บทนำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) คือสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากสิ่งมีชีวิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการทำงานได้ดีที่พื้นผิวระหว่างน้ำ/ไขมัน (Desai and Banat, 1997) หรือพื้นผิวระหว่างน้ำ/อากาศ (Georgiou *et al.*, 1990) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดีคือ ย่อยสลายได้ (Zajic *et al.*, 1977) มีความเป็นพิษต่ำ (Poremba *et al.*, 1991) ทำงานได้ดีในช่วงกว้างของความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ (Cameotra and Makkar, 1998) และไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม (Georgiou *et al.*, 1990)

โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด คือ ไกลโคลิปิด (glycolipid) ไลโปเปปไทด์หรือไลโปโปรตีน (lipopeptide, lipoprotein) ฟอสโฟลิปิดและกรดไขมัน (phospholipids, fatty acids) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริก (polymeric biosurfactant) และ particulate biosurfactant (Desai and Banat, 1997) ในบางกรณีอาจแบ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล คือ มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (low-molecular-weight biosurfactant) ซึ่งโดยทั่วไปได้แก่ ไกลโคลิปิดและไลโปเปปไทด์ และสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก (high-molecular-weight biosurfactant) ได้แก่ amphipathic polysaccharide โปรตีน ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ (lipopolysaccharides) ไลโปโปรตีนหรือโพลีเมอร์ของสารเหล่านี้ (Rosenberg and Ron, 1999; Ron and Rosenberg, 2001)

ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้รับความสนใจจากนักวิจัยหลายกลุ่ม (Goes and Sheppard, 1999; Nakata, 2000; Nakkar and Gutnick, 2001; Tuleve *et al.*, 2002; Garcia-Junco *et al.*, 2003) แต่งานวิจัยที่เกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลไม่ว่าจะเป็นเรื่องเกี่ยวกับโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวหรือการนำไปใช้ประโยชน์ยังมีรายงานไม่มากนัก เช่น กลูโคสลิปิด (glucose lipid) จากเชื้อ *Alcaligenes* sp. (Poremba *et al.*, 1991) และ *Alcanivorax borkumensis* (Abraham *et al.*, 1998) หรือ trehalose tetraester และ trehalose diester จากเชื้อ *Arthorbacter* sp. SI 1 (Schulz *et al.*, 1991) และเชื้อ *Pseudomonas nautica* (Husain *et al.*, 1997) Zinjarde และ Pant (2002) รายงานการผลิต polymeric biosurfactant จากยีสต์ *Yarrowia lipolytica*

มลภาวะทางทะเลที่เกิดจากน้ำมันหรือน้ำมันดิบซึ่งมีไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบส่งผลกระทบต่อสัตว์ทะเลและห่วงโซ่อาหาร (Shriadah, 1998; Djomo *et al.*, 2004; Pelletier *et al.*, 2004) ถึงแม้ว่าธรรมชาติจะมีระบบทำความสะอาดด้วยตัวเอง (self-cleaning) โดยวิธีระเหย (evaporation)

และ/หรือ photo-oxidation ตลอดจนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น แต่กระบวนการเหล่านี้มักเกิดขึ้นอย่างช้าๆ โดยเฉพาะการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นเนื่องจากมีแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่ำ อย่างไรก็ตามการเติมแหล่งไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสจะช่วยเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันดิบได้ในช่วงแรกเท่านั้น (Maki *et al.*, 2003) และบางส่วนของน้ำมันดิบรวมตัวกันเกิดอิมัลชั่นแบบน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) ซึ่งจะจับตัวกันเป็นก้อนและเกิดการตกตะกอนทำให้ยากต่อการย่อยสลาย (Harayama *et al.*, 1999) การเพิ่มการละลายหรือเพิ่มความสามารถการใช้ไฮโดรคาร์บอนของจุลินทรีย์คือ การทำให้ไฮโดรคาร์บอนเกิดเป็นอิมัลชั่นซึ่งจะเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกาะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไฮโดรคาร์บอน (Beal and Betts, 2000; Iwabuchi *et al.*, 2002) ซึ่งอาจจะทำได้โดยการที่เชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมานอกเซลล์หรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นเกาะติดอยู่กับตัวเซลล์ (Haferburg *et al.*, 1986) หรือโดยการใช้สารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่มีข้อเสียคือมีความเป็นพิษต่อสัตว์ทะเลและตกค้างในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายได้ (Schulz *et al.*, 1991) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเฉพาะชนิดที่ติดกับตัวเซลล์ช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเช่น phenanthrene (Gilewicz *et al.*, 1997; Olivera *et al.*, 2003) และ resin (Venkateswaran *et al.*, 1995) ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวและการใช้สารลดแรงตึงผิวและ/หรือตัวเซลล์ที่ได้ในการกำจัดคราบน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเลหรือสิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO โดยใช้ตัวเซลล์และส่วนใส

เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน Marine broth 2216 (Difco, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกจาก culture broth ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) สองครั้ง ซัสเพน (suspend) เซลล์ที่ได้ในบัฟเฟอร์เดิมให้มีปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นแล้วเติมWCO ร้อยละ 1 ลงไปในสารละลายเซลล์ เขย่าภายใต้สภาวะเดียวกับการเลี้ยงเชื้อและทดสอบการอิมัลซิไฟด์ WCO ตามวิธีการของ Maneerat และคณะ (2006)

นอกจากนี้นำส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยง มากรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมโครเมตร ลงใน ฟลาสก์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม WCO ร้อยละ 1 เขย่าและสังเกตผลการอิมัลซิไฟด์น้ำมันดิบเช่นเดียวกับสารละลายเซลล์ แล้วเปรียบเทียบผลการอิมัลซิไฟด์ WCO ของเซลล์แขวนลอยและส่วนใส

2. ศึกษาลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อ *Myroides* sp. SM1

2.1 เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน Marine broth ที่เติม WCO ร้อยละ 1 แล้วเก็บตัวอย่าง culture broth มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะขนาดอนุภาคของ WCO และการเกาะติดของเซลล์กับ WCO ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง (Southam *et al.*, 2001; Zinjarde and Pant, 2002)

2.2 ศึกษาลักษณะของผนังเซลล์ของเชื้อโดยใช้ scanning electron microscope เปรียบเทียบลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อที่เลี้ยงใน Marine broth ใน Marine broth ที่เติม WCO และ resting cell จากข้อ 6.5.2.1 โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (Käppeli *et al.*, 1984)

2.3 ตรวจดูการสะสมไฮโดรคาร์บอนไว้ภายในเซลล์โดยใช้ transmission electron microscope ของตัวอย่างเชื้อที่เลี้ยงใน Marine broth ใน Marine broth ที่เติม WCO และ resting cell จากข้อ 6.5.1 โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (Marín *et al.*, 1995)

