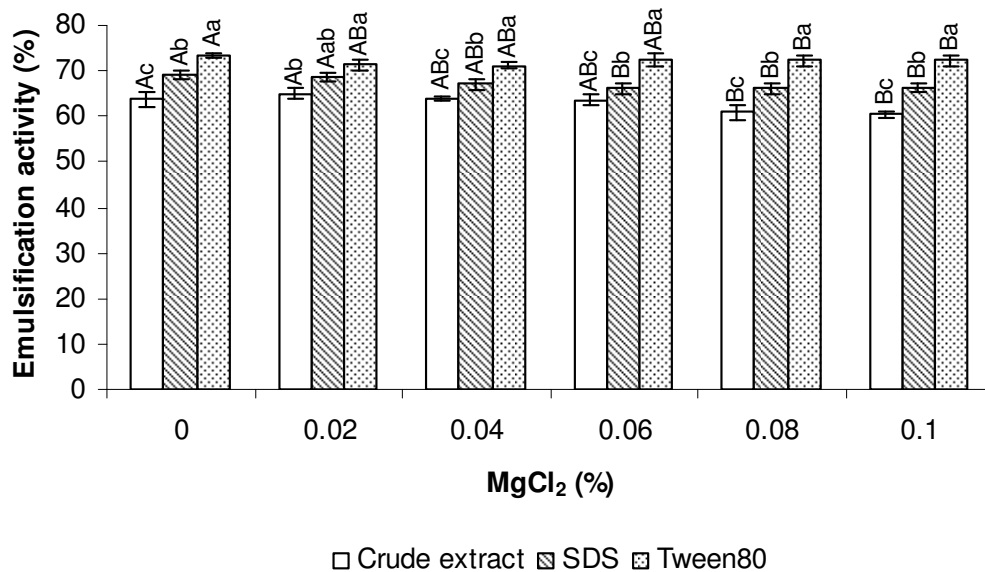
- * ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับต่างๆ
- ** ตัวอักษรพิมพ์ที่เล็กเหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด

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

Figure 8. Effect of NaCl concentration on emulsification activity of biosurfactant crude extract from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7 and chemically surfactants (SDS and Tween 80)

ผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7 แสดงดังภาพที่ 9 พบว่า แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0% ถึง 0.06% ไม่มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 จากผลการทดลองพบว่า Tween 80 มีค่า emulsification activity สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และ SDS ในทุกความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และจากภาพที่ 10 พบว่าแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0% ถึง 0.1% ไม่มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า divalent ion ไม่มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แต่โดยปกติ divalent ion จะยับยั้งการเกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Kim *et al.*, 1997) และจากผลการทดลองของ Rosenberg และคณะ (1979b) พบว่าแมกนีเซียม อีออน และ ฟอสเฟต อีออน ยับยั้งกิจกรรมของ biodispersant A2 โดยพบว่าไคโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ 8 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งกิจกรรมของ biodispersant A2 สูงถึง 50%

