

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

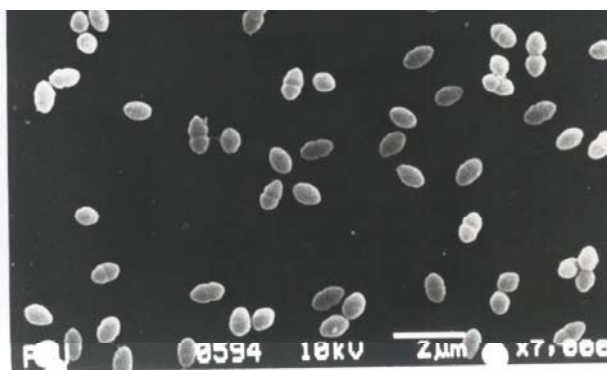
1. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียที่เรียก ร้อน 2 สายพันธุ์

นำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ CH11 และ FT3 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 7,000 เท่า (ภาพที่ 9) พบว่าสายพันธุ์ CH11 มีรูปร่างแบบรูปไข่ค่อนข้างกลม แบ่งตัวแบบทวิคูณ ขนาด (กว้างxยาว) ประมาณ 0.6x0.8 ไมโครเมตร ส่วนสายพันธุ์ FT3 มีรูปร่างเป็นแท่ง แบ่งตัวแบบทวิคูณ ขนาด (กว้างxยาว) ประมาณ 0.4x2.4 ไมโครเมตร ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเชื้อในสกุล *Acinetobacter* ซึ่งเซลล์มีรูปแท่ง มีความกว้างตั้งแต่ 0.9-1.6 ไมโครเมตร ความยาวตั้งแต่ 1.5-2.5 ไมโครเมตร (Kreig and Holt, 1984)

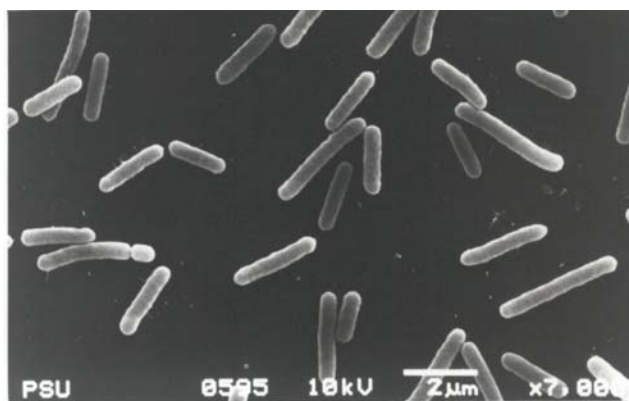
เมื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมี (ตารางที่ 5) พบว่าสายพันธุ์ CH11 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีความต้องการออกซิเจนแบบ facultative anaerobic ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase, oxidase และ urease ไม่สามารถย่อยสลายแป้งและไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ แต่สามารถใช้น้ำตาล mannitol และ sorbitol ได้ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเชื้อในสกุล *Gemella* (Facklam and Elliott, 1995) สำหรับสายพันธุ์ FT3 มีความต้องการออกซิเจนแบบ strictly aerobe ไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase และ urease แต่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ เหมือนกับแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน เช่น ไม่สามารถย่อยเจลาตินและอาร์จินิน, ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ ไม่ผลิตก๊าซ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) (Koma et al., 2001) จากคุณสมบัติทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kreig and Holt, 1984) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CH11 จัดอยู่ในสกุล *Gemella* sp. และแบคทีเรียสายพันธุ์ FT3 จัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter* sp.

แบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* ได้รับความสนใจและนำมาใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากมีศักยภาพการผลิตสารชีวภาพได้หลายชนิด จึงมีความหลากหลายในการนำไปประยุกต์ใช้ เช่น สาร emulsan, พอลิเมอร์ชีวภาพชนิดพอลิแซ็กคาไรด์, ชนิดลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ และเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถผลิต

(A)



(B)



ภาพที่ 9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (กำลังขยาย 7,000 เท่า) ของแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ CH11 (A) และ สายพันธุ์ FT3 (B)

Figure 9 SEM images (magnification x 7,000) of thermotolerant bacteria strain CH11 (A) and strain FT3 (B).

ตารางที่ 5 การ**เทียบเคียง**ชนิดของแบคทีเรียที่เรียกหน้าสายพันธุ์ CH11 และ FT3 โดยใช้วิธีทางชีวเคมี

Table 5 Taxonomical and biochemical characteristics of strains CH11 and FT3.

Test	Strain CH11	Strain FT3
Gram stain	positive	negative
O ₂ requirement	facultative	strictly aerobe
Cell morphology	cocci	rod
Cell size (μm)	0.6x0.8	0.4x2.4
Motility	+	-
Oxidase	-	-
Catalase	-	+
Indole production	-	-
Methyl red	+	-
Voges-Proskauer	-	+
Citrate (Simmons)	-	+
H ₂ S production	-	-
Urease production	-	-
Nitrate production	-	-
Gelatin hydrolysis	+	-
Starch hydrolysis	-	-
Arginine dihydrolysis	+	-
Lysine decarboxylase	-	-
Oxidation or Fermentation :		
Glucose	+	+
Mannitol	+	+
Inositol	-	-
Sorbitol	+	-
Rhamnose	-	-
Sucrose	-	+
Arabinose	+	+
Galactose	+	+
Xylose	+	+
Identified as :	<i>Gemella</i> sp. CH11	<i>Acinetobacter</i> sp. FT3

N.B. : + = positive result, - = negative result

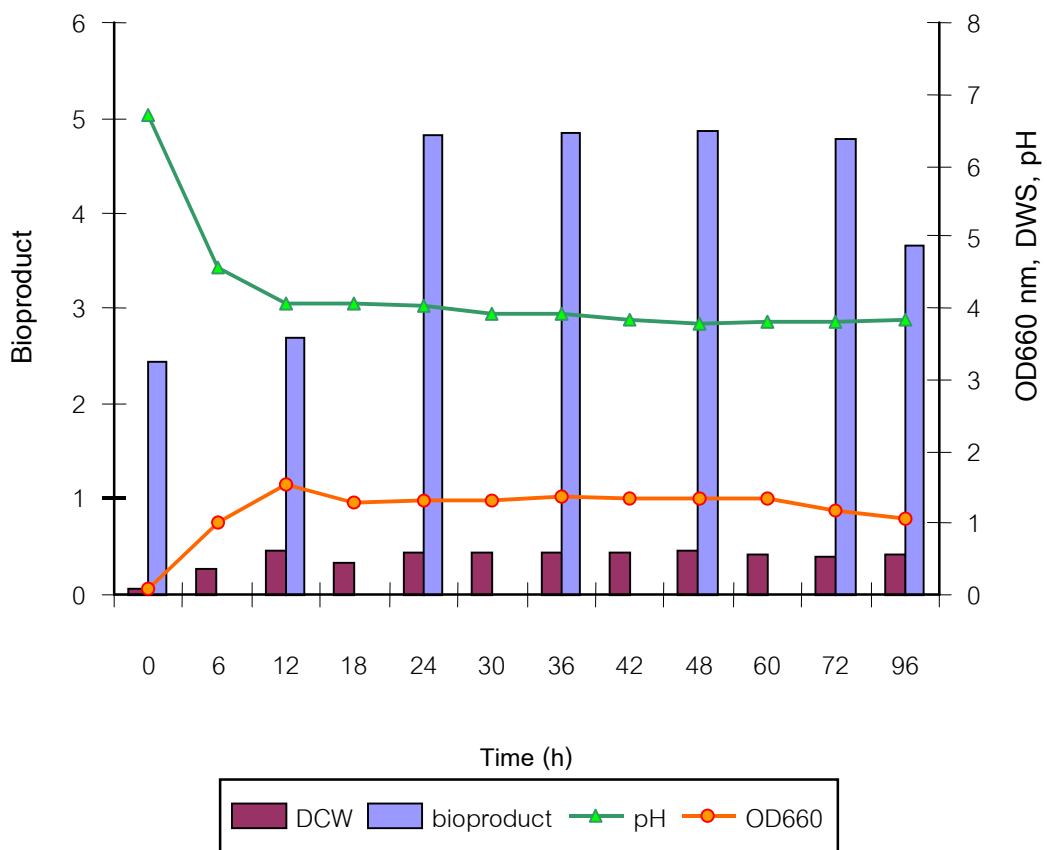
พอลิเมออร์ “ethapolan” (Abd-El-Haleem, 2003) และสามารถผลิตเอนไซม์ alkaline lipase (Chen *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2003), เอนไซม์ quinoprotein (E.C.1.1.99.17) (Arjen *et al.*, 1996) มีรายงานการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีการเก็บตัวอย่างจากดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน พบว่าแบคทีเรียที่พบโดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Acinetobacter* (Huy *et al.*, 1999; Navon-venezia *et al.*, 1995) แต่ไม่พบรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากแบคทีเรียในสกุล *Gemella* โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่มนี้มักพบในตัวอย่างจากคนไข้ (Facklam and Elliott, 1995)

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบและทดสอบคุณสมบัติด้านพอลิเมออร์ของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน 2 สายพันธุ์