3. ศึกษาค่า Cell hydrophobicity

เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน Marine broth 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) สองครั้ง เตรียมเซลล์แขวนลอยในบัฟเฟอร์เดิมโดยเซลล์แขวนลอยควรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5 (ดัดแปลงจาก Rosenberg *et al.*, 1980)

ปิเปตสารละลายเซลล์ 3 มิลลิลิตรผสมรวมกับไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ (*n*-tridecane, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane, *n*-octadecane, toluene, xylene, kerosene, paraffin, mineral oil (light type)

และ mineral oil (heavy type)) 0.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แยกส่วนไฮโดรคาร์บอนออกไป วัดการดูดกลืนแสงของส่วนสารละลายเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่า cell hydrophobicity

Cell hydrophobicity (%) = $((1-A_j) / A_i)) \times 100$

A_j: ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเซลล์หลังจากผสมกับไฮโดรคาร์บอน

A_i: ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเซลล์ก่อนการผสมกับไฮโดรคาร์บอน

4. ศึกษาความสามารถในการใช้ไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Myroides* sp. SM1

เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน seawater medium (Yakimov *et al.*, 1998) แล้วเติมไฮโดรคาร์บอนร้อยละ 1 โดยไฮโดรคาร์บอนที่ใช้คือ *n*-tridecane, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane, *n*-octadecane, toluene, xylene, kerosene, paraffin, mineral oil (light type) และ mineral oil (heavy type) วัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

- เปรียบเทียบค่า cell hydrophobicity ของเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ กับเซลล์ที่เลี้ยงใน Marine broth

- เปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ของเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ กับเซลล์ที่เลี้ยงใน Marine broth

เลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่า cell hydrophobicity และการอิมัลซิไฟด์ WCO ที่สูงที่สุดเพื่อใช้เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ในการศึกษาขั้นต่อไป

5. ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์

เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ในอาหารที่เลือกได้จากข้อ 6.5.4 สุ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 6, 12, 24, 30 36, 42 และ 48 ชั่วโมง

- วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

- ตรวจสอบการอิมัลซิไฟด์ WCO ของเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 6.5.1

เปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ของช่วงเวลาต่างๆ ในการเลี้ยงเชื้อ เลือกช่วงเวลาที่มีการอิมัลซิไฟด์ WCO สูงที่สุดเพื่อใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ต่อไป

6. ศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์

เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ในอาหารที่เลือกได้จากข้อ 6.5.4 เมื่อถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 6.5.5 เหวี่ยงแยกเซลล์และล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) สองครั้ง แล้วเปรียบเทียบการสกัดสารลดแรงตึงผิวที่เกาะกับตัวเซลล์ด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้คือ

6.1 สกัดสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ในสภาวะที่เป็นกรด โดยปรับพีเอชของสารละลายเซลล์ให้เป็น 3.0 ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วสกัดด้วย ethyl acetate สองครั้ง ทำแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Passeri *et al.*, 1992)

6.2 สกัดสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์โดยใช้อัลตร้าโซนิก เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ในส่วนผสมของเมธานอล dichloromethane ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 20:10:8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วใช้อัลตร้าโซนิกนาน 15 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน หลังจากนั้นเติมส่วนผสมของเมธานอล dichloromethane ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:2:2 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วอัลตร้าโซนิกนาน 5 นาที เหวี่ยงแยกชั้นน้ำและชั้น dichloromethane นำชั้น dichloromethane มากำจัดน้ำโดยใช้ Na_2SO_4 ส่วนชั้นน้ำนำมาสกัดอีกครั้งด้วย dichloromethane เหวี่ยงแยกชั้นน้ำและชั้น dichloromethane นำชั้น dichloromethane มากำจัดน้ำโดยใช้ Na_2SO_4 นำส่วนของชั้น dichloromethane ที่ได้มารวมกันแล้วทำแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Abraham *et al.*, 1998)

6.3 สกัดสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์โดยใช้ส่วนผสมของตัวทำละลาย เตรียมสารแขวนลอยในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) แล้วสกัดด้วยส่วนผสมของคลอโรฟอร์ม เมธานอลในอัตราส่วน 2:1 โดยสกัดสองครั้ง นำชั้นคลอโรฟอร์มมาทำแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ (ดัดแปลงจาก Schulz *et al.*, 1991)

นำตัวอย่างที่สกัดได้จากทั้งสามวิธีมาหาน้ำหนักและตรวจสอบประสิทธิภาพในการอิมัลซิไฟด์ WCO เลือกวิธีที่สามารถสกัดสารลดแรงตึงผิวออกมาได้มากที่สุดเพื่อใช้ในการสกัดและทำบริสุทธิ์ต่อไป

7. ศึกษาการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์ที่สกัดได้

ทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้โดยใช้วิธีการสกัดที่เลือกได้จากข้อ 6.3 โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีซึ่งใช้ normal phase silica gel column chromatography โดยการชะด้วยคลอโรฟอร์ม และคลอโรฟอร์มและเมธานอลในอัตราส่วนต่างๆ คือ 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 และใช้เมธานอล หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่มีกิจกรรมมาใช้ reverse phase silica gel column chromatography โดยใช้เมธานอลและน้ำในอัตราส่วนต่างๆ คือ 50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 และเมธานอล

8. ศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวที่ผ่านทำบริสุทธิ์

นำสารลดแรงตึงผิวที่ทำบริสุทธิ์ได้จากข้อ 6.5.7 มาศึกษา

8.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยใช้ Thin-layer chromatograph

– ตรวจสอบการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งใช้ตรวจสอบสารอินทรีย์ทั่วไปและที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ซึ่งใช้ตรวจสอบ aromatic ring

– ใช้ไอระเหยของไอโอดีน (Wilkinson *et al.*, 1982) หรือ 2,7-dichlorofluoresceine (Schulz *et al.*, 1991) หรือ rhodamine B (McInerney *et al.*, 1990) เพื่อวิเคราะห์กรดไขมัน

– ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ (Wilkinson, 1972)

– ใช้ α-naphthol หรือ 4-methoxybenzaldehyde ในการวิเคราะห์น้ำตาล (Schulz *et al.*, 1991)

8.2 วิเคราะห์องค์ประกอบด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) (Huy *et al.*, 1999)

– การดูดกลืนแสงของพันธะเปบไทด์ (peptide bond) ที่ช่วง 1550 และ 1650 cm^{-1} ซึ่งจะบ่งบอกถึงการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์

– การดูดกลืนแสงของหมู่ไฮดรอกซิลด์ (O-H) ที่ช่วง 3350 cm^{-1} และพันธะเอสเธอร์ (C-O-C) ที่ช่วง 1060 cm^{-1} ซึ่งบ่งบอกถึงการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไกลโคลิปิด

