บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะจุลินทรีย์ทั้งในรูปของสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular) และที่ติดอยู่กับผนังเซลล์จุลินทรีย์ (cell-bounded) (Mulligan, 2005) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะในแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีซับสเตรทไม่ละลายน้ำ (water-immiscible substrate) และใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและ/หรือแหล่งพลังงาน (Healy *et al*., 1996)

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

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Acinetobacter* spp. หลายเรื่อง โดยพบว่าชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter* spp. ขึ้นกับสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการลดความหนืดของน้ำมันเพื่อให้ง่ายต่อการขนถ่ายน้ำมันดิบไปตามท่อในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม กำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดินและน้ำ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยเป็นอิมัลซิไฟเออร์ใน

ผลิตภัณฑ์ salad dressing (Desai and Banat, 1997) อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter* spp. ที่ศึกษาส่วนใหญ่แยกได้จากดิน ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการผลิต การทำบริสุทธิ์บางส่วนและศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่แยกได้จากทะเลสาบสงขลา

บทตรวจเอกสาร

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

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

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งส่วนที่ชอบน้ำจะมีทั้งที่เป็นประจุ และไร้ประจุ และประกอบไปด้วยหมู่ของ โมโน (mono-), ไค (di-), หรือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), หมู่คาร์บอกซิลิก, กรดอะมิโน และเปปไทด์ ในขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเป็นกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และกรดไขมันแอลกอฮอล์ (Lang, 2002) โดยคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ความสมดุลระหว่างส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว และจากสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิว หรือสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันจึงสามารถช่วยให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ง่ายขึ้น เนื่องจากจะไปช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้

2. ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจัดจำแนกตามโครงสร้างได้ 4 ประเภท ได้แก่

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

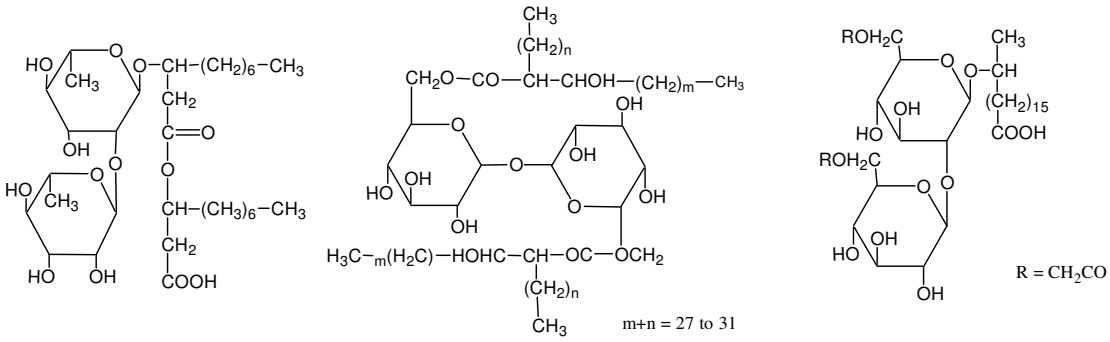
Rhamnolipid เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิดที่มีการศึกษากันมาก ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) 1-2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ β-hydroxy-decanoic acid 1-2 โมเลกุล (Desai and Banat, 1997) โดย *Pseudomonas aeruginosa* สามารถผลิต rhamnolipid หลาย

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

Trehalolipid ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันจะมีขนาดและโครงสร้างของ mycolic acid, จำนวนคาร์บอน และระดับความอิ่มตัวที่แตกต่างกัน โดยสารที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายได้แก่ trehalose dimycolate จาก *Rhodococcus erythropolis* ซึ่ง trehalolipid ที่ผลิตจาก *R. erythropolis* และ *Arthrobacter* sp. สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 25 ถึง 40 mN/m (Desai and Banat, 1997)