2.1 การผลิตสารชีวภาพ

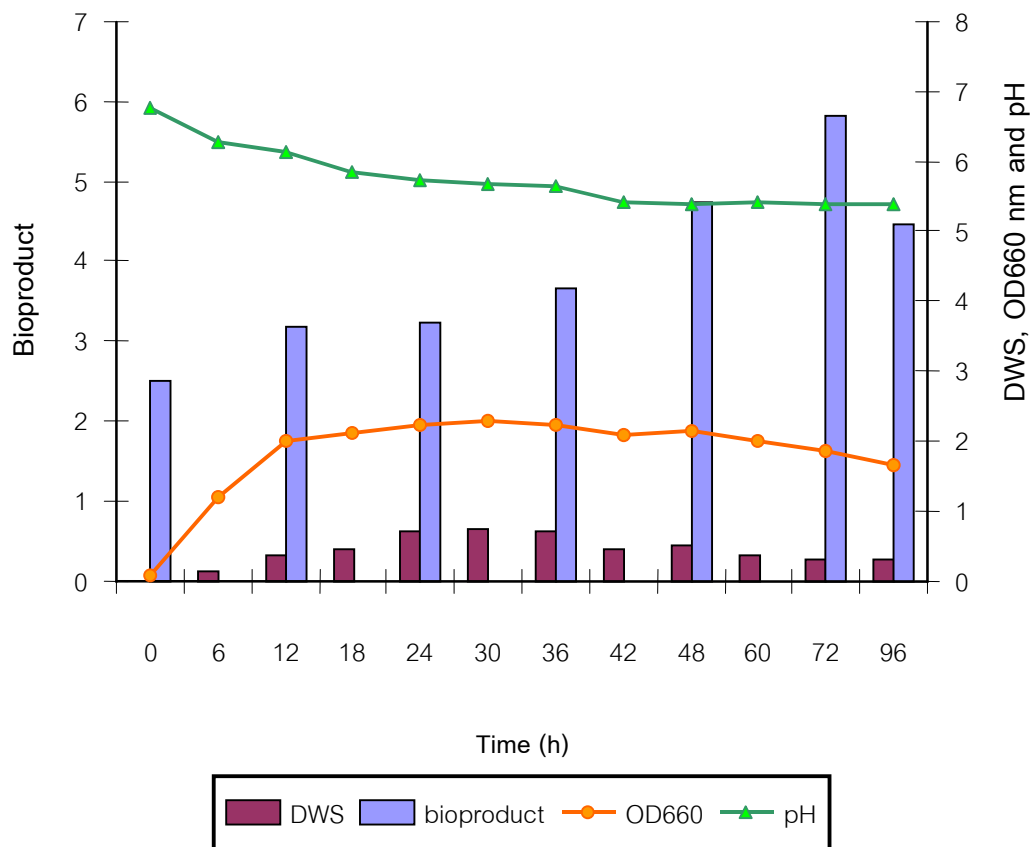
นำแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ที่แยกได้ คือ *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว PR ที่มีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงมาวัดการเจริญ ค่าพีเอช และปริมาณสารชีวภาพที่สกัดโดยใช้การตกตะกอน (ภาพที่ 10 และ 11) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CH11 มีค่าการเจริญสูงสุด 0.46 กรัมต่อลิตรหลังจากการเลี้ยงเขื่อนาน 12 ชั่วโมง และให้ผลผลิตสารชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 4.87 กรัมต่อลิตรหลังจากการเลี้ยงเขื่อนาน 24 ชั่วโมง สำหรับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ FT3 พบว่าให้ค่าการเจริญสูงสุด 0.65 กรัมต่อลิตรหลังจากการเลี้ยงเขื่อนาน 30 ชั่วโมง และให้ผลผลิตสารชีวภาพจากการตกตะกอนสูงสุดเท่ากับ 5.83 กรัมต่อลิตรหลังจากการเลี้ยงเขื่อนาน 72 ชั่วโมง สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 เป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยพีเอชลดลงจากค่าเริ่มต้นเท่ากับ 6.71 และ 6.77 เป็น 3.82 และ 5.40 ตามลำดับหลังการเลี้ยงเชื้อ 96 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาลักษณะของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ พบว่าลักษณะของน้ำหมักไม่มีความหนืดตลอดระยะเวลาการเลี้ยง ซึ่งลักษณะของน้ำหมักและสารชีวภาพที่ได้มีความแตกต่างจากรายงานการทดลองที่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตพอลิเมออร์ชีวภาพ จุลินทรีย์จะหลั่งสารพอลิเมออร์ออกมาละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้มีความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อมีการผลิตพอลิเมออร์ชีวภาพมากขึ้น จากรายงานของ Shih และคณะ (2001) พบว่าน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* ความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้นพร้อม ๆ กับปริมาณของพอลิเมออร์ชนิด PGA ที่เพิ่มขึ้น โดยให้ค่าความหนืดสูงสุด 17 cP. ที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เชื้อผลิตพอลิเมออร์



ภาพที่ 10 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการผลิตสารชีวภาพของแบคทีเรียทนร้อน *Gemella* sp. CH11 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PR ที่มี 1 % กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 10 Time course of bioproduct produced by *Gemella* sp. CH11 cultivated in PR medium (1% glucose as carbon source) on a rotary shaker (200 rpm) at 45°C for 96 h



ภาพที่ 11 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และการผลิตสารชีวภาพของแบคทีเรียที่เรียทนร้อน *Acinetobacter* sp. FT3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PR ที่มี 1% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 11 Time course of bioproduct produced by *Acinetobacter* sp. FT3 cultivated in PR medium (1% glucose as carbon source) on a rotary shaker (200 rpm) at 45°C for 96 h.

ชนิด PGA ได้สูงสุด (14 กรัมต่อลิตร) อาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ใช้ในการผลิต พอลิเมอร์นั้นไม่ใช่อาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต หรือเชื้อมีความต้องการสารอาหาร ชนิดอื่นเพิ่มเติม (Dermlim *et al.*, 1999) ตัวอย่างเช่นจากการศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการ ผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ *Pseudomonas elodea* โดยใช้อาหารที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อไม่มีการเติมสารอาหาร (เช่น ยีสต์สกัด) ทำให้เชื้อมีการเจริญและผลิตพอลิเมอร์ออกมานอก เซลล์น้อยให้ผลผลิตเท่ากับ 1.73 กรัมต่อลิตร น้ำหมักที่ได้มีความหนืดเพียง 3.0 cP แต่เมื่อมีการ เติมสารอาหารเพิ่มเติมเช่น 0.1%(w/v) yeast extract, 0.05%(w/v) malt extract ทำให้ผลผลิต พอลิเมอร์เพิ่มขึ้นเป็น 3.1 กรัมต่อลิตร และความหนืดของน้ำหมักจึงเพิ่มขึ้นเป็น 395 cP จากการ ทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อมีความต้องการสารอาหารบางอย่าง เช่น วิตามิน หรือแร่ธาตุบางอย่างที่มีอยู่ใน yeast extract และ malt extract (Dlamini and Peiris, 1997) และอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้ออาจไม่ใช่อาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ นอกจากนี้ อาจเนื่องจากปริมาณของพอลิเมอร์ที่ละลายอยู่ในน้ำหมักมีน้อยเกินไป จึงทำให้ ลักษณะของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียที่ร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่มีความหนืด

ดังนั้นจึงทำการสกัดแยกและทำบริสุทธิ์บางส่วน เพื่อนำสารชีวภาพที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติ ทางด้านพอลิเมอร์ต่อไป

2.2 การสกัดสารชีวภาพด้วยเอทานอลและการทำบริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 ในอาหารสูตร PR ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าได้ ปริมาณสารชีวภาพที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์เท่ากับ 4.81 และ 5.75 กรัมต่อลิตรตามลำดับ หลังจากนำไปผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่าปริมาณสารชีวภาพที่ได้เท่ากับ 2.76 และ 4.72 กรัม ต่อลิตรตามลำดับ คิดเป็นผลผลิตสารชีวภาพในรูปบริสุทธิ์บางส่วนเท่ากับ 57.38 และ 82.09 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ลักษณะสารชีวภาพที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาว คล้ายผงแป้ง (ภาพที่ 12) ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างจากลักษณะของพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ เช่น พอลิแซคคาไรด์ซึ่งมีลักษณะ คล้ายฟองน้ำ (Dermlim *et al.*, 1999) พอลิเมอร์ชนิดไขมันมีลักษณะเหนียวและโปร่งแสงเหมือน มีไขมันรวมอยู่ในองค์ประกอบ (Kurane *et al.*, 1994) พอลิเมอร์ชนิดไกลโคโปรตีนที่มีสีเขียวเข้ม และไม่ละลายน้ำ (Lee *et al.*, 1995) ในขณะที่สารชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นไม่มีลักษณะที่คล้ายคลึง “พอลิเมอร์ชีวภาพ” ที่เคยมีรายงาน ดังนั้นการศึกษาขั้น ต่อไปจึงเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบและศึกษาคุณสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ชีวภาพ

(A)



(B)



ภาพที่ 12 ลักษณะของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากแบคทีเรียที่เลี้ยงร้อน
(A) *Gemella* sp. CH 11 และ (B) *Acinetobacter* sp. FT3

Figure 12 Partially purified bioproduct produced by (A) *Gemella* sp. CH 11 and
(B) *Acinetobacter* sp. FT3

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี Colorimetric method (ตารางที่ 6) พบว่าสารชีวภาพจากแบคทีเรียชนิด *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 ไม่มีกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกและกลุ่มอัลฟาอะมิโนเป็นองค์ประกอบ และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเชิงปริมาณซึ่งประกอบด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลที่เป็นกลาง กรดยูโรนิก เอสเทอร์ซัลเฟต และโปรตีน พบว่าสารชีวภาพจากสายพันธุ์ CH11 และ FT3 ประกอบด้วยเอสเทอร์ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก (13.26 และ 13.89 % ตามลำดับ) และพบน้ำตาล (3.82 และ 3.31 % ตามลำดับ) และโปรตีนในปริมาณเล็กน้อย (1.19 และ 1.87% ตามลำดับ) ทั้งนี้ไม่พบปริมาณกรดยูโรนิกในสารชีวภาพจากสายพันธุ์ CH11 แต่พบปริมาณเล็กน้อยมาก (0.25 % w/w) ในสารชีวภาพจากสายพันธุ์ FT3

เมื่อนำสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณธาตุหลัก (CHONS) ในโมเลกุล (ตารางที่ 7) พบว่าสารชีวภาพจากสายพันธุ์ CH11 มีปริมาณคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน และกำมะถันเท่ากับ 1.97, 0.24, 11.30, น้อยกว่า 0.01 และ 5.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่สารชีวภาพจากสายพันธุ์ FT3 มีปริมาณแร่ธาตุหลักเหล่านี้เท่ากับ 2.30, 0.72, 6.16, 0.31 และ 5.63 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการทดลองที่ได้เป็นการยืนยันได้ว่าสารชีวภาพทั้งสองชนิดนั้นมีส่วนของธาตุกำมะถัน (S) เป็นองค์ประกอบหลัก และเมื่อทดลองนำอาหาร PR ที่ไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น (starter) มาผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเอทานอลเช่นเดียวกันกับน้ำหมักจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าตะกอนที่เกิดขึ้นมีลักษณะเหมือนกับตะกอนที่ได้จากน้ำหมัก และจากการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุหลัก พบว่ามีปริมาณคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน และกำมะถันเท่ากับ 1.99, 3.31, 24.07, 2.81 และน้อยกว่า 0.01 โดยเฉพาะปริมาณธาตุกำมะถันในอาหาร PR มีค่าน้อยกว่าตะกอนที่ได้จากแบคทีเรียทั้งสองประมาณ 500 เท่า

2.4 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

2.4.1 คุณสมบัติในการละลาย

การทดสอบความสามารถในการละลายของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชนิด *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 ในตัวทำละลายทั้ง 9 ชนิด ดังนี้ น้ำกลั่น, เอทานอล, เมทานอล, อะซิโตน, เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, โฟพานอล, ไดคลอโรมีเทน และไอโซโพรพิลอีเทอร์ พบว่าสารชีวภาพจากแบคทีเรียชนิดทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อีก 8 ชนิด อธิบายได้ด้วยกฎการละลาย “สิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายในสิ่งที่เหมือนกัน” (like dissolves like) น้ำเป็นตัวทำละลายชนิดมีขั้วจับกันด้วย

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของสารชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ *Gemella* sp. CH 11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

Table 6 Components of the partially purified bioproduct from thermotolerant bacteria strain *Gemella* sp. CH11 and *Acinetobacter* sp. FT3.