– การดูดกลืนแสงในช่วง 3200 cm^{-1} บ่งบอกถึงการเป็น polysaccharide-type

9. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์ที่สกัดได้

9.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

ละลายสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ในน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชของตัวอย่างให้มีค่า 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วทดสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO โดยหยด WCO ลงไปในตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรต่อตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าโดยวางหลอดตัวอย่างเอียงประมาณ 45 องศา ตรวจสอบการอิมัลซิไฟด์ของ WCO (Komukai-Nakamura *et al.*, 1996)

9.2 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

ละลายสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ในน้ำกลั่น แล้วบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศา

เซลเซียส บ่มนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO เช่นเดียวกับข้อ 9.1

9.3 ผลของเกลือต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

ละลายสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ในน้ำกลั่นแล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.51-3.59 โมลาร์ หรือแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0-18 มิลลิโมลาร์ หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ 0-0.1 โมลาร์ ตรวจสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO เช่นเดียวกับข้อ 9.1

9.4 ศึกษาความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ (ดัดแปลงจาก Pruthi and Cameotra, 1995)

ละลายสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ในน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรแล้วเติมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ (*n*-tridecane, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane, *n*-octadecane, toluene, xylene, kerosene, paraffin, mineral oil (light type) และ mineral oil (heavy type)) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหาค่าดัชนีการอิมัลซิไฟด์ (emulsification index, E_{24} (%)) โดย

ค่าดัชนีการอิมัลซิไฟด์ = (ความสูงของอิมัลชั่น / ความสูงของสารละลายทั้งหมด) × 100

ผลการทดลองและวิจารณ์

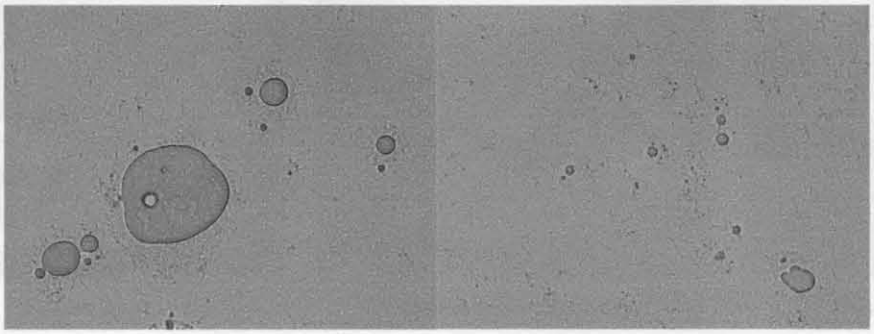
1. เปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO โดยใช้ตัวเซลล์และส่วนใส

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน Marine broth 2216 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเชื้อ แล้วล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) สองครั้ง แล้วซัสเพน (suspend) เซลล์ที่ได้ในบัฟเฟอร์เดิมให้มีปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นแล้วเติม WCO ร้อยละ 1 ลงไปในสารละลายเซลล์ ส่วนของส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงนำมากรองผ่านเมมเบรน 0.45 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วเติม WCO ร้อยละ 1 เขย่าภายใต้สภาวะเดียวกับการเลี้ยงเชื้อและดูการอิมัลซิไฟด์ของ WCO พบว่า ซัสเพนชั่นของเซลล์และส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ได้เหมือนกันดังภาพที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวเซลล์ของ *Myroides* sp. SM1 มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพติดอยู่จึงสามารถอิมัลซิไฟด์ WCO ได้เช่นเดียวกับในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ นั่นคือตัวเซลล์เองที่ทำหน้าที่หรือมีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวและ/หรือไบโออิมัลซิไฟเออร์ คือจัดอยู่ในกลุ่ม particulate biosurfactant (Desai and Banat, 1997) อย่างไรก็ตามในบางกรณีแม้ว่าแหล่งคาร์บอนจะไม่ใช่ไฮโดรคาร์บอนหรือเป็นแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำเชื้อจุลินทรีย์ก็อาจจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ติดกับตัวเซลล์ได้ เช่น *Alcanivorax borkumensis* DSM11573^{T} ใช้ไพรูเวต (pyruvate) เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากสกัดสารลดแรงตึงผิวจากผนังเซลล์ของเชื้อ พบว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้คือ กลูโคสลิปิดที่มีประจุลบ (anionic glucose lipid) (Abraham *et al.*, 1998) ในขณะที่ Yakimov และคณะ (1998) เลี้ยงเชื้อ *Alcanivorax borkumensis* 6 สายพันธุ์คือ AP1 MM1 SK SK2 SK4A และ SK7 โดยใช้ mihagol-S (C_{14-15}-n-alkanes) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อทั้งหมดผลิตกลูโคสลิปิดในสองรูปแบบคือ ผลิตออกมานอกตัวเซลล์และติดกับตัวเซลล์ (cell-bound) Bredholt และคณะ (1998) พบว่า *Rhodococcus* sp. ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเล มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์และใช้น้ำมันดิบชนิดต่างๆได้ และความสามารถในการอิมัลซิไฟด์จะสูงที่สุดในช่วง exponential phase ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ยีสต์ในชั้นของน้ำ แต่ไม่พบการผลิตสารลดแรงตึงผิวในชั้นของน้ำ ในขณะที่จะพบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลีเมอริกซึ่งเกาะติดอยู่กับเซลล์แทนยีสต์ *Yarrowia lipopylica* NCIM 3589 ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเลผลิตสารที่มีความสามารถในการผลิตอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี alkanes และน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสารที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ประกอบด้วยไขมัน คาร์โบไฮเดรทและโปรตีน และสารประกอบนี้ติดอยู่กับผนังเซลล์ของยีสต์ (Zinjarde and Pant, 2002)

ภาพที่ 1 ความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ของ supernatant และเซลล์ของเชื้อ *Myroides* sp. SM1

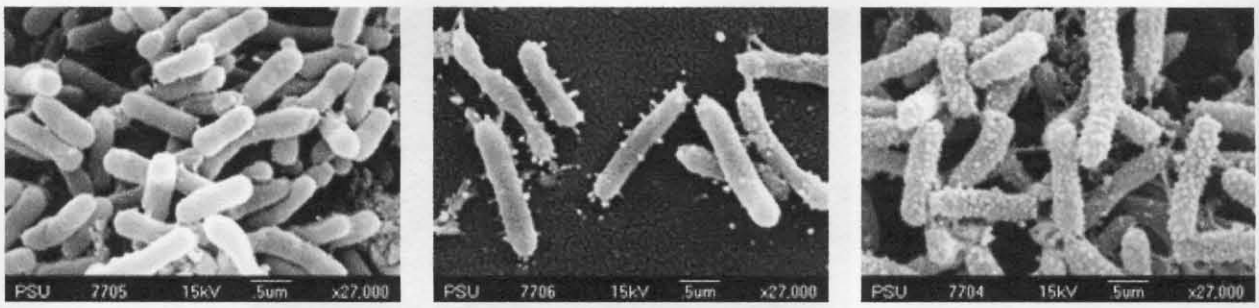
2. ศึกษาลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อ *Myroides* sp. SM1