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

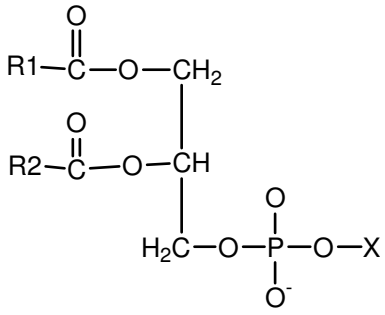
2.2 ฟอสโฟลิปิด, กรดไขมัน และนิวทรัลลิปิด (Phospholipids, fatty acid and neutral lipid) ฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยลิปิดและฟอสเฟตเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดฟอสโฟลิปิดเมื่อใช้ *n*-alkane (Cirigliano and Carman, 1985; Robert *et al.,* 1989) เช่น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



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

Figure1. Structures of glycolipid biosurfactants (A) rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* (B) trehalolipids produced from *Rhodococcus erythropolis* (C) sophorolipids produced from *Torulopsis bombicola*

ที่มา : Desai and Banat (1997)



R1, R2 = alkyl group

X = hydrogen, ethylamine, inositol

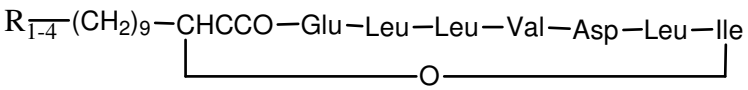
ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มฟอสโฟลิปิด

Figure 2. Structure of phospholipid biosurfactant

ที่มา : Desai and Banat (1997)

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

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



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

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

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

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

ภาพที่ 3 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์

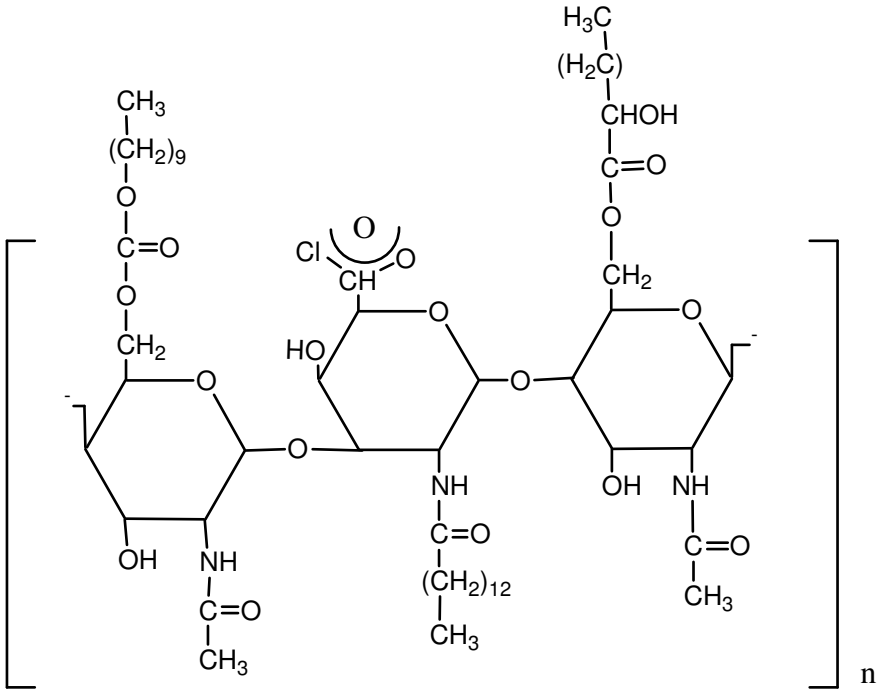
Figure 3. Structures of lipopeptide biosurfactants

ที่มา : Jenny และคณะ (1991)

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

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

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



ภาพที่ 4 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอริก

Figure 4. Structure of polymeric biosurfactant

ที่มา : Desai and Banat (1997)

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

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

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

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่างๆ

Table 1. Biosurfactant-producing microorganisms.