Methods	Analyzed Item	Bioproduct by	
		<i>Gemella</i> sp. CH11	<i>Acinetobacter</i> sp. FT3
(% w/w)			
A : Qualitative analysis			
1. Ninhydrin reaction	α -amino acids	-	-
2. Xanthoproteic reaction	aromatic amino acids	-	-
B : Quantitative analysis			
1. Anthrone reaction	neutral sugars	2.58	1.06
2. Phenol-sulfuric acid reaction	total sugars	3.82	3.31
3. Carbazole-sulfate reaction	uronic acid	0	0.25
4. Turbidimetric	ester sulfate	13.26	13.89
5. Lowry	soluble protein	1.19	1.87

N.B. : + = positive result

- = negative result

ตารางที่ 7 ปริมาณธาตุหลักของสารชีวภาพจากแบคทีเรียที่เลี้ยงบนสลายพันธุ้ *Gemella* sp. CH11, *Acinetobacter* sp. FT3 และ PR-medium ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

Table 7 Major elements of bioproduct produced by *Gemella* sp. CH11, *Acinetobacter* sp. FT3 and from PR-medium

Elements	Bioproduct by		
	<i>Gemella</i> sp. CH11	<i>Acinetobacter</i> sp. FT3	PR-medium
	(% w/w)		
C	1.97	2.30	1.99
H	0.24	0.72	3.31
O	11.30	6.16	24.07
N	< 0.01	0.31	2.81
S	5.17	5.63	< 0.01

แรงไดโพล-ไดโพล และเป็นโมเลกุลที่มีไดโพลที่เสถียรมากโดยมีค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอีก 8 ชนิด สำหรับตัวถูกละลาย (สารชีวภาพ) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีพันธะเอมีน เอสเทอร์ และกลุ่มซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจับกันด้วยแรงไดโพล-ไดโพลเช่นเดียวกันจึงเกิดการละลายในพวกมีขั้วด้วยตัวเอง (สุวรรณา เหลืองชลธาร, 2542)

เมื่อพิจารณาลักษณะการละลายของสารชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียหนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์ในน้ำ พบว่าสามารถละลายได้ทันทีซึ่งไม่ใช่ลักษณะการละลายของพอลิเมอร์ เนื่องจากโมเลกุลของพอลิเมอร์เป็นโซ่ยาวหรือมีขนาดใหญ่มาก กระบวนการเกิดสารละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลายโดยทั่วไปจึงเกิดได้ช้ากว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการละลายของสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กหรือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ หลังจากการผสมพอลิเมอร์และตัวทำละลายเข้าด้วยกันแล้ว โมเลกุลของตัวทำละลายจะแพร่เข้าหาโมเลกุลของพอลิเมอร์อย่างช้า ๆ เกิดการกระทำซึ่งกันและกันระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลายกับพอลิเมอร์ โมเลกุลของพอลิเมอร์จะขยายตัวออกโดยการบวมตัวขึ้นปรากฏเป็นลักษณะคล้ายวุ้น (gel) มีความเหนียวหนืดก่อนที่จะละลายอย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลาย (ชัยวัฒน์ เจนวานิชย์, 2527) ซึ่งไม่ปรากฏกระบวนการเหล่านี้ในตัวอย่างสารชีวภาพจากแบคทีเรียหนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์

2.4.2 คุณสมบัติการเกิดเจล

การทดสอบความสามารถในการเกิดเจลของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากแบคทีเรีย *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (NaOH) เมื่อมีเกลือชนิดประจุ +1 และ +2 พบว่าไม่สามารถฟอร์มตัวเป็นเจล เนื่องจากสารชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียหนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นเป็นสารโมเลกุลเล็กมีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 193 และ 399 ดาลตัน จึงเกิดกระบวนการการละลายอย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลาย ซึ่งแตกต่างจากสารโมเลกุลใหญ่อย่างเช่น พอลิเมอร์ โดยจะเกิดเป็นโครงร่างตาข่าย 3 มิติที่สามารถอุ้มน้ำไว้ภายในได้ จึงมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว จากรายงานการศึกษาพบว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์สามารถฟอร์มตัวเป็นเจลในสภาวะที่มีประจุ +2 เช่น K-carrageenan, alginate, xanthan gum และ gellan gum จะฟอร์มตัวเป็นเจลเมื่อมีเกลือ Ca^{2+} เช่นเดียวกันกับพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *Enterobacter* sp. เกิดเป็นเจลเมื่อมี $CaCl_2$, $MgSO_4$ และ $CuSO_4$ โดยเฉพาะเจลที่เกิดในสภาวะที่มี Cu^{2+} นั้นจะเป็นเจลที่มีความแข็งแรงมากที่สุด และพบว่ามีความแข็งแรงมากกว่าพอลิเมอร์ xanthan gum เมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน จึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการดูดซับโลหะหนักในระบบบำบัดน้ำเสีย

(Shimada *et al.*, 1997) และจากรายงานของ Dermlim, 1999 พบว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ผลิตจากเชื้อ *Enterobacter cloacae* WD7 สามารถฟอร์มตัวเป็นเจลในสภาวะที่เป็นต่าง โดยเจลจะมีความแข็งแรงมากที่สุดเมื่อมีการเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ จากความสามารถในการเกิดเจลของพอลิเมอร์ชีวภาพในสภาวะที่มีการเติมเกลือ จึงมีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้เป็นสารดูดซับโลหะหนัก (biosorption) (Shimada *et al.*, 1997; Gutnick and Bach, 2000)

2.4.3 คุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอน

เตรียมสารละลายของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนของ *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 ความเข้มข้น 20-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาคุณสมบัติการตกตะกอนในสารแขวนลอย Kaolin ที่มีความเข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำสารละลายส่วนบนสุดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร พบว่าค่าดูดกลืนแสงที่ได้มีค่ามากกว่าชุดควบคุม (น้ำกลั่น) ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์จึงไม่มีคุณสมบัติเป็นสารตกตะกอนชีวภาพ (biofloculant) อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำมาก ทำให้ประสิทธิภาพของการสร้างสะพานเชื่อม (bridging mechanism) ในกลไกการตกตะกอนต่ำ ซึ่งกลไกการตกตะกอนมีความสัมพันธ์กับขนาดของสารตกตะกอนชีวภาพ โดยสารตกตะกอนชีวภาพที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูงจะเป็นการเพิ่มบริเวณการดูดซับ, ความแข็งแรงของสะพานเชื่อมระหว่างอนุภาคคอลลอยด์ และให้ค่ากิจกรรมการตกตะกอนสูงกว่าสารตกตะกอนชีวภาพที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ (Salehizadeh and Shojaosadati, 2001) โดยทั่วไปค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารตกตะกอนชีวภาพมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 10^5 ถึง 2×10^6 ดาลตัน (Yokoi *et al.*, 1996) เช่น 140,000 ดาลตันจาก *Flavobacterium* sp. (Tong *et al.*, 1999) 100,000 ดาลตันจาก *Corynebacterium glutamicum* (He *et al.*, 2002) และมากกว่า 200,000 ดาลตันจาก *Klebsiella pneumoniae* (Nakata and Kurane, 1999) จากรายงานการทดลองที่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับสารตกตะกอนชีวภาพชนิดต่าง ๆ พบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุดที่เคยมีรายงานประมาณ 37,000 ดาลตัน โดยผลิตจากเชื้อ *Hansenula anomala* J224 (Saito *et al.*, 1990) นอกจากค่าน้ำหนักโมเลกุลจะมีผลต่อกลไกการตกตะกอนแล้ว ค่าความเข้มข้นของพอลิเมอร์ชนิดของพอลิเมอร์ อุณหภูมิ ระดับพีเอช และชนิดของไอออนก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมการตกตะกอนด้วย (Dermlim, 1999)

2.4.4 คุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์

เมื่อทดสอบการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากแบคทีเรียหนักร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ 3 สายพันธุ์ คือ *S. aureus*, *E. coli* และ *B. subtilis* โดยใช้ยา

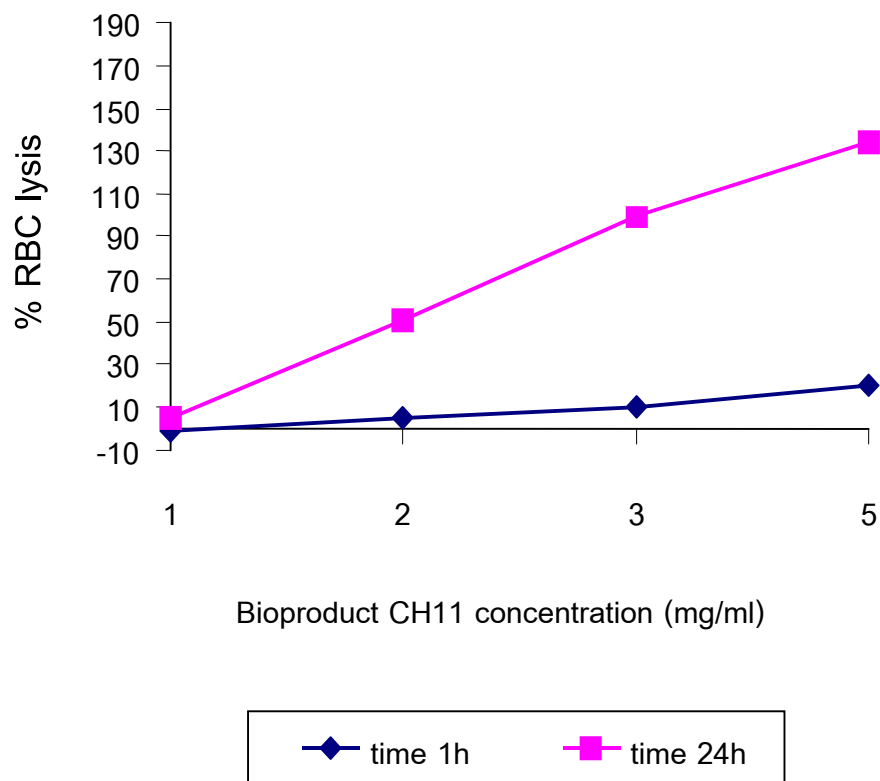
chloramphenicol เป็นชุดควบคุม บ่มเพื่อทดสอบเป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่นทดสอบ (disc) พบว่าสารชีวภาพที่ได้ไม่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งแบคทีเรีย มีรายงานว่าพอลิเมอร์ชนิดพอลิไลซีนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้น 1-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพอลิไลซีนจาก *Streptomyces albulus* ที่มีจำนวนโมโนเมอร์ตั้งแต่ 1-8 โมโนเมอร์ให้ผลการยับยั้งดีกว่าจำนวนโมโนเมอร์ที่ต่อกันมากกว่า 10 จำนวน นอกจากนี้มีการพบว่าพอลิเมอร์ชีวภาพ (n=25-30) ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าพอลิเมอร์จากกระบวนการทางเคมี (n=50) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า (Shima *et al.*, 1984)