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน Marine broth ที่เติม WCO ร้อยละ 1 แล้วเก็บตัวอย่าง culture broth มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะขนาดอนุภาคของ WCO และการเกาะติดของเซลล์กับ WCO ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าอนุภาคของ ~~WCO~~ จะมีเซลล์ของ *Myroides* sp. SM1 มาล้อมรอบและเมื่อเวลาผ่านไปขนาดอนุภาคของ WCO จะมีขนาดเล็กลง (ภาพที่ 2) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากเชื้อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาเพื่ออิมัลซิไฟด์ WCO ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในข้อ 1 เพราะจากการเลี้ยงเชื้อพบว่า WCO จะถูกอิมัลซิไฟด์ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง Southam และคณะ (2001) พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้ไฮโดรคาร์บอนในอาหารที่มี waste engine oil เป็นแหล่งพลังงาน แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าอนุภาคของน้ำมันมีขนาดเล็กลง เนื่องจากเกิดการอิมัลซิไฟด์ของน้ำมัน ยีสต์ *Yarrowia lipopylica* NCIM 3589 ซึ่งแยกได้จากน้ำทะเลผลิตสารที่มีความสามารถในการผลิตอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี alkanes และน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเซลล์จะเกาะติดกับอนุภาคของ alkane และน้ำมันดิบ (Zinjarde and Pant, 2002)



ภาพที่ 2 ขนาดอนุภาคของ WCO ที่ระยะเวลาต่างๆ และการเกาะติดของเซลล์ *Myroides* sp. SM1 กับอนุภาคของ WCO ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

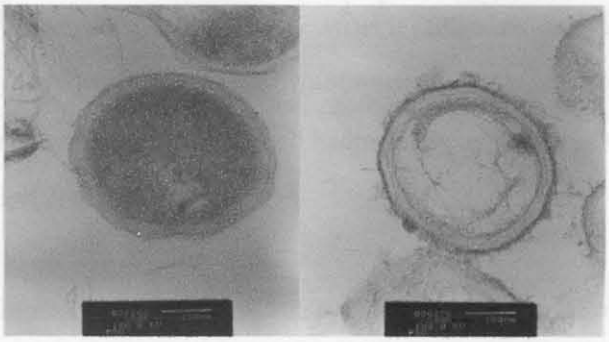
เมื่อศึกษาลักษณะของผนังเซลล์ของเชื้อโดยใช้ scanning electron microscope เปรียบเทียบลักษณะผนังเซลล์ของเชื้อที่เลี้ยงใน marine broth, ใน marine broth ที่เติม WCO และ resting cell จากข้อ 1 พบว่า *Myroides* sp. SM1 ที่เลี้ยงใน marine broth ผนังเซลล์จะมีลักษณะเรียบ ในขณะที่การเลี้ยงใน marine broth ที่มีการเติม WCO และ resting cell จะมีผนังเซลล์ขรุขระ โดยเฉพาะใน resting cell ผนังเซลล์จะมีลักษณะขรุขระมากกว่า marine broth ที่เติม WCO (ภาพที่ 3) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากในชุดการทดลอง resting cell ไม่มีสารอาหารอื่นยกเว้น WCO เชื้อจึงต้องมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวขึ้นมาเพื่ออิมัลซิไฟด์ WCO และนำ WCO ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการการทดลองของ Käppeli และคณะ (1984) ที่ศึกษาโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ *Candida tropicalis* ATCC 32113 ต่อการนำไฮโดรคาร์บอนเข้าไปภายในเซลล์ พบว่าเมื่อเลี้ยง *C. tropicalis* ATCC 32113 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน ผนังเซลล์ยีสต์จะมีลักษณะ hair-like structure แต่จะไม่พบผนังเซลล์ดังกล่าวในเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน hair-like structure มีส่วนเกี่ยวข้องในการใช้ไฮโดรคาร์บอนของเซลล์ยีสต์และมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนเนื่องจากผนังเซลล์ยีสต์สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอส นอกจากนี้ Southam และคณะ (2001) พบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้ไฮโดรคาร์บอนในอาหารที่มี waste engine oil เป็นแหล่งพลังงาน แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าอนุภาคของน้ำมันมีขนาดเล็กลงเนื่องจากเกิดการอิมัลซิไฟด์ของน้ำมัน และเมื่อตรวจดูด้วย transmission electron microscope พบว่าเซลล์สร้าง amphipathic interface ซึ่งมีความหนาประมาณ 25-50 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันที่เกิดการอิมัลซิไฟด์จะถูก encapsulate ไว้ภายในเซลล์



Marine broth | Marine broth with WCO | Resting cell with WCO

ภาพที่ 3 ลักษณะของผนังเซลล์ *Myroides* sp. SM1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะต่างๆ และส่องดูด้วย scaning electron microscope กำลังขยาย 27,000 เท่า

การตรวจดูการสะสมไฮโดรคาร์บอนไว้ภายในเซลล์โดยใช้ transmission electron microspore ของเชื้อที่เลี้ยงใน marine broth, ใน marine broth ที่เติม WCO และ resting cell จากข้อ 1 เนื่องจากการที่เซลล์สามารถเกาะติดกับ WCO ได้จึงมีความเป็นไปได้ในการที่เซลล์จะมีการสะสมไฮโดรคาร์บอนไว้ภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงานสะสม โดยจะเก็บไว้ในรูป inclusion body แต่จากการทดลองพบว่า เชื้อ *Myroides* sp. SM1 โดรคาร์บอนไว้ภายในเซลล์ในรูป inclusion body อย่างไรก็ตามเซลล์เมมเบรนของเชื้อมีลักษณะหนาขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่ได้มีการเติม WCO ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับการที่เซลล์มีลักษณะขรุขระมากขึ้นเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมี WCO ในภาพที่ 3 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Käppeli และคณะ (1984) ที่ศึกษาโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ *Candida tropicalis* ATCC 32113 ต่อการนำไฮโดรคาร์บอนเข้าไปภายในเซลล์ พบว่าเมื่อเลี้ยง *C. tropicalis* ATCC 32113 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน ผนังเซลล์ยีสต์จะมีลักษณะ hair-like structure แต่จะไม่พบผนังเซลล์ดังกล่าวในเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปกติการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำเชื้อมักจะมีการสะสมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไว้ภายในเซลล์ในรูป inclusion body เช่น *Fusarium solani* จะมีการนำ benzo[a]pyrene เข้าไปเก็บสะสมไว้ใน lipid vesicle อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนของ lipid vesicle ในกระบวนการย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbon (Verdin *et al.*, 2005) หรือ *n*-hexdecane จะถูกเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ของ *Streptomyces* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี *n*-hexadecane เป็นแหล่งคาร์บอน (Radwan *et al.*, 1998) *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 จะสะสมไฮโดรคาร์บอนไว้ในเซลล์โดยอยู่ในรูป inclusion body เพื่อใช้ไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน ในขณะที่ถ้าเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารที่ละลายน้ำได้เช่นยีสต์สกัด (yeast extract) จะไม่มี inclusion body ภายในเซลล์ (Marín *et al.*, 1995)