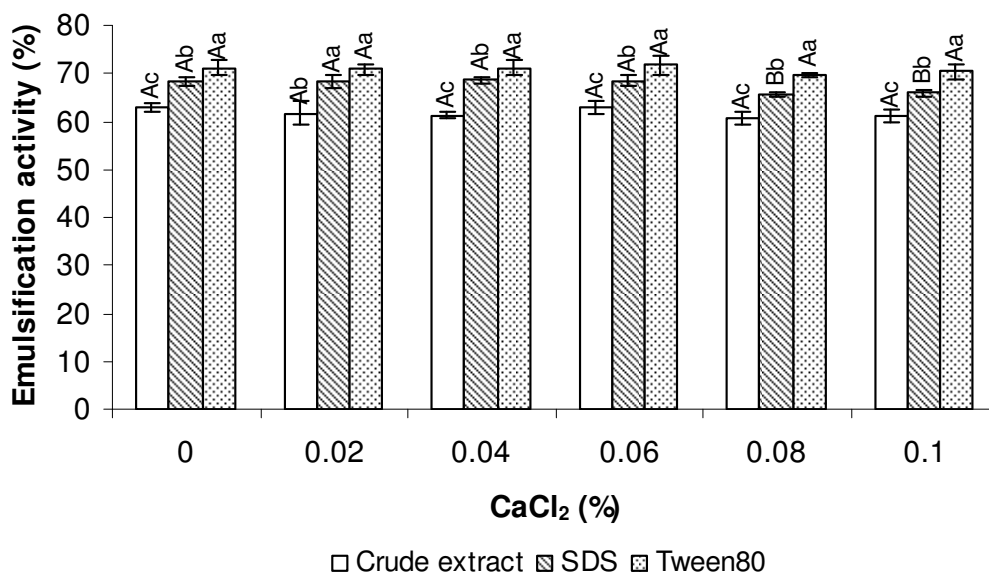
นอกจากการทดสอบผลของเกลือชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำทะเลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว ยังมีการใช้น้ำทะเลในการทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7 และสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Tween 80 ด้วย เพื่อดูผลโดยรวมของเกลือต่างๆ ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งสามชนิด ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังคงสามารถอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane โดยให้ค่า emulsification activity เท่ากับ 62.52% โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ในน้ำทะเลสูงกว่า SDS ซึ่งมีค่า emulsification activity เท่ากับ 55.61% สำหรับ Tween 80 พบว่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ในน้ำทะเลมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมอิมัลซิไฟด์ *n*-hexadecane ในสภาวะปกติแต่ยังคงมีค่า emulsification activity สูงที่สุด คือ 65.97% (ตารางที่ 14) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* SM7 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเลได้



- * ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ระดับต่างๆ
- ** ตัวอักษรพิมพ์ที่เล็กเหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด

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

Figure 9. Effect of MgCl₂ concentration on emulsification activity of biosurfactant crude extract from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 and chemically surfactants (SDS and Tween 80)



□ Crude extract ▨ SDS ▩ Tween80

- * ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับต่างๆ
- ** ตัวอักษรพิมพ์ที่เล็กเหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด

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

Figure 10. Effect of CaCl₂ concentration on emulsification activity of biosurfactant crude extract from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 and chemically surfactants (SDS and Tween 80)

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

Table 14. Effect of seawater on emulsification activity of biosurfactant crude extract from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 and chemically surfactants (SDS and Tween 80).

Surfactant	Emulsification activity (%)	
	Dissolved in seawater	Dissolved in distilled water
Crude extract	62.52±2.08 ^{a*}	65.58±2.74 ^b
SDS	55.61±1.05 ^b	65.91± 2.28 ^b
Tween 80	65.97±2.13 ^a	71.54±1.89 ^a

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

จากการศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้างโดยเฉพาะมีความคงตัวในสภาวะที่มีความเป็นเบสสูง นอกจากนี้ยังมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง และมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือชนิดต่างๆ สูง รวมถึงมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์เมื่อนำน้ำทะเลในการทดสอบ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ นำไปใช้ลดความหนืดของน้ำมัน เพื่อให้ง่ายต่อการขนถ่ายน้ำมันดิบไปตามท่อในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก เป็นอิมัลซิไฟด์เออร์ในอุตสาหกรรมอาหารและยา รวมถึงใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธี (Desai and Banat, 1997; Kim *et al.*, 1997)

5. ศึกษาความจำเพาะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ต่อไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

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

ตารางที่ 15 ความจำเพาะต่อไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7

Table 15 Hydrocarbon substrates specificity of biosurfactant produced by *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7.