2.4.5 ความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากแบคทีเรียที่เลี้ยงใน 2 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สาร Triton x-100 เป็นชุดควบคุม พบว่าสารชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่เลี้ยงใน 2 สายพันธุ์มีความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดงโดยหลังจากการบ่มเป็นเวลา 1 และ 24 ชั่วโมง พบว่าทำให้เปอร์เซ็นต์การแตกตัวของเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารชีวภาพเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 13-14) และความเข้มข้นตั้งแต่ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไปทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวได้ 100 เปอร์เซ็นต์หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตจากภาพถ่ายเม็ดเลือดแดงเริ่มต้นซึ่งมีลักษณะตรงตามปกติแต่หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีเม็ดเลือดแดงบางส่วนเริ่มแตกสลายและแตกอย่างสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 15) สำหรับสารชีวภาพจากแบคทีเรียที่ 2 สายพันธุ์นั้นมีความเป็นพิษน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการทดลองของ Carreno-Gomez และ Duncan (1997) พบว่าไคโตแซนสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ความเข้มข้นเพียง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากในไคโตแซนมีปริมาณของ N-acetyl-D-glucosamine ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ และเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวโดยหมู่อะมิโนของไคโตแซนจับกับ anionic glycoprotein ของผิวเม็ดเลือดแดง จึงทำให้ผิวของเม็ดเลือดแดงบวมเต่งและแตก ในขณะที่สารชีวภาพจากแบคทีเรียที่ 2 สายพันธุ์ไม่มีสาร N-acetyl-D-glucosamine เป็นองค์ประกอบหลักแต่มีหมู่เอมีนเพียงเล็กน้อย จึงทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกที่ความเข้มข้นของสารชีวภาพมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของไคโตแซน

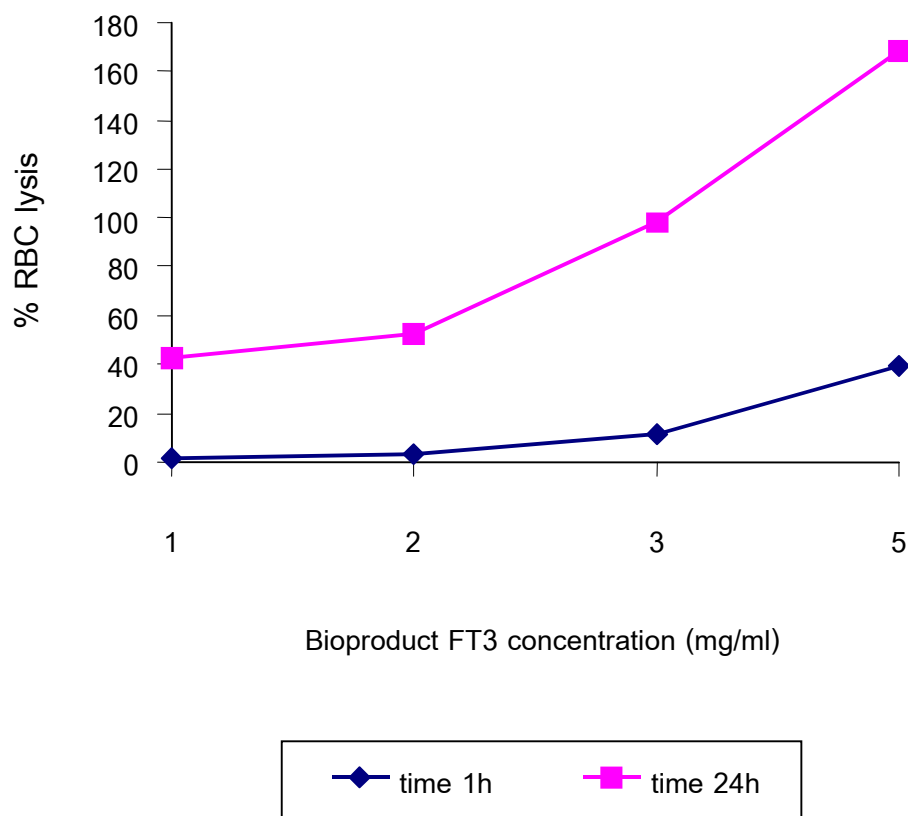
2.5 การวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชัน น้ำหนักโมเลกุลและการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล

เมื่อตรวจสอบสารชีวภาพโดยการวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชัน (ตารางที่ 8) พบว่าแถบที่ปรากฏในย่านความถี่ตั้งแต่ 400-4,000 cm^{-1} ของทั้ง 3 ตัวอย่างมีลักษณะเหมือนกัน และสามารถจำแนกแถบเหล่านี้ได้เป็นหมู่เอมีน (N-H), เอสเทอร์ (C-O) และสารประกอบซัลเฟอร์ (S=O) (ภาพที่ 16-



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง(ของคน)เมื่อใช้สารชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียทนร้อน *Gemella* sp. CH11

Figure 13 Percentage of red blood cell lysis (human) after incubation with soluble bioproduct from thermotolerant *Gemella* sp. CH11



ภาพที่ 14 เปอร์เซนต์การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง(ของคน)เมื่อใช้สารชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียทนร้อน *Acinetobacter* sp. FT3

Figure 14 Percentage of red blood cell lysis (human) after incubation with soluble bioproduct from thermotolerant *Acinetobacter* sp. FT3

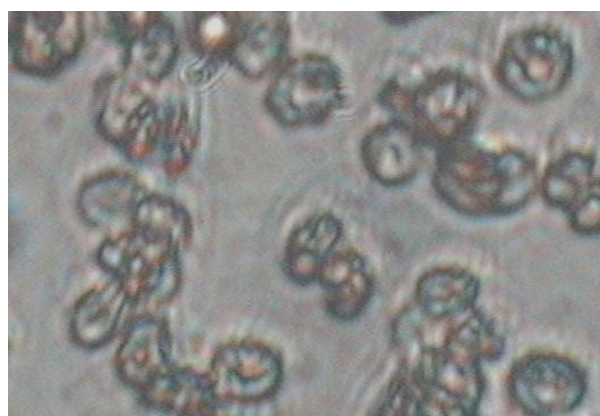
(A)



(B)



(C)



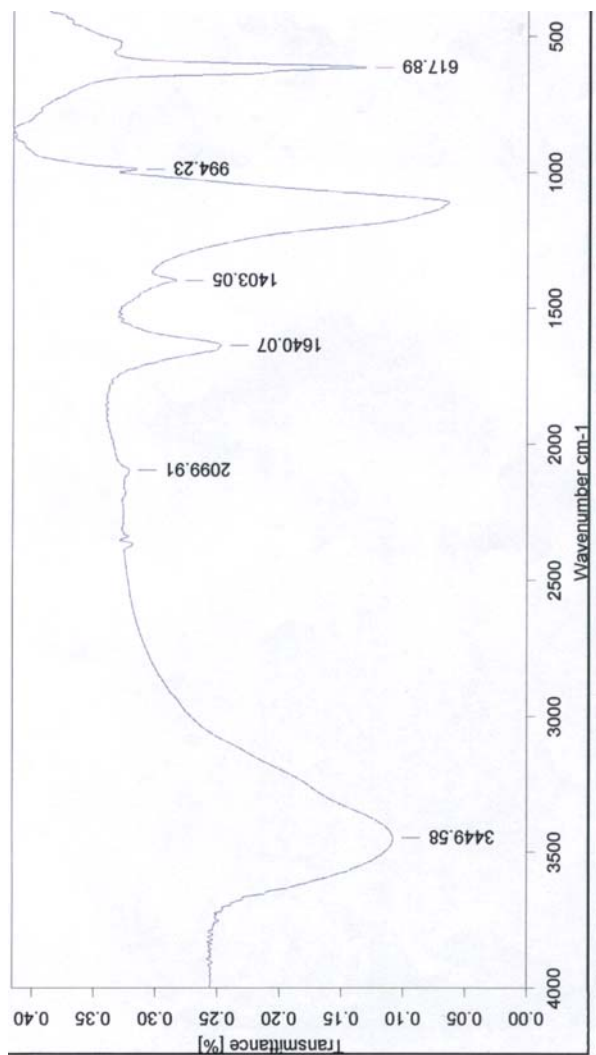
ภาพที่ 15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast ของเม็ดเลือดแดง (คน) ในสารละลายชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน *Acinetobacter* sp. FT3 ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (a) ปกติ, (b) หลังจากการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ (c) หลังจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Figure 15 Phase contract images of human red blood cell with soluble bioproduct from thermotolerant *Acinetobacter* sp. FT3 concentration of 3 mg/ml (a) control RBC, (b) after incubation 1 h and (c) after incubation 24 h.