Marine broth without WCO Marine broth with WCO

ภาพที่ 4 ลักษณะของผนังเซลล์ *Myroides* sp. SM1 เมื่อเลี้ยงใน Marine broth ที่มีการเติมและไม่มีการเติม WCO และส่องดูด้วย transmission electron microscope

3. ศึกษาค่า Cell hydrophobicity

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน marine broth 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) สองครั้ง แล้วซัสเพนเซลล์ที่ได้ในบัฟเฟอร์เดิมโดยเซลล์แขวนลอยควรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5 แล้วปิเปตสารละลายเซลล์ 3 มิลลิลิตรผสมรวมกับไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แยกส่วนไฮโดรคาร์บอนออกไป วัดการดูดกลืนแสงของส่วนสารละลายเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่า cell hydrophobicity พบว่า *Myroides* sp. SM1 มีค่า cell hydrophobicity สูงสุดคือ 48.40% ต่อโทลูอีน (toluene) ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งการมีค่า cell hydrophobicity สูงต่อไฮโดรคาร์บอนชนิดใดแสดงว่าเซลล์นั้นสามารถเกาะติด (attach) กับไฮโดรคาร์บอนชนิดนั้นได้ดีและอาจจะมีผลให้ความสามารถในการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพิ่มขึ้น เช่น เซลล์ของยีสต์ *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 จะมีค่า cell hydrophobicity เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ (Zinjarde and Pant, 2002) Hua และคณะ (2003) เลี้ยง *Candida antarctica* T-34 โดยใช้ *n*-undecane เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมานอกเซลล์และเชื้อยีสต์มีค่า cell hydrophobicity ต่อ kerosene สูงที่สุดเมื่อใช้ *n*-undecane *n*-hexadecane น้ำมันถั่วเหลืองและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ นอกจากนี้การเติมสารลดแรงตึงผิวที่ได้ลงในสารละลายเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า สารลดแรงตึงผิวจะช่วยเพิ่มค่า cell hydrophobicity ของเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามความสามารถในการเพิ่มค่า cell hydrophobicity ของเซลล์นั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย เช่น เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* และ *Rhodococcus* ในอาหารที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเฉพาะ

Alcaligenes เท่านั้นที่มีค่า cell hydrophobicity เพิ่มขึ้น (Pini *et al.*, 2007) นอกจากนี้ค่า cell hydrophobicity ยังขึ้นกับชนิดของไฮโดรคาร์บอนและอุณหภูมิ (El-Sayed *et al.*, 1996; Meylheuc *et al.*, 2001) *Gordonia alkanivorans* CC-JG39 มีค่า cell hydrophobicity ต่อ kerosene และ diesel เท่ากับ 88% และ 93% ตามลำดับ (Lin *et al.*, 2005)

ตารางที่ 1 ค่า Cell hydrophobicity ของ *Myroides* sp. SM1 ที่เลี้ยงใน marine broth ต่อไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ

ไฮโดรคาร์บอน	Cell hydrophobicity (%)
Toluene	48.40
Xylene	28.07
Kerosene	17.42
Tridecane	17.13
Hexadecane	14.62
Tetradecane	14.62
Paraffin	5.23
Mineral oil (light)	3.78
Octadecane	0.10
Mineral oil (heavy)	0

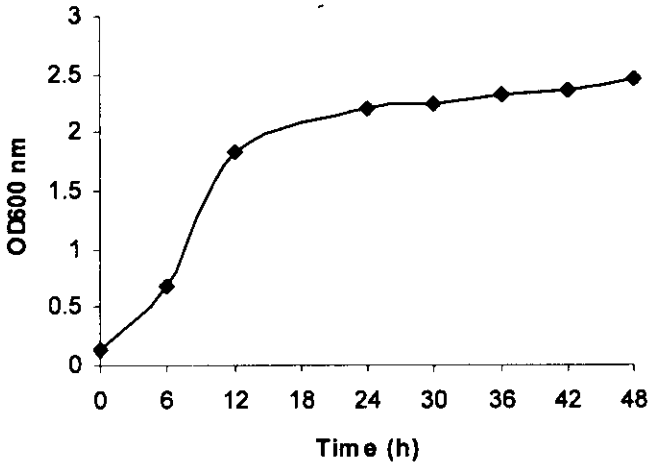
4. ศึกษาความสามารถในการใช้ไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Myroides* sp. SM1

เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน seawater medium ที่เติมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ร้อยละ 1 คือ *n*-tridecane, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane, *n*-octadecane, toluene, xylene, kerosene, paraffin, mineral oil (light type) และ mineral oil (heavy type) แล้ววัดการเจริญของเชื้อโดยวิเคราะห์ค่า total cell protein พบว่า *Myroides* sp. SM1 ไม่สามารถใช้ไฮโดรคาร์บอนได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบค่า cell hydrophobicity ของเซลล์ที่เลี้ยงใน marine broth และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีไฮโดรคาร์บอนได้ จากการทดลองในข้อข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใช้แหล่งคาร์บอนจาก marine broth ซึ่งมี peptone และ yeast extract เป็นองค์ประกอบในการสร้างสารลดแรงตึงผิวจึงสามารถอิมัลซิไฟด์ WCO ได้ ดังนั้นในการทดลองในข้อต่อๆ ไปจึงเลี้ยงเชื้อใน marine broth ตลอดการทดลอง แม้ว่า