Biosurfactants	Microorganisms
Glycolipids	
Rhamnolipids	*Pseudomonas* sp.
	P. aeruginosa
Trehalolipids	*Rhodococcus erythropolis*
	Nocardia erythropolis
	Mycobacterium sp.
Sophorolipid	*Torulopsis apicola*
	T. bombicola
	T. petrophilium
Lipopeptide and lipoprotein	
Peptide-lipid	*Bacillus licheniformis*

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Biosurfactants	Microorganisms
Serrawettin	*Serratia macescens*
Viscosin	*P. fluorescens*
Surfactin	*B. subtilis*
Subtilisin	*B. subtilis*
Gramicidins	*B. brevis*
Polymyxins	*B. polymyxa*
Fatty acids, neutral lipids and phospholipids	
Fatty acids	*Candida lepus*
Neutral lipids	*Nocardia erythropolis*
Phospholipids	*Thiobacillus thiooxidans*
Bile acids	*Myroides* sp. SM1
Polymeric surfactants	
Emulsan	*Acinetobacter calcoaceticus*
Biodispersan	*A. calcoaceticus*
Mannan-lipid-protein	*Candida tropicalis*
Liposan	*C. lipolytica*
Carbohydrate-protein-lipid	*P. fluorescens*
Protein PA	*P. aeruginosa*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Desai and Banat (1997)

3. คุณสมบัติและการประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้โครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา

3.1 เพิ่มพื้นที่ผิวสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำต่ำ แบคทีเรียที่เจริญในบริเวณที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการเจริญแบบจำกัดเนื่องจากแรงตึงระหว่างผิวของน้ำและน้ำมัน (Shreve *et al.,* 1995) ซึ่งในระบบเปิด เช่น แหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนคราบน้ำมัน มีจำนวนของจุลินทรีย์ไม่เพียงพอต่อการอิมัลซิไฟด์น้ำมันให้มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้น้ำมันที่ถูกอิมัลซิไฟด์ที่

กระจายอยู่ในน้ำก็ไม่เพียงต่อการนำไปใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวซึ่งมีสมบัติเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันจึงมีความจำเป็นในการย่อยสลายคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของน้ำมัน โดยการทำให้เกิดอิมัลชัน ทำให้เซลล์สัมผัสกับน้ำมันแล้วนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น (Ron and Rosenberg, 2001)

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

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

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

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

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

4. การวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว, การเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน และความสมดุลของส่วนที่ชอบน้ำและส่วนไม่ชอบน้ำ ทำให้สามารถวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยอาศัยคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้นเป็นพื้นฐานในการคิดค้นวิธีการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลายวิธี

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

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

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

$$HLB = (20 \times \text{น้ำหนักโมเลกุลของส่วนที่ชอบน้ำ}) / \text{น้ำหนักโมเลกุลทั้งหมด}$$

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

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

โดย A คือ % ไซโคลเฮกเซน

HLB_A คือ ค่า HLB ของไซโครเฮกเซน (=15)

HLB_B คือ ค่า HLB ของน้ำมันพืช (=6)

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเล

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารลดแรงตึงผิวที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ซึ่งสามารถพบได้ในธรรมชาติทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะในแบคทีเรีย แต่งานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีไม่มากนักเมื่อเทียบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่น ตัวอย่างของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่

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

Yakimov และคณะ (1998) พบว่า *Alkanivorax borkumensis* gen. nov. และ *Alkanivorax borkumensis* sp. nov. ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่แยกได้จากทะเลที่มีความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรคาร์บอนและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Alkanivorax borkumensis* gen. nov. สามารถใช้ aliphatic hydrocarbon เป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีองค์ประกอบเป็นกลูโคสเชื่อมต่อกับไขมันซึ่งมีโครงสร้างเป็น 3-hydroxydecanoic acid 4 โมเลกุลโดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเตอร์ และเชื่อมกับกลูโคสที่ตำแหน่ง C1 ด้วยพันธะไกลโคซิดิก ในขณะที่ *Alkanivorax borkumensis* sp. nov. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และใน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 3-10 % ซึ่งมีการเจริญลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เป็น complex media และอาหารที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน แต่สามารถใช้ aliphatic hydrocarbon รวมทั้ง ฟอร์เมต (Formate), อะซิเตต (Acetate), โปรพิโนเอต (Propionate), เมธิลไพรูเวต (Methyl pyruvate) และ แอลฟา-คีโตกลูตาเรท (α-ketoglutarate) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ แต่สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้นมามีโครงสร้างเช่นเดียวกับสารที่ *Alkanivorax borkumensis* gen. nov. ผลิตได้