ตารางที่ 8 หมู่ฟังก์ชันของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ *Gemella* sp. CH11, *Acinetobacter* sp. FT3 และ PR-medium

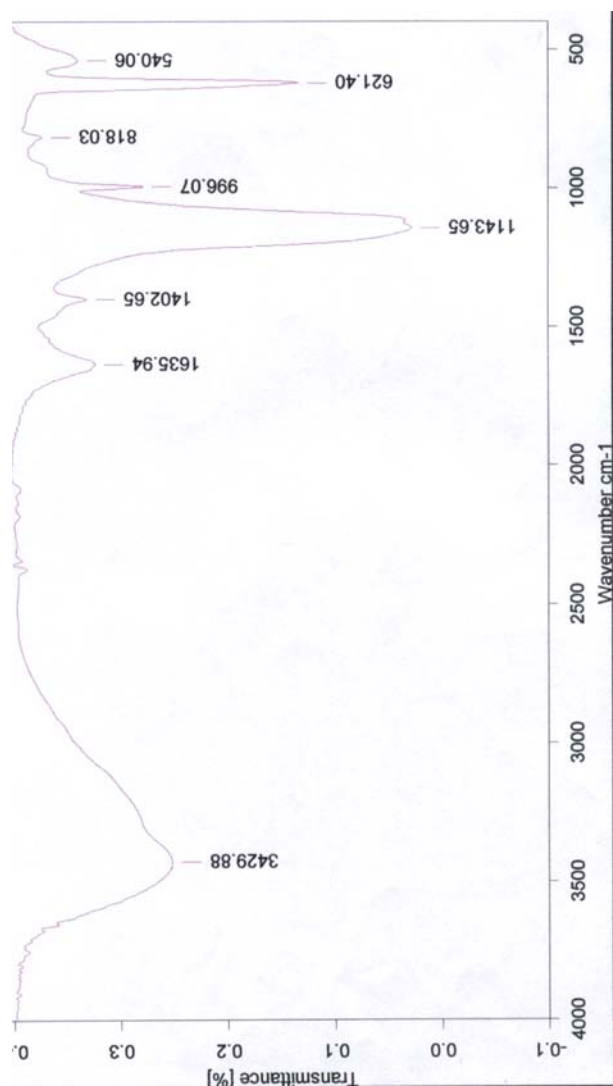
Table 8 Functional groups of bioproducts from thermotolerant bacteria strain *Gemella* sp. CH11, *Acinetobacter* sp. FT3 and PR-medium.

Bonds	Bioproducts from	Frequency (cm ⁻¹)
N-H stretching and bending	strain CH11	3449.58 and 1640.07
	strain FT3	3429.88 and 1635.94
	PR-medium	3425.27 and 1654.90
C-O stretching and sulphate	strain CH11	1112.17
	strain FT3	1143.65
	PR-medium	1114.09



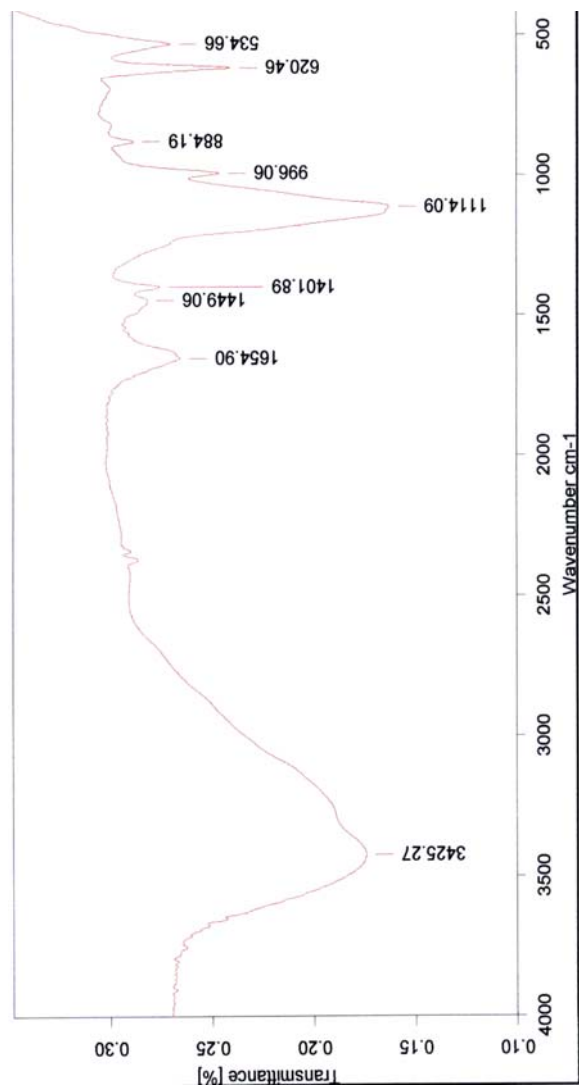
ภาพที่ 16 ลักษณะแถบความถี่ FT-IR spectrum ของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ *Gemella* sp. CH11 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR Equinox 55 spectrophotometer (Bruker)

Figure 16 The infrared spectrum of bioproduct produced by *Gemella* sp. CH11 with FT-IR Equinox 55 spectrophotometer (Bruker)



ภาพที่ 17 ลักษณะแถบความถี่ FT-IR spectrum ของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. FT3 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR Equinox 55 spectrophotometer (Bruker)

Figure 17 The infrared spectrum of bioproduct produced by *Acinetobacter* sp. FT3 with FT-IR Equinox 55 spectrophotometer (Bruker)



ภาพที่ 18 ลักษณะแถบความถี่ FT-IR spectrum ของสารชีวภาพจากอาหาร PR-medium เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR Equinox 55 spectrophotometer (Bruker)

Figure 18 The infrared spectrum of PR-medium with FT-IR Equinox 55 spectrophotometer (Bruker)

18) โดยกลุ่มเอมีนจะเกิดแถบจากการยืดของพันธะ N-H ในช่วงความถี่ 3500-3300 cm^{-1} จำนวน 1 แถบ และเกิดแถบการงอในช่วงความถี่ 1650-1510 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะของเอมีนชนิดปฐมภูมิ สำหรับแถบดูดกลืนของสารประเภทเอสเทอร์และแถบที่แสดงลักษณะของ sulphate จะเกิดแถบในช่วง 1130-1080 cm^{-1}

ค่าน้ำหนักโมเลกุลและค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลเป็นคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับพอลิเมอร์ โดยค่าน้ำหนักโมเลกุลเป็นค่าที่บ่งบอกถึงขนาดของพอลิเมอร์ ส่วนค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลเป็นค่าที่แสดงถึงการกระจายตัวของโมเลกุลในสายโซ่ของพอลิเมอร์ (Campbell and White, 1989) เช่น ค่าน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ชนิดพอลิไลซีน (PL) จากเชื้อ *Streptomyces albulus* มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,000 ดาลตัน และมีไฮโปพอลิเมอร์เชื่อมต่อกันประมาณ 25-30 โมเลกุล ($n = 25-30$) (Kunioka, 1997) ในขณะที่พอลิเมอร์ชนิดพอลิกลูตามาต (PGA) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยอยู่ในช่วง 100,000 ถึง 800,000 ดาลตัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรียและระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (Shih et al., 2001) และมีค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 2-5 (Shih and Van, 2001) เช่น พอลิกลูตามาตที่ผลิตจาก *B. subtilis* IFO3335 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 266,000–4,110,000 ดาลตัน ค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 2.8–10.5 (Goto and Kunioka, 1992) ในขณะที่พอลิกลูตามาตที่ผลิตจาก *B. licheniformis* CCRC12826 มีค่าน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 2×10^6 ดาลตัน (Shih et al., 2001) สำหรับพอลิเมอร์ชนิดพอลิแซคคาไรด์ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุลสูงมากโดยมีค่าน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50,000 ดาลตันถึงมากกว่า 1 ล้านกิโลดาลตัน (Weiner, 1997) เช่น พอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Klebsiella* มีค่าน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 2×10^6 ดาลตัน (Dermlim et al., 1999), จากเชื้อ *Antrodia camphorata* มีค่าน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 2.18×10^5 ดาลตัน (Shu and Lung, 2003) หรือจากเชื้อ *Enterobacter* sp. มีค่าน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 2.5×10^6 ดาลตัน (Yokoi et al., 1997) โดยเกิดจากหน่วยโมโนเมอร์แซคคาไรด์ หรืออนุพันธ์ของโมโนเมอร์แซคคาไรด์เชื่อมต่อกันมากกว่า 10 หน่วยขึ้นไป ($n \geq 10$) (McIlray, 1967) จากการวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักโมเลกุลและการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) (ตารางที่ 9) พบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารชีวภาพจาก *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 193 และ 399 ดาลตันตามลำดับ สำหรับค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเท่ากับ 1.4 และ 1.1 ตามลำดับ เนื่องจากลักษณะของพอลิเมอร์ซึ่งเกิดจากโมโนเมอร์หรือโอลิโกเมอร์มาเรียงต่อกันโดยมีค่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุดที่จัดเป็น

ตารางที่ 9 น้ำหนักโมเลกุลและการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของสารชีวภาพจากแบคทีเรียที่เลี้ยงในสายพันธุ์ *Gemella* sp. CH11, *Acinetobacter* sp. FT3 และ PR-medium ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

Table 9 Molecular weight and polydispersity of bioproduct produced by *Gemella* sp. CH11, *Acinetobacter* sp. FT3 and PR-medium

Molecular weight	Bioproduct by		
	<i>Gemella</i> sp. CH11	<i>Acinetobacter</i> sp. FT3	PR-medium
	(% w/w)		
Number-average molecular weight (Mn)	130	349	123
Weight-average molecular weight (Mw)	193	339	168
Polydispersity (Mw/Mn)	1.48	1.14	1.36

พอลิเมอร์ คือ หลักพัน (Oadian, 1933) แต่สารชีวภาพที่ได้จากการผลิตครั้งนี้มีเพียงหลักร้อย จึงไม่จัดว่าสารชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรียหนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์นี้เป็นพอลิเมอร์