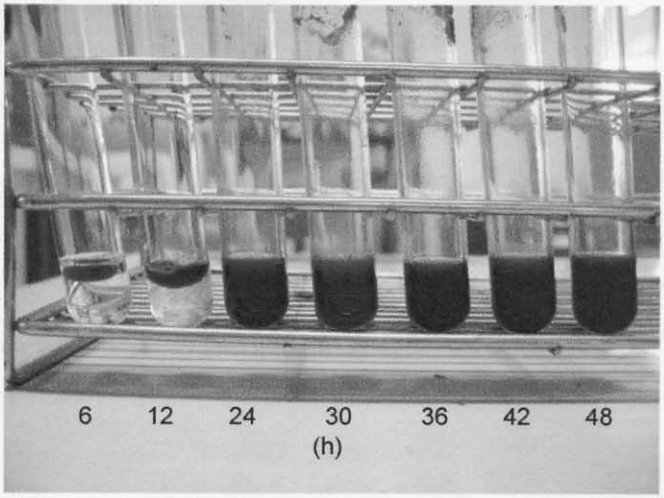
Myroides sp. SM1 จะมีค่า cell hydrophobicity สูงต่อ WCO โทลูอีนและไซลีน แต่ค่านี้ไม่ได้บ่งบอกว่าเชื้อสายพันธุ์นั้นๆ จะสามารถใช้ไฮโดรคาร์บอนนั้นๆ เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Zinjarde and Pant, 2002)

5. ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์

เลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ใน marine broth แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เพื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และตรวจสอบการอิมัลไฟด์ของตัวเซลล์พบว่า เชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 5) และการอิมัลซิไฟด์ของตัวเซลล์เริ่มเกิดขึ้นที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 6) อย่างไรก็ตามความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ไม่มีความแตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12-48 จึงเลือกใช้เซลล์ที่การเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไปเพราะมีจำนวนเซลล์มากที่สุดและไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตั้งแต่ช่วงเวลา 30-48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ของเชื้อ *Myroides* sp. SM1 มีความสัมพันธ์กับการเจริญหรือจำนวนของเชื้อ (growth associate) การผลิตสารลดแรงตึงผิวในรูปแบบที่สัมพันธ์กับการเจริญนั้นจะขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เช่นกัน เช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดไลโปเปปไทด์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* A8-8 เชื้อจะผลิตสารออกมาในช่วง exponential และการผลิตสูงสุดในระยะ stationary (Lee *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามในบางกรณีเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานานขึ้นจะเกิดการย่อยสลายสารลดแรงตึงผิวโดยเฉพาะเมื่อสารอาหารหมดลง (Lin *et al.*, 1998; Batista *et al.*, 2006)



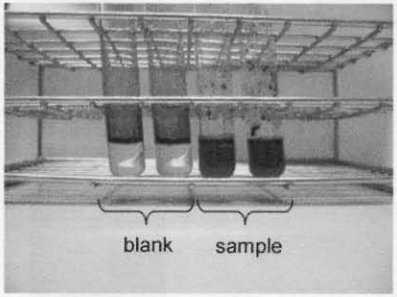
ภาพที่ 5 กราฟการเจริญของเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ในอาหาร marine broth ที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 6 การอิมัลซิไฟด์ WCO ของเซลล์ที่ได้จากระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ในอาหาร marine broth

6. ศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์

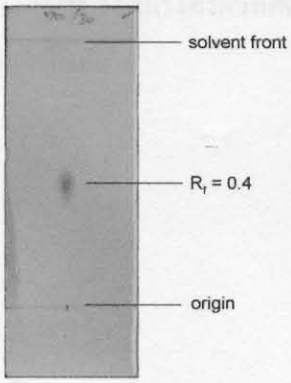
นำสารละลายเซลล์ที่เตรียมได้มาสกัดด้วยวิธีการต่างๆ คือ การสกัดในสภาวะที่เป็นกรดด้วย ethyl acetate, การสกัดด้วยอัลตร้าโซนิกโดยใช้ส่วนผสมของเมธานอล dichloromethane และการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เมธานอลในอัตราส่วน 1:1 พบว่า มีเฉพาะวิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เมธานอลในอัตราส่วน 1:1 เท่านั้นที่สามารถสกัดสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ออกมาได้ เพราะสารสกัดมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO (ภาพที่ 7) ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีนี้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์เพื่อใช้ในการทำบริสุทธิ์ในต่อไป โดยวิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เมธานอลจะได้สารสกัด 264 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งวิธีการที่จะใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นโดยปกติอาจจะใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม/เมธานอล หรือ ไดคลอโรมีเธน/เมธานอลห หรือเอธิลอะซีเตท หรือเตตระไฮโดรฟูแรน (Morikawa *et al.*, 1992; Yakimov *et al.*, 1995; Mercadé *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตาม การที่จะเลือกใช้ตัวทำละลายอะไรนั้นจะขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์นั้นๆ ผลิตด้วย



ภาพที่ 7 การอิมัลซิไฟด์ WCO ของสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เมธานอลใน อัตราส่วน 1:1

7. ศึกษาการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์ที่สกัดได้

จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้ normal phase silica gel column chromatography ซึ่งใช้ตัวอย่าง 260 มิลลิกรัม พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาจากคอลัมน์ที่การชะด้วยคลอโรฟอร์มและเมธานอลใน อัตราส่วน 70/20 และ 60/30 โดยมีน้ำหนัก 60.6 มิลลิกรัม หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์ต่อด้วย reverse phase silica gel column chromatography พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาจากคอลัมน์โดยการชะด้วย เมธานอล โดยมีน้ำหนัก 12 มิลลิกรัม และเมื่อทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย thin layer chromatography พบว่าเป็นสารที่มีเพียง spot เดียวและให้ผลบวกกับ ninhydrin แสดงว่าในองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีหมู่อะมิโนอิสระอยู่ด้วย (Wilkinson *el al.*, 1982) โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.4 เมื่อใช้คลอโรฟอร์มและเมธานอลในอัตราส่วน 70/30 เป็น mobile phase (ภาพที่ 8) นอกจากนี้ spot ดังกล่าวยังให้ผลบวกกับ 2,7-dichlorofluoresceine แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (Schulz *et al.*, 1991)



ภาพที่ 8 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้บน Thin layer chromatography โดย mobile phase คือ คลอโรฟอร์มและเมธานอลในอัตราส่วน 70/30 และใช้ spraying reagent คือ ninhydrin

8. ศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวที่ผ่านทำบริสุทธิ์

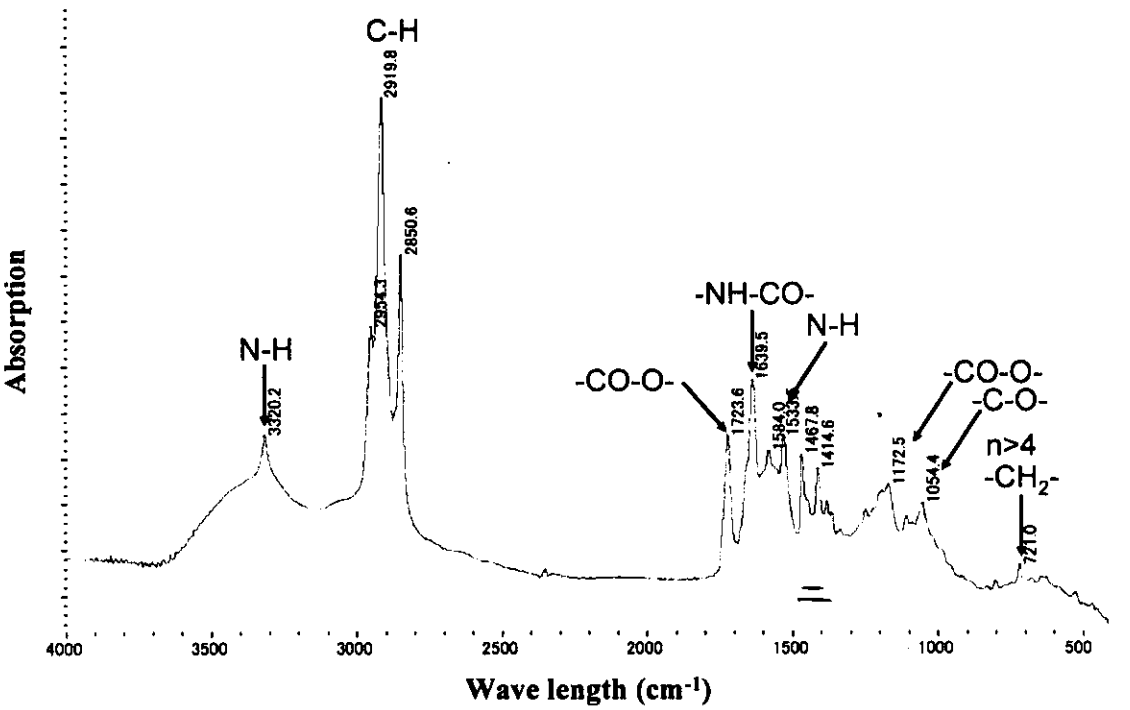
8.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยใช้ Thin-layer chromatograph

จากการใช้ thin layer chromatography พบว่า สารลดแรงตึงผิวที่ทำบริสุทธิ์ได้นั้นดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร แสดงว่าในองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวไม่มีสารที่เป็น aromatic ring นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวที่ได้ให้ผลบวกกับ ninhydrin แสดงว่าในองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีหมู่อะมิโนอิสระอยู่ด้วย (Wilkinson *et al.*, 1982) โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.4 เมื่อใช้คลอโรฟอร์มและเมธานอลในอัตราส่วน 70/30 เป็น mobile phase (ภาพที่ 8) นอกจากนี้ spot ดังกล่าวยังให้ผลบวกกับ 2,7-dichlorofluoresceine แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (Schulz *et al.*, 1991)

8.2 วิเคราะห์องค์ประกอบด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยใช้ FT-IR พบว่า มีการดูดกลืนแสงที่ช่วง 3320 cm^{-1} และ 1584 cm^{-1} บ่งบอกถึงการมีหมู่อะมิโนอิสระ การดูดกลืนแสงที่ 1640 cm^{-1} บ่งบอกถึง amide bond การดูดกลืนแสงที่ 1724 cm^{-1} และ 1173 cm^{-1} บ่งบอกถึงการมีอยู่ของพันธะเอสเธอร์ การดูดกลืนแสงที่ 2920 cm^{-1} และ 2851 cm^{-1} บ่งบอกถึงการมี alkyl chains และการดูดกลืนแสงที่ 721 cm^{-1} บ่งบอกถึงการมีอยู่ของ methylene groups ที่มากกว่า C_4H_8 (ภาพที่ 9) ซึ่งจากผล

ของ TLC และ FT-IR สามารถสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ของเชื้อ *Myroides* sp. SM1 น่าจะอยู่ในกลุ่มของ lipopeptide biosurfactant

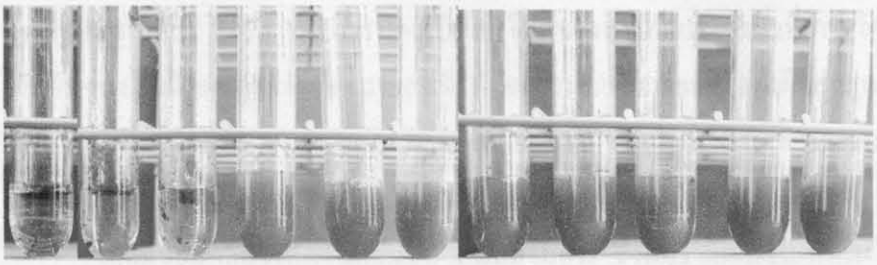


ภาพที่ 9 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำบริสุทธิ์ได้ด้วย FT-IR

9. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับเซลล์ที่สกัดได้

9.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

ผลของพีเอชต่อการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ที่สกัดได้ต่อ WCO แสดงภาพที่ 10 สารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ที่สกัดได้จะเกิดการตกตะกอนเมื่อพีเอชต่ำกว่า 5 แต่กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์ WCO ไม่มีความแตกต่างกันที่พีเอชในช่วง 5-12 ซึ่งจากการที่สารลดแรงตึงผิวที่ได้มีองค์ประกอบคือเปปไทด์หรือโปรตีนและไขมันนั้น ที่พีเอชที่ใกล้กับหรือเป็น isoelectric point นั้น ประจุของโปรตีนจะเป็นศูนย์และทำให้สารประกอบนั้นเกิดการตกตะกอน (Milewski, 2001) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ surfactin ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. strain KP-2 ที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวในช่วงพีเอช 6-10 (Roongsawang *et al.*, 1999)



ภาพที่ 10 ผลของพีเอชต่อการอิมัลซิไฟด์ WCO ของสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ที่สกัดได้

9.2 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองตั้งแต่ 30-121 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์ WCO ของสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ที่สกัดได้ (ภาพที่ 11) โดยปกติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีความสามารถในการทำงานหรือมีกิจกรรมในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง เช่น การทดลองของ Horowitz และคณะ (1990) พบว่า สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* 86 ยังคงมีกิจกรรมในช่วงอุณหภูมิ 25-120 องศาเซลเซียส นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* ยังคงมีกิจกรรมหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และการเก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน (Nitschke and Pastore, 2006)

ภาพที่ 11 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ที่สกัดได้

9.3 ผลของเกลือต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

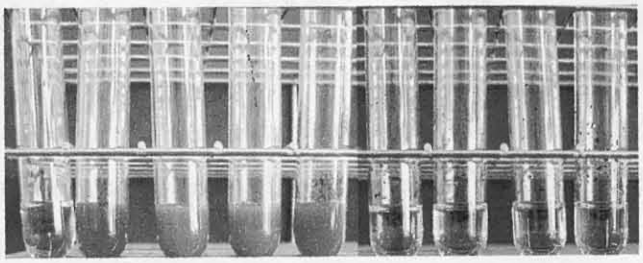
สารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ *Myroides* sp. SM1 ที่สกัดได้มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ในระบบที่มีโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0.51-1.54 โมลาร์ และเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอ