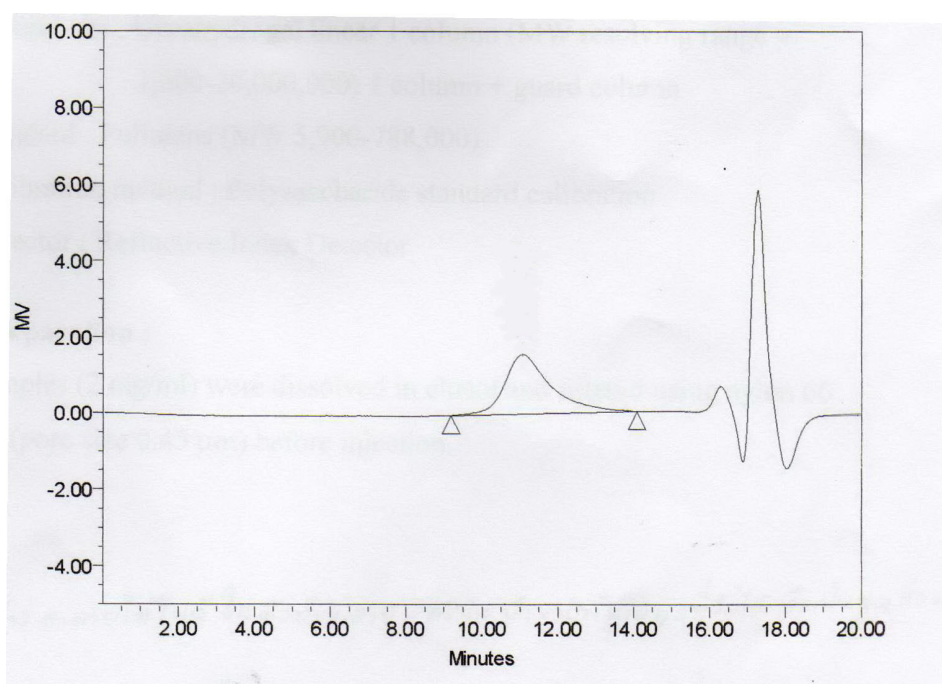
Hydrocarbon	Emulsification activity (%)
<i>n</i> -tridecan	61.50±1.32 ^{c*}
<i>n</i> -tetradecane	64.66±2.40 ^c
<i>n</i> -pentadecane	61.07±1.01 ^c
<i>n</i> -hexadecane	61.60±1.64 ^c
<i>n</i> -heptadecane	62.86±2.68 ^c
benzene	71.42±3.06 ^b
toluene	75.51±2.84 ^a
xylene	74.82±0.84 ^{ab}

* ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05).

6. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

6.1 Gel Permeation Chromatography

การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Gel Permeation Chromatography (GPC) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1.97×10^6 ซึ่งพบว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูงเช่นเดียวกับ alasan และ apoemulsan (Polysaccharide ของ emulsan) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 10^6 และ 9.9×10^5 ตามลำดับ (Zuckerberg *et al.*, 1979; Navon-venezia *et al.*, 1995) จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จาก GPC chromatogram แสดงผลเพียง 1 peak โดยไม่ปรากฏ peak ของสารอื่น แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความบริสุทธิ์สูงและมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 1.97×10^6

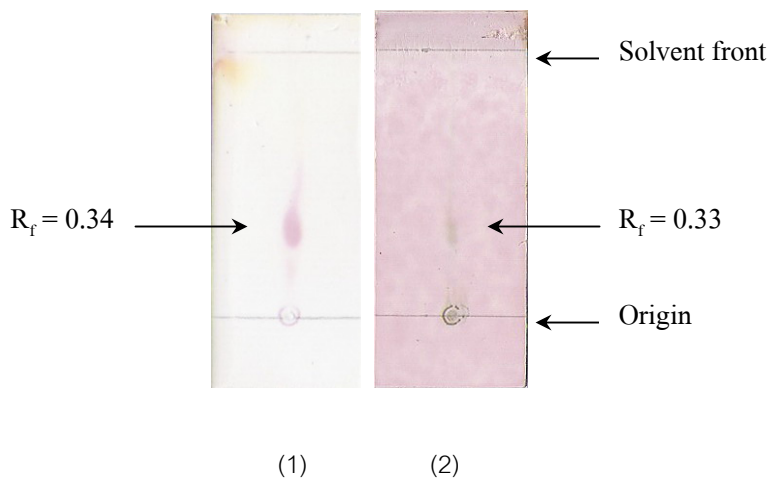


ภาพที่ 11 GPC chromatogram ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7

Figure 11. GPC chromatogram of partially purified biosurfactant from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7.