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้น สรุปได้ว่า สารชีวภาพที่เกิดจากการนำน้ำหมักของแบคทีเรียหนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่ใช่พอลิเมอร์ เนื่องจากเมื่อพิจารณาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ เช่น แร่ธาตุหลัก ค่าน้ำหนักโมเลกุล หมู่ฟังก์ชัน และคุณสมบัติบางประการแล้วพบว่าให้ผลเช่นเดียวกันกับตะกอนจากอาหาร PR นอกจากปริมาณซัลเฟตของสารชีวภาพทั้ง 2 ชนิดที่มีปริมาณสูงกว่ามาก จึงเป็นไปได้ว่าตะกอนที่เกิดขึ้นก็คือ อาหาร PR ที่เหลือจากการใช้โดยจุลินทรีย์ เมื่ออยู่ในเอทานอลแล้วจะเกิดการตกตะกอนและรวมกับปริมาณของซัลเฟตที่เชื้อผลิตออกมา เพราะว่าเมื่อพิจารณาจากสารตัวอย่างทั้ง 3 ซึ่งมีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อมีซัลเฟตปริมาณเพียงเล็กน้อยจาก $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เพียง 0.5 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นปริมาณซัลเฟตที่เพิ่มขึ้นจึงเป็นการผลิตจากเชื้อ และเมื่อพิจารณาจากแหล่งที่มาของเชื้อ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำยางข้น ซึ่งน้ำเสียจากโรงงานเหล่านี้มักมีปริมาณซัลเฟตค่อนข้างสูง อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมเหล่านี้และเพื่อการอยู่รอดเชื้อจึงมีการสร้างสารพอลิเมอร์ออกมาป้องกันตัวเอง นอกจากนี้อาจมีปัจจัยบางอย่างที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมนั้นเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับยีนทำให้แบคทีเรียเหล่านี้มีการผลิตสารประกอบซัลเฟตออกมา เช่นเดียวกับความสามารถในการดูดซับฟอสเฟตในระบบบำบัดน้ำเสียโดยเชื้อ *Acinetobacter* ซึ่งแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่าสามารถดูดซับได้ถึง 100 มิลลิกรัมของฟอสฟอรัสต่อกรัมเซลล์แห้ง โดยดูดซับได้ในสภาวะที่มีอากาศและปลดปล่อยออกมาในสภาวะไร้อากาศ (Abdel-El-Haleem, 2003) ดังนั้นเมื่อมีการแยกเชื้อจึงปรากฏลักษณะของการสร้างสารพอลิเมอร์ แต่เมื่อนำมาทดลองพบว่าเชื้อได้สูญเสียความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ อาจเนื่องมาจากระยะเวลาของการเก็บรักษาที่นาน หรือไม่ได้อยู่ในสภาวะที่ขาดสารอาหาร หรืออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน (C:N ratio) ไม่มากพอ

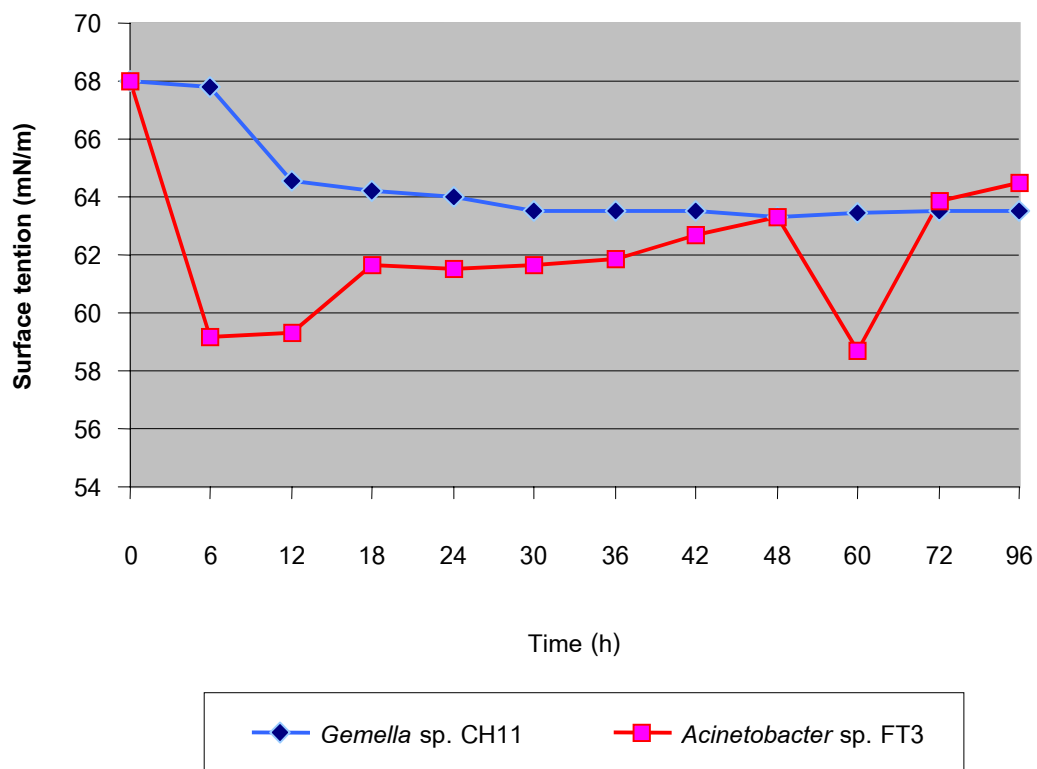
3. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียหนร้อน 2 สายพันธุ์

3.1 การคัดเลือกเบื้องต้น (primary screening)

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มี haemolysis activity คือ มีความสามารถในการเจริญและให้วงใสรอบโคโลนีได้ในอาหาร blood agar ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ (Carrillo *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1998) แต่เมื่อนำแบคทีเรียหนร้อนทั้ง 2

สายพันธุ์มาเพาะบนอาหาร blood agar เพื่อเป็นการคัดเลือเบื้องต้น (primary screening) พบว่าไม่เกิดวงใสรอบ ๆ โคลนนี้ อาจเป็นไปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียที่เรียกร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตได้นั้น มีปริมาณน้อยมากหรือเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีผลทำลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Youssef และคณะ (2004) โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น พบว่ามีแบคทีเรียที่แสดงผล negative สำหรับวิธี lysis blood agar แต่กลับให้ผล positive เมื่อทดสอบด้วยวิธี drop collapse และ oil spreading ซึ่งคิดเป็น 49 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และให้ค่า surface tension อยู่ในช่วงระหว่าง 50-35 mN/m ในทางกลับกันแบคทีเรียที่แสดงผล positive สำหรับวิธี lysis blood agar โดยเกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 3 เซนติเมตร มีจำนวน 25 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แต่กลับมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ต่ำ โดยให้ค่า surface tension มากกว่า 60 mN/m เนื่องจากการทำลายเม็ดเลือดแดงในวิธี lysis blood agar นั้นไม่ได้เป็นผลมาจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพียงอย่างเดียว แต่อาจเป็นผลมาจากประจุ +2 หรือสารประเภทอื่นที่เชื้อผลิตได้ (Lin *et al.*, 1998) ดังนั้นในการตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควรทำควบคู่กันหลาย ๆ วิธี เนื่องจากแต่ละวิธีที่ใช้ทดสอบนั้นมีความไว (sensitive) ในการตรวจจับสารลดแรงตึงผิวได้ไม่เท่ากัน

เมื่อนำส่วนใสที่ได้หลังจากการแยกเซลล์ออกแล้วมาตรวจวัดค่าแรงตึงผิวเครื่อง Torsion balance และค่าความสามารถในการกระจายน้ำมัน หรือ Oil Displacement Area (ODA) ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ที่มีการปลดปล่อยออกมาออกเซลล์ (ภาพที่ 19) พบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนใสจากแบคทีเรียที่เรียกร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์นั้น ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเชื้อนาน 6-12 ชั่วโมง โดยสายพันธุ์ *Gemella* sp. CH11 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักเริ่มต้น 68.0 mN/m เป็น 64.5 mN/m ภายใน 12 ชั่วโมง และคงที่ที่ระดับ 63.0 mN/m ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 19) เมื่อทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน (ODA) โดยใช้น้ำหมักที่เวลา 12 และ 60 ชั่วโมงพบว่าไม่เกิดวงใส สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. FT3 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักได้เท่ากับ 59.0 mN/m ภายใน 6 ชั่วโมงหลังจากการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นความสามารถในการลดแรงตึงผิวเริ่มลดลงทำให้ค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักกลับมาเพิ่มขึ้นเป็น 61.0 mN/m จนกระทั่งชั่วโมงที่ 60 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นอีกครั้งทำให้ค่าแรงตึงผิวลดลงเหลือ 58.6 mN/m และให้ค่าการกระจายน้ำมัน (ODA) เท่ากับ 0.50 ตารางเซนติเมตร แต่ไม่เกิดวงใสเมื่อใช้น้ำหมักที่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อพิจารณาจากค่าแรงตึงผิวของส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. FT3 พบว่าสามารถลดได้ถึง



ภาพที่ 19 ค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 ในอาหารสูตร PR ที่มี 1% กลูโคส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที, อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Figure 19 The surface tension of culture supernatant from strain *Gemella* sp. CH11 and *Acinetobacter* sp. FT3

2 ครั้ง คือ 6-12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ และ 60 ชั่วโมงหลังจากการเลี้ยงโดยการลดลงของค่า surface tension ในครั้งที่ 2 นี้มีความเป็นไปได้มากกว่าเป็นผลมาจากสารลดแรงตึงผิวที่แบคทีเรียผลิตและปลดปล่อยออกมาออกเซลล์ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) การผลิตจะเกิดขึ้นเมื่อมีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่และมีการผลิตสูงสุดเมื่อเจริญอยู่ในช่วงปลายระยะคงที่ (Tuleva *et al.*, 2002; Tahzibi *et al.*, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองเกี่ยวกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดต่าง ๆ เช่น สารลดแรงตึงผิวชนิด Rhamnolipid จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวหลังจากชั่วโมงที่ 50 ซึ่งเป็นช่วงการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase และให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรในช่วงปลายระยะ stationary phase (Wu and Ju, 1998) เช่นเดียวกันกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวประเภท glycolipid จากยีสต์ *Candida antarctica* (Kim *et al.*, 2002) หรือการผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas putida* 21BN ซึ่งค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักลดลง 2 ครั้งเช่นเดียวกัน โดยครั้งแรกเกิดขึ้นหลังจากการเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ lag phase โดยค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักลดลงจาก 71 mN/m เหลือ 37 mN/m และลดลงอีกครั้งในระยะเวลา stationary phase โดยให้ค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักต่ำสุดเท่ากับ 29 mN/m (Tuleva *et al.*, 2002) ส่วนเชื้อ *B. licheniformis* KGL11 เริ่มผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงกลางระยะ stationary phase และให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 329 มิลลิกรัมต่อลิตรในช่วงปลายระยะ stationary phase (Lin *et al.*, 1998)