ฝ่ายหอสมุด
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไรด์สูงกว่า 1.54 โมลาร์กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้จะหมดไป โดยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวสูงสุดคือ 1.02-1.54 โมลาร์ นอกจากนี้ถึงแม้ว่าเชื้อ *Myroides* sp. SM1 จะแยกมาได้จากน้ำทะเล แต่สารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ก็ยังคงมีกิจกรรมในระบบที่แม้จะไม่มีโซเดียมคลอไรด์ (ภาพที่ 12a)

แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับใน Marine broth ยับยั้งกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวในการอิมัลซิไฟด์ WCO (ภาพที่ 12b) แมกนีเซียมคลอไรด์ซึ่งเป็นเกลือหลักอีกชนิดหนึ่งในน้ำทะเลไม่ยับยั้งการทำงานของสารลดแรงตึงผิวแม้ว่าจะมีความเข้มข้นสูงถึง 0.1 โมลาร์ นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ยังส่งเสริมการทำงานของสารลดแรงตึงผิวอีกด้วย (ภาพที่ 12c) โซเดียมคลอไรด์ทำให้กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวสูงขึ้นในจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลหรือถังเก็บปิโตรเลียม (Yakinov *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้ก็ยังคงมีกิจกรรมในระบบที่แม้จะไม่มีโซเดียมคลอไรด์ เกลือแคลเซียมและแมกนีเซียมเป็นเกลือหลักอย่างหนึ่งในน้ำทะเล ซึ่งแคลเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออนมักจะทำให้กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวลดลงโดยจะไปทำให้อิมัลชั่นของน้ำมันในน้ำแตกออก (Kim *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจาก *Bacillis licheniformis* JF-2 ยังคงมีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์แม้ว่าจะมีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงถึง 25 กรัม/ลิตร (McInerney *et al.*, 1900)

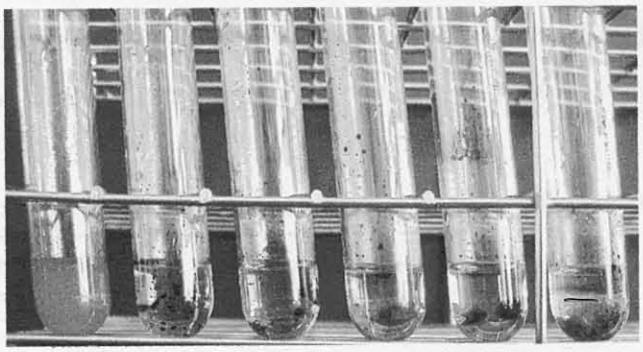
(a)



Blank 0 0.51 1.02 1.54 2.05 2.57 3.08 3.59

NaCl (M)

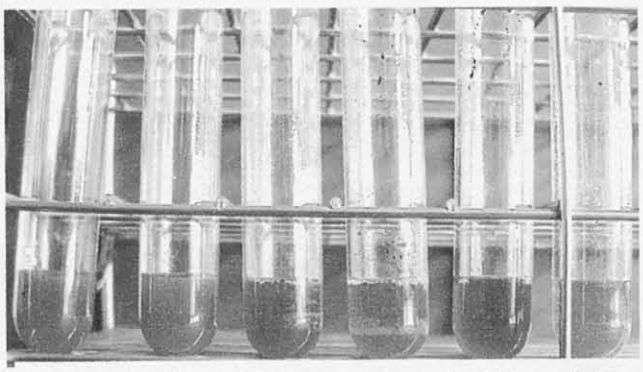
(b)



0 4 8 12 16 18

$CaCl_2$ (mM)

(c)



0 0.02 0.04 0.06 0.08 0.10

$MgCl_2$ (M)

ภาพที่ 12 ผลของโซเดียมคลอไรด์ (โมลาร์) (a), แคลเซียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์) (b) และแมกนีเซียมคลอไรด์ (โมลาร์) (c) ต่อการอิมัลซิไฟด์ WCO ของสารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ที่สกัดได้

9.4 ศึกษาความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

สารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ที่สกัดได้มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์โทลูอีนได้สูงที่สุด คือ 85.25% ซึ่งจากผลการทดลองสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้มีแนวโน้มในการอิมัลซิไฟด์ aromatic hydrocarbon ได้ดีกว่า aliphatic hydrocarbon และสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้มีความจำเพาะกับ aliphatic hydrocarbon สายยาวมากกว่าสายสั้น (ตารางที่ 2) ความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวจะขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของสารลดแรงตึงผิว ชนิดของไฮโดรคาร์บอน alasan เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด polymeric ซึ่งผลิตโดย *Acinetobacter radioresistens* มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด โดยสามารถอิมัลซิไฟด์ *n*-alkane ที่มีความยาวตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไป, อิมัลซิไฟด์ alkyl aromatic, อิมัลซิไฟด์พาราฟินเหลว, อิมัลซิไฟด์น้ำมันดิบ น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง (Navon-Venezia *et al.*, 1995) ไบโออิมัลซิไฟด์เออร์ที่ผลิตได้จาก *Penicillium* sp. มีกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์สูงกับ kerosene, diesel และ xylene (Luna-Velasco *et al.*, 2007)

ตารางที่ 2 ความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

ไฮโดรคาร์บอน	Emulsification (%)
Toluene	85.25
Xylene	80.48
Kerosene	78.39
Octadecane	76.18
Hexadecane	75.86
Tetradecane	70.21
Tridecane	65.38
Mineral oil (light)	50.94
Paraffin	48.63
Mineral oil (heavy)	42.56

สรุปผลการทดลอง

สารลดแรงตึงผิวที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ weathered crude oil ของเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ติดอยู่กับตัวเซลล์ อย่างไรก็ตาม *Myroides* sp. SM1 ไม่สามารถใช้ weathered crude oil และไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ เป็นแหล่งคาร์บอนได้ คลอโรฟอร์มและเมธานอลในอัตราส่วน 1:1 เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารลดแรงตึงผิวจากตัวเซลล์ของ *Myroides* sp. SM1 สารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ประกอบด้วยเปปไทด์และไขมัน สารลดแรงตึงผิวที่ติดกับตัวเซลล์ที่สกัดได้มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มีกรดสูงและมีเกลือเข้มข้นสูงมีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวที่ได้มีกิจกรรมที่สูงกับ aromatic hydrocarbon มากกว่า aliphatic hydrocarbon