6.2 Thin Layer Chromatography

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



ภาพที่ 12 ลักษณะ TLC chromatogram ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน จาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 โดยใช้ ethyl acetate: pyridine: water: acetic acid (5:5:5:1) โดยปริมาตร เป็น mobile phase

(1) ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ

(2) ใช้ anisaldehyde ในการวิเคราะห์น้ำตาล

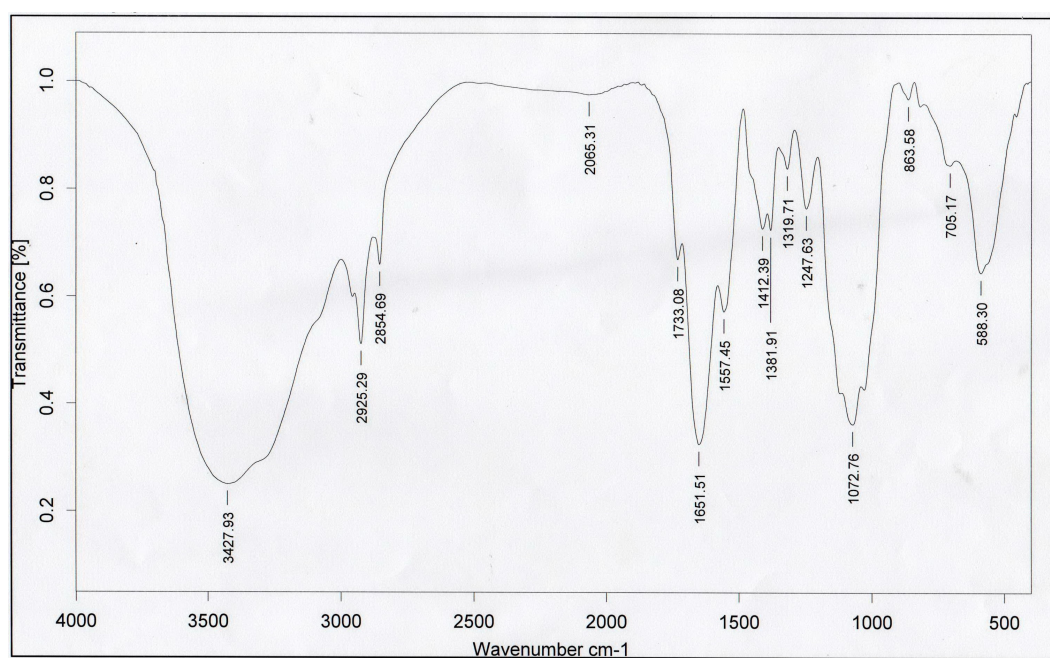
Figure 12. TLC chromatogram of partially purified biosurfactant from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 using ethyl acetate: pyridine: water: acetic acid (5:5:5:1) as mobile phase.

(1) Using ninhydrin as a spraying reagent for amino acid detection

(2) Using anisaldehyde as a spraying reagent for sugar detection

6.3 Fourier Transform Infrared Spectrometer

เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) ซึ่งใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสาร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 13 จาก FT-IR spectrum พบการยืดตัวของ O-H ที่ 3427 cm^{-1} , การยืดตัวของ C-H ที่อิ่มตัวที่ 2925 cm^{-1} และการยืดตัวของ C=O ที่ 1651 cm^{-1} ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลจาก FT-IR chromatogram บ่งบอกถึงการมีโพลีแซคคาไรด์และโปรตีนเป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 13 FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7

Figure 13. FT-IR spectrum of partially purified biosurfactant from *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7.

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีน 0.576 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 0.787 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 มีองค์ประกอบเป็นโปรตีน 42.26% และน้ำตาล 57.74%

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบพื้นฐานและน้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* subsp. *anitratu*s SM7 เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริก ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นโพลีแซคคาไรด์เชื่อมต่อกับโปรตีน ซึ่งใกล้เคียงกับ *alasan* ที่ผลิตจาก *Acinetobacter radioresistens* KA53 (Navon-Venezia *et al.*, 1995)