เมื่อพิจารณาค่าแรงตึงผิว (surface tension) ของน้ำหมักที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter* sp. FT3 ละลายอยู่นั้น พบว่ามีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการทดลองที่เกี่ยวกับการลดค่าแรงตึงผิวของน้ำหมัก โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเหล่านี้มีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถลดค่าแรงตึงผิวเหลือประมาณ 30 mN/m หรือ ต่ำกว่า เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Rhamnolipid จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 ลดค่าแรงตึงผิวจาก 72 mN/m เหลือ 28.2 mN/m (Tahzibi *et al.*, 2004) เชื้อ *Pseudomonas putida* 21BN ลดค่าแรงตึงผิวจาก 71 mN/m ลงเหลือ 29 mN/m (Tuleva *et al.*, 2002) สำหรับสารลดแรงตึงผิวชนิด surfactin ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ลดค่าแรงตึงผิวจาก 72 mN/m เหลือ 32 mN/m (Makkar and Cameotra, 1998) สารลดแรงตึงผิวชนิด mannosylerythritol lipid จากเชื้อ *Candida* sp. SY16 ลดค่าแรงตึงผิวจาก 72 mN/m ลงเหลือ 29 mN/m (Makkar and Cameotra, 1998) แต่การลดค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักโดยเชื้อ *Acinetobacter* sp. FT3 ลดลงจาก 68 mN/m เหลือเพียงแค่ 59.0 mN/m

อาจเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้นั้นมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในการหาค่า haemolysis activity หรืออาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการผลิตไม่เหมาะสม โดยแหล่งอาหารที่ใช้ในการเจริญมีผลต่อชนิดและปริมาณของสารลดแรงตึงผิว เช่น แหล่งคาร์บอนนับว่ามีความสำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากสามารถชักนำให้จุลินทรีย์บางชนิดผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เช่น *P. aeruginosa* และ *Candida* sp. เมื่อเจริญบน n-alkanes จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่หากเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นพวกคาร์โบไฮเดรตจะทำให้ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจถูกยับยั้ง (repression) ได้โดยกลูโคส หรือสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) เช่น *Acinetobacter calcoaceticus* และ *A. paraffineus* ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เมื่อมีการเจริญบนกรดอินทรีย์หรือกลูโคส (Cameotra and Makkar, 1998) เช่นเดียวกับการทดลองของจันท์เพ็ญ อีสลาม (2544) พบว่า *Acinetobacter* sp. S7 มีการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น หรือเชื้ออาจมีความต้องการสารอาหารชนิดอื่นเพิ่มเติมในการผลิต เช่น การเติม L-amino acid ได้แก่ aspartic acid, glutamic acid, asparagine หรือ glycine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *A. paraffineus* ได้ (Duvnjak *et al.*, 1983 อ้างโดย จันท์เพ็ญ อีสลาม, 2544) นอกจากนี้สภาวะของการเจริญ เช่น อุณหภูมิ การกวน และปริมาณออกซิเจนที่ละลาย มีผลต่อการผลิตและค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวได้เช่นเดียวกัน และอุณหภูมิยังสามารถเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวได้อีกด้วย เนื่องจากอุณหภูมามีความสำคัญต่อกระบวนการสร้าง และการกระจายตัวของไขมันและกรดไขมัน เช่น มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความยาวของสายกรดไขมัน, มีผลต่อระดับของกรดไขมัน (fatty acid braching) และมีผลต่อการกระจายตัวรวมถึงความแตกต่างของสัดส่วนระหว่างไกลโคลิปิดและฟอสโฟลิปิดเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Kosaric, 1993)

3.2 การสกัดสารชีวภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกและการทำบริสุทธิ์บางส่วน

ทำการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวออกจากน้ำหมักเพื่อเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารชีวภาพให้มากพอที่จะเกิดพื้นที่วงใสเมื่อทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน

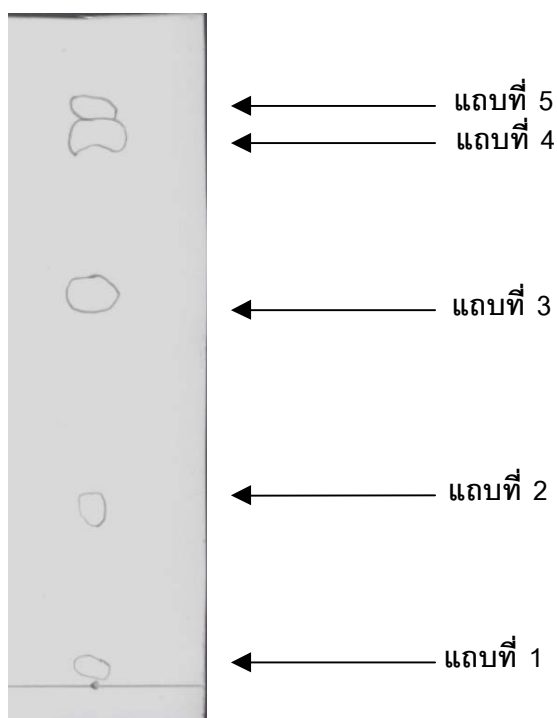
การสกัดสารทำโดยนำน้ำหมักที่เวลา 12 และ 60 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *Gemella* sp. CH11 และ *Acinetobacter* sp. FT3 มาสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย 6 M HCl (ตามวิธีการข้อ 3.2) และตรวจหาค่า ODA อีกครั้ง ผลปรากฏว่าไม่พบค่ากิจกรรมดังกล่าวจากทั้งส่วนของตะกอนและส่วนใสของสายพันธุ์ *Gemella* sp. CH11 ดังนั้นกล่าวได้ว่าสายพันธุ์ *Gemella* sp. CH11 ไม่

มีการผลิตสารลดแรงตึงผิว ในขณะที่สายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. FT3 ไม่พบค่ากิจกรรมดังกล่าว ในส่วนในสีที่ได้หลังจากการเติม 6 M HCl แต่พบค่ากิจกรรมในส่วนของตะกอน (acid precipitate) เกิดพื้นที่วงใสบนหน้าผิวน้ำมันเท่ากับ 0.79 ตารางเซนติเมตร ตะกอน acid precipitate ที่แยกได้ มีปริมาณเท่ากับ 0.089 กรัมต่อลิตร หลังจากนำไปผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนได้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวเท่ากับ 0.015 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิต 16.9 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับตะกอน acid precipitate จากปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่เชื้อผลิตได้มีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถวัดค่า CMC ได้ สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มีลักษณะคล้ายแวกซ์ สีเหลือง และเมื่อนำมาหาค่ากิจกรรมพบว่าให้ค่า ODA เท่ากับ 132.66 ตารางเซนติเมตร ซึ่งค่ากิจกรรมที่ได้เพิ่มขึ้น 265 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมก่อนการสกัดแยก (0.5 ตารางเซนติเมตร) แสดงว่าแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. FT3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้

3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.1 วิธี Thin layer Chromatography (TLC) : ผลของชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลาย

นำ crude biosurfactant ที่สกัดได้จากน้ำหมักของ *Acinetobacter* sp. FT3 ซึ่งมีลักษณะคล้ายแวกซ์ สีเหลือง มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบและทดสอบหาสภาวะที่ดีที่สุดในการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการใช้ TLC พบว่าตัวทำละลายเคลื่อนที่ต่างกันเมื่อมีการผสมสารในอัตราส่วนที่ต่างกัน ทำให้ได้ลักษณะและปริมาณของแถบที่แยกได้บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ แตกต่างกันด้วย โดย crude biosurfactant แยกแถบได้ดีในตัวทำละลาย chloroform : methanol : acetone ที่อัตราส่วน 90 : 10 : 6 และสามารถวัดค่า R_f ของแต่ละแถบ (ภาพที่ 20) ได้ดังนี้ แถบที่ 1 = 0, แถบที่ 2 = 0.26, แถบที่ 3 = 0.58, แถบที่ 4 = 0.76, แถบที่ 5 = 0.81 เมื่อนำแผ่น TLC ที่แยก crude biosurfactant มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ตารางที่ 10) โดยทดสอบกับ alkaline potassium permanganate ปรากฏว่าเกิดแถบสีเหลืองบนพื้นสีม่วง (แถบที่ 1, 2 และ 5) แสดงว่าแถบบ้างกล่าวมีคาร์โบไฮเดรตองค์ประกอบ และเมื่อนำไปทดสอบกับไอโอดีนของไอโอดีน (Iodine) ปรากฏแถบสีน้ำตาล (แถบที่ 1, 2, 4 และ 5) แสดงว่าแถบบ้างกล่าวอาจมีสารพวกคาร์โบไฮเดรตหรือไขมันเป็นองค์ประกอบส่วนการทดสอบกับ Rhodamine 6G พบว่าเกิดแถบสีเหลืองบนพื้นสีส้มอมชมพู แสดงว่าแถบบ้างกล่าวมีไขมันเป็นองค์ประกอบ (แถบที่ 1 และ 3) สำหรับการวิเคราะห์หาองค์ประกอบกลุ่มอะมิโนด้วยการสเปรย์กับสารละลาย ninhydrin พบว่าไม่เกิดแถบใด ๆ สำหรับจุดที่ปรากฏบนแผ่น TLC ทั้ง 5 ตำแหน่งสันนิษฐานว่าสารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างที่ต่างกัน



ภาพที่ 20 ลักษณะและปริมาณของแถบที่แยกได้จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. FT3 โดยวิธีวิเคราะห์บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254} เมื่อเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของตัวทำละลาย chloroform : methanol : acetone เป็น 90 : 10 : 6

*** ค่า R_f ของสารลดแรงตึงผิวที่แยกได้บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254} โดยแถบที่ A = 0, แถบที่ B = 0.26, แถบที่ C = 0.58, แถบที่ D = 0.76, แถบที่ E = 0.81

Figure 20 Thin-layer chromatography of biosurfactant from *Acinetobacter* sp. FT3 when developed in solvent system chloroform : methanol : acetone (90 : 10 : 6)

*** R_f of each spot : A = 0, B = 0.26, C = 0.58, D = 0.76 and E = 0.81

ตารางที่ 10 ผลของสารทดสอบต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. FT3 บนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ เมื่อเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของตัวทำละลาย chloroform : methanol : acetone เป็น 90 : 10 : 6

Table 10 The chemical testing of each spots from TLC plate when developed in solvent system; chloroform : methanol : acetone (90 : 10 : 6)

