



องค์ประกอบและคุณสมบัติของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน

Acinetobacter sp. FT3 และ *Gemella* sp. CH11

Composition and Properties of Bioproducts from Thermotolerant Bacteria

Acinetobacter sp. FT3 and *Gemella* sp. CH11

ระพีพรรณ เต็มตันท์

Rapeepan Termtan

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2547

เลขหมู่	TP 248.B 57	963	2547 ค.1
Bib Key	842721		
	1.4 ค.ค. 2547		

ชื่อวิทยานิพนธ์ องค์ประกอบและคุณสมบัติของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน *Acinetobacter*
sp. FT3 และ *Gemella* sp. CH11

ผู้เขียน นางสาวระพีพรรณ เต็มตันท์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2546

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสมบัติด้านสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียทนร้อน สายพันธุ์ FT3 และ CH11 สามารถเทียบเคียงชนิดของเชื้ออยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp. และ *Gemella* sp. ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ใน PR medium (พีเอช 7.0) ซึ่งมีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่า *Acinetobacter* sp. และ *Gemella* sp. ให้ผลผลิตสูงสุด ของสารชีวภาพเท่ากับ 5.83 และ 4.87 กรัมต่อลิตรในเวลา 72 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำ มาผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บางส่วน ได้ผลผลิตของสารชีวภาพเท่ากับ 4.72 กรัมต่อลิตร (82.09%) และ 2.76 กรัมต่อลิตร (57.38%) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและทดสอบ คุณสมบัติบางประการทางด้านพอลิเมอร์ พบว่าสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์มี ลักษณะองค์ประกอบและคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกัน โดยสารชีวภาพที่ได้มีสีขาว ไม่มีหมู่อัลฟา อะมิโนและกรดอะมิโนอะโรมาติก แต่มีเอสเทอร์ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก (13.89 และ 13.26 %w/w ตามลำดับ) มีธาตุกำมะถันในปริมาณแร่ธาตุทั้งหมด (CHONS) ในโมเลกุล 5.63 และ 5.17 % ตามลำดับ พบน้ำตาลและโปรตีนในปริมาณเล็กน้อย

เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารชีวภาพ พบว่าสามารถละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 8 ชนิดที่ใช้ทดสอบ, ไม่มีคุณสมบัติในการเกิดเจล, การเป็นสาร ตกตะกอน, การเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ และเป็นพิษต่อเม็ดเลือดเมื่อใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 100 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์หาหมู่ ฟังก์ชันโดยเทคนิค FT-IR พบว่าสารชีวภาพและตะกอนที่ได้จากอาหาร PR มีหมู่ฟังก์ชันที่เหมือน กันโดยแสดงพันธะของเอมีน, เอสเทอร์ และสารประกอบซัลเฟต สารชีวภาพมีค่าน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 399 และ 193 ดาลตันตามลำดับ โดยมีค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.14 และ

1.48 ตามลำดับ เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของสารชีวภาพที่ได้มีค่าต่ำกว่า 1,000 ดาลตัน ดังนั้น สารชีวภาพที่ได้จึงไม่จัดเป็นพอลิเมอร์

จากการศึกษาคุณสมบัติการลดแรงตึงผิวของน้ำหมักจากแบคทีเรียที่เรี่ยหนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าเฉพาะ *Acinetobacter* sp. FT3 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 15.4 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 60 สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำหมักจาก 68 mN/m เหลือ 58.6 mN/m หลังจากผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บางส่วน สารชีวภาพมีค่า oil displacement area (ODA) เพิ่มขึ้นจาก 0.50 ตารางเซนติเมตรเป็น 132.66 ตารางเซนติเมตร ผลจากการวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่า องค์ประกอบหลักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ คาร์โบไฮเดรตและไขมัน จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารชีวภาพโดยเทคนิค FT-IR พบว่ามีหมู่ไฮดรอกซิล, อัลคีน และแอลดีไฮด์อยู่ใน องค์ประกอบ จึงคาดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจเป็นกลุ่ม glycolipid หรือกลุ่ม lipopolysaccharide นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้ยังแสดงคุณสมบัติเป็นสารยับยั้ง จุลินทรีย์โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* เกิด clear zone ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตรเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

Thesis Title	Composition and Properties of Bioproducts from Thermotolerant Bacteria <i>Acinetobacter</i> sp. FT3 and <i>Gemella</i> sp. CH11
Author	Miss Rapeepan Termtan
Major Programe	Biotechnology
Academic Year	2003

Abstract

Based on morphological characteristics and biochemical tests of two thermotolerant bacterial strains FT3 and CH11, they were identified to be *Acinetobacter* sp. and *Gemella* sp., respectively. Cultivation of these strains in PR medium (pH 7.0) using 1 % glucose as a carbon source at 45 °C for 96 h on a shaker (200 rpm) revealed that *Acinetobacter* sp. FT3 and *Gemella* sp. CH11 gave the maximum crude bioproduct yields of 5.83 and 4.87 g/l after 72 and 24 h cultivation, respectively. After partial purification, the yields of bioproducts were 4.72 g/l (82.09%) and 2.76 (57.38%), respectively. Composition and some properties related to the polymer of bioproducts were analysed. Results indicated that purified bioproduct from the two strains had similar composition and properties they were white, did not contain either alpha-amino acid or aromatic amino acid but contain ester sulfate as a major component (13.89 and 13.26 %w/w, respectively) with sulfur content of total elements (CHONS) in the molecule (5.63 and 5.17 %), respectively. A small amount of sugar and protein was also detected.

Studies on some properties of bioproducts from the two strains revealed that they were soluble in water but insoluble in eight kinds of organic solvents tested. They could not form gel and possessed neither the flocculating activity nor antimicrobial activity. In addition, they did not lyse red blood cell but gave 100 % cell lysis when they were used at the concentration of 3 mg/ml. FT-IR spectra of the two purified bioproducts were similar to that of PR medium with the presence of amine and ester linkages as well as sulfur compounds. Molecular weight of the bioproducts were found to be 399 and 193 dalton with polydispersity of 1.14 and 1.48, respectively. Due to their molecular

weight were lower than 1,000 dalton the bioproducts were not considered to be polymer.

Testing on surface active agent property of the culture broth from the two thermotolerant bacterial strains indicated that only *Acinetobacter* sp. FT3 produced surface active agent, with the maximum crude biosurfactant yield of 15.4 mg/l after 60 h cultivation. It could reduce the surface tension of the supernatant from 68 mN/m to 58.6 mN/m. After partial purification, oil displacement area (ODA) of the biosurfactant increased from 0.50 cm² to 132.66 cm². TLC analysis illustrated that major components of the biosurfactant were carbohydrate and lipid. The FT-IR spectrum of the crude biosurfactant revealed the presence of hydroxyl, alkene and aldehydes groups in the components. As a result, the biosurfactant may be glycolipid or lipopolysaccharide. In addition, the biosurfactant was found to possess antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, giving the clear zone of 13 mm in diameter when used at the concentration of 1 mg/ml. However, it could not inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.