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

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

ถิ่นและสิ่งแวดล้อมในทะเล ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีเป็นพิษต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้กำจัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเล (Poremba *et al.,* 1991)

6. แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter*

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

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

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

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

7. ผลขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Acinetobacter*

แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ มีความสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมเดิมที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่

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

นอกจากไฮโดรคาร์บอนและแอลกอฮอล์แล้วพบว่าสามารถใช้น้ำมันพืชหรือกรดไขมันในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งการใช้น้ำมันพืชหรือกรดไขมันมีข้อดีคือ มีความเป็นพิษต่ำ ปริมาณการผลิตสูง และราคาถูก (Shabtai, 1990)

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

7.3 แหล่งฟอสเฟต ฟอสเฟตมีผลต่อการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งฟอสเฟตขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สำหรับการผลิต emulsan จาก *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเชื้อผลิต emulsan ได้สูงที่สุดเมื่อมีฟอสเฟต 12.1 กรัมต่อลิตร (KH_2PO_4 3.65 กรัมต่อลิตร และ K_2HPO_4 8.45 กรัมต่อลิตร) (Choi *et al.,* 1996) สำหรับการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *A. calcoaceticus* BD413 มีการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตจาก $K_2HPO_4.3H_2O$ 9.17 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 3 กรัมต่อลิตร เป็น $K_2HPO_4.3H_2O$ 22.2 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 7.26 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเพิ่มขึ้นจาก 89 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 463 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kaplan *et al.,* 1982) นอกจากการใช้ K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟตแล้ว ยังมีการใช้ Na_2HPO_4 ร่วมกับ

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

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Acinetobacter* spp.

Table 2. Carbon source, nitrogen source and type of biosurfactant produced by *Acinetobacter* spp.

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

8. การเก็บเกี่ยวและทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริก

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

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

8.2 การตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริกที่ผลิตจาก *Acinetobacter* spp. โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น 40-65% ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บ

ตะกอนที่ได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไป Dialysis ในน้ำกลั่น จากนั้นทำแห้งด้วยวิธี lyophilized หรือ freeze dry (Rosenberg *et al.,* 1979b; Kaplan *et al.,* 1982; Rosenberg *et al.,* 1988; Navon-Venezia *et al.,* 1995)

นอกจากขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังมีการนำเทคนิคอื่นๆ มาใช้ในการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอริกจาก *Acinetobacter* spp. ได้แก่

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

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

9. สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอริก

9.1 การคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่าง alasan ที่ผลิตจาก *A. radioresistens* KA53 มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูงที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 5 และ alasan มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์คงตัวในสภาวะที่เป็นด่างซึ่งชี้ให้เห็นว่าพันธะเอสเทอร์ไม่ได้มีผลต่อกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของ alasan (Navon-Venezia *et al.,* 1995) แตกต่างจาก emulsan ที่ผลิตจาก *A. calcoaceticus* RAG-1 ซึ่งกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ emulsan คือ พีเอชเท่ากับ 5 (Rosenberg *et al*., 1979b) สำหรับความคงตัวต่อกรด-ด่างของ biodispersan จาก *A. calcoaceticus* A2 มีความคงตัวที่พีเอช 9-12 และกิจกรรมลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 9 (Rosenberg *et al*., 1988)

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

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

สำหรับกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของ biodispersan พบว่า โซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อกิจกรรม แต่เกลือแมกนีเซียมมีผลในการยับยั้งกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ของ biodispersan ดังนั้นก่อนที่จะนำ biodisersan มาวัดกิจกรรมจำเป็นจะต้องผ่านกระบวนการ dialysis ก่อน

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

วัตถุประสงค์

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

ขอบเขตงานวิจัย

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