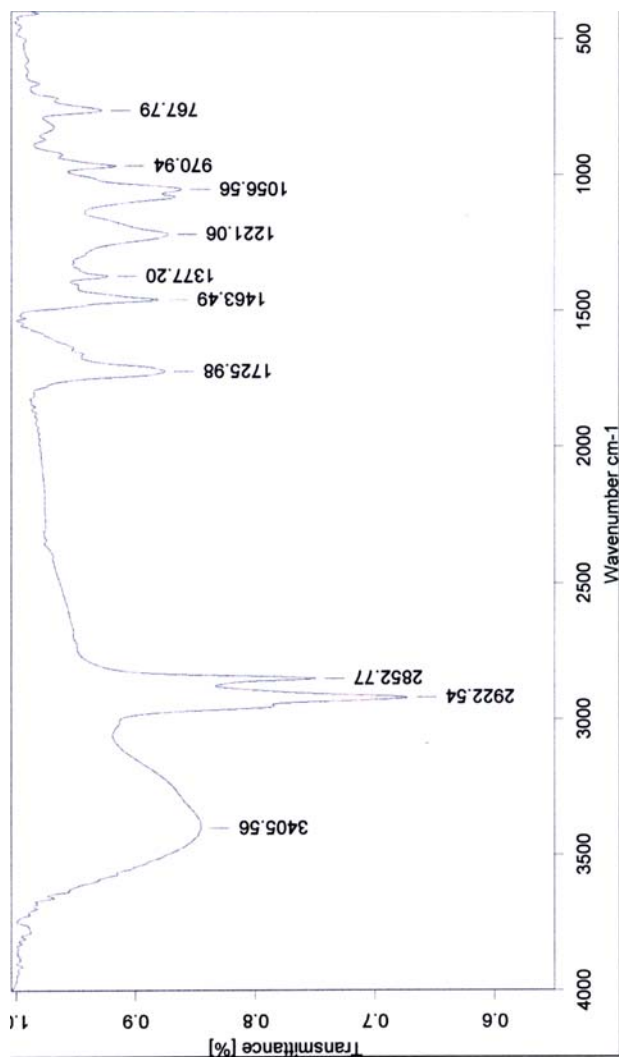
Reagents	Band
Alkaline potassium permanganate	1, 2 and 5
Iodine	1, 2, 4 and 5
Rhodamine 6G	1 and 3
Ninhydrin	-
UV 280 nm	1, 2, 4 and 5

- measured negative result

ซึ่งลักษณะแถบที่ปรากฏนี้สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Arino และคณะ (1996) ซึ่งวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *Pseudomonase aeruginosa* GL1 โดยใช้เทคนิค TLC เช่นเดียวกัน ปรากฏว่าหลังจากทดสอบกับไอระเหยของไอโอดีนแล้วเกิดแถบทั้งหมด 4 ตำแหน่งและเมื่อนำแถบแต่ละตำแหน่งย่อยด้วย 2M HCl ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC และ ELS (Evaporative light-scattering) พบว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด Rhamnolipid ที่มีกลุ่ม fatty acid ต่างกัน สำหรับการทดลองครั้งนี้ crude biosurfactant ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยกรด HCl จึงไม่ปรากฏเป็นแถบของสารคาร์โบไฮเดรต ไขมัน หรือ โปรตีนได้เป็นแถบเดี่ยว ๆ ดังนั้นจึงปรากฏสีหลาย ๆ สีในแถบเดียวกัน แต่สามารถวิเคราะห์เบื้องต้นได้ว่าแถบเหล่านี้เป็นแถบของสารที่มีคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก จึงคาดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. FT3 อาจเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม glycolipid หรือ lipopolysaccharide

3.3.2 วิธี Fourier–transform infrared (FT-IR)

ทำการยืนยันผลโดยการตรวจสอบหาหมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเทคนิค FT-IR (ภาพที่ 21 และ ตารางที่ 11) แสดงผลโดยเกิดแถบในความถี่ 3405.56 cm^{-1} ซึ่งเป็นแถบการยืดของพันธะ O-H สำหรับแถบที่เกิดในช่วงความถี่ $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ เป็นแถบที่เกิดจากการยืดของพันธะ C-H โดยอาจจะอยู่ในกลุ่มของ CH_2 หรือ CH_3 นอกจากนี้ยังปรากฏแถบที่ความถี่ 1725.98 cm^{-1} และ 1377.20 cm^{-1} ซึ่งเป็นแถบที่แสดงลักษณะของหมู่แอลดีไฮด์ โดยลักษณะของหมู่แอลดีไฮด์นั้นจะแสดงแถบการดูดกลืนจำนวน 2 แถบที่ย่านความถี่ $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ และ $2900\text{-}2695\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเกิดจากการยืดของพันธะ C=O และพันธะ C-H ของหมู่ฟอร์มิล (CHO) ตามลำดับโดยแถบที่เกิดในความถี่ 1377.20 cm^{-1} ของตัวอย่างสารนั้นเป็นการยืนยันว่าเป็นสารประกอบคาร์บอนิล สำหรับแถบที่เกิดในย่านความถี่ 1460 cm^{-1} นั้นเป็นแถบที่เกิดจากการงอของพันธะ C-H นอกจากนี้ยังเกิดแถบจากการงอของพันธะ C-H ในย่าน $1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นแถบที่เกิดจากการแทนที่บนพันธะคู่ในโมเลกุลของแอลคีน โดยแถบที่เกิดในช่วงความถี่นี้เป็นแถบที่ใช้สนับสนุนข้อมูลของแถบที่เกิดในความถี่ 2922.54 cm^{-1} และ 2852.77 cm^{-1} ของตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ FT3 ว่ามีหมู่แอลคีนเป็นองค์ประกอบและสารตัวอย่างยังปรากฏแถบที่เกิดจากการยืดของพันธะ C-O ที่ความถี่ 1221.06 cm^{-1} และ 1056.56 cm^{-1} อีกด้วย โดยการปรากฏแถบดูดกลืนที่เกิดจากการยืดของพันธะ C-O และ O-H นั้นเป็นการแสดงลักษณะของสารประกอบไฮดรอกซีซึ่งการยืดของพันธะ C-O จะปรากฏเป็นแถบที่มีความเข้มสูงในย่านความถี่ $1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ และแถบการยืดของพันธะ C-O นี้ใช้บ่งบอกว่ามีหมู่แอลกอฮอล์เป็น



ภาพที่ 21 ลักษณะแถบความถี่ FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. FT3 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR Equinox 55 spectrophotometer (Bruker)

Figure 21 The infrared spectrum of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. FT3 with FT-IR Equinox 55 spectrophotometer (Bruker)

ตารางที่ 11 หมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์
Acinetobacter sp. FT3

Table 11 Functional groups of biosurfactant from thermotolerant *Acinetobacter* sp. FT3

Frequency (cm ⁻¹)	Characteristic group
3405.56	O-H stretching
2922.54 and 2852.77	C-H stretching of CH ₂ , CH ₃
1725.98 and 1377.20	C=O stretching
1463.49	CH ₂ deformation
1377.2	CH ₃ deformation
1221.06	C-O deformation
1056.56	C-O stretching
970.94	C-H bend (C=C-H)

องค์ประกอบ แถบความถี่และหมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่างสารลดแรงตึงผิว FT3 ที่ปรากฏนั้นมีลักษณะของการเกิดแถบที่คล้ายกันกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม glycolipid ที่เคยมีรายงานมา เช่น จากการทดลองของ Tahzibi และคณะ (2004) หรือจากการทดลองของ Tuleva และคณะ (2003) โดยแสดงหมู่ alkyl, carbonyl เช่นเดียวกัน

ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acinetobacter* sp. FT3 จากการศึกษารายละเอียดองค์ประกอบขั้นต้นบนแผ่น TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ และ Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวจึงน่าจะเป็นกลุ่มของ glycolipid หรือ lipopolysaccharide แต่จากรายงานที่เคยมีการศึกษาหาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* พบว่าส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือเป็นกลุ่ม polymeric surfactant ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น polysaccharide-lipid-protein complex เช่น emulsan จากเชื้อ *A. calcoaceticus* RAG-1 มี polysaccharide-lipid-protein เป็นองค์ประกอบ หรือสาร biodispersan จากเชื้อ *A. calcoaceticus* A2 มีพอลิแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบหลักและค่าน้ำหนักโมเลกุลสูงเท่ากับ 51,400 ดาลตัน สำหรับสาร alasan จากเชื้อ *A. radioresisten* KA53 มีพอลิแซคคาไรด์และโปรตีนเป็นองค์ประกอบ (Navon-Venezia *et al.*, 1995; Rosenberg and Ron, 1997; 1999)

3.4 คุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ FT3 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Bacillus subtilis* ได้โดยปรากฏเป็นวงใสรอบแผ่นทดสอบ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่เคยมีการศึกษาโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Rhamnolipid ที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas putida* 21BN แสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* โดยเกิดวงใสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 36 มิลลิเมตร (Tuleva *et al.*, 2002) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวกลุ่ม lipopeptide มีชื่อว่า "Biosurfactan N1" ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* มีผลยับยั้งการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป รวมถึง *S. aureus* และ *Mycobacterium smegmatis* โดยแสดงผลกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ เกิดเป็นวงใสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ระดับ ++ (9-11 mm) ถึงระดับ +++ (>11 mm) (Singh and Cameotra, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารลดแรง

ตั้งผิวชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและไวรัสได้อีกด้วย โดยรายงานการทดลองของ Abalos และคณะ (2001 อ้างโดย Lang, 2002) ซึ่งพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด Rhamnolipid M7 มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Rhizoctonia solani* โดยให้ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวจาก *B. licheniformis* กลุ่ม lipopeptide ไม่สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Botrytis cinerea* ได้ แต่สามารถต่อต้านการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida utilis* โดยเกิดวงใสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ระดับ ++ (11-14 mm) และ +++ (15-18 mm) ตามลำดับแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อทดสอบ (Fiechter, 1992) สำหรับความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ เชื้อรา ยีสต์ หรือ ไวรัสนั้น ขึ้นอยู่กับกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ส่วนใหญ่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม lipopeptide มักแสดงคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ แต่สำหรับกลุ่ม glycolipid มีค่อนข้างน้อยและประสิทธิภาพก็ต่ำกว่ากลุ่ม lipopeptide นอกจากนี้ยังไม่เคยมีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม glycolipid ผลิตจากเชื้อสกุล *Acinetobacter* ที่แสดงคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์

ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทนร้อน *Acinetobacter* sp. FT3 ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างสารลดแรงตึงผิว น่าจะเป็นกลุ่มของ glycolipid หรือ lipopolysaccharide และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Bacillus subtilis* ได้