รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนงบประมาณแผ่นดิน
ปี พ.ศ.2539

เรื่อง
การผลิตสาร Biosurfactant โดย *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2.2

โดย
ผศ.จิราภรณ์ ธนียวัน
ภาควิชาจุลชีววิทยา

เสนอต่อ
ฝ่ายวิจัยคณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จฬ
วพ 15
010460

รายงานวิจัยโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2539

"การผลิตสาร Biosurfactant โดย Bacillus *licheniformis* สายพันธุ์ F2.2"

ชื่อผู้วิจัย

น.ส.บงกช สุทธิวานิชกุล

น.ส.วิบูลลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์

ผศ.จิราภรณ์ ธนียวัน

ที่ปรึกษาโครงการ

ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน

ผศ.ดร.อมร เพชรสม

อ.ดร.เพียรพรรค ทัศคร

รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

- 5 พ.ย. 2546

I 20141497

บทคัดย่อ

การทดลองผลิตสารไบโอเซอร์แฟกแตนท์โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* F2.2 ซึ่งแยกได้มาจากอาหารหมักดอง สารที่ผลิตได้จึงเชื่อว่ามีความปลอดภัยต่อการใช้งาน ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จากการทำวิจัยพบว่าสามารถผลิตสารไบโอเซอร์แฟกแตนท์ (BS) ที่ให้คุณสมบัติในการลดค่า Surface tension activity ได้ต่ำสุดถึง 27-29 mN/m ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Defined medium ที่ประกอบด้วย glucose 2% เป็นแหล่งคาร์บอน และ NH_4NO_3 0.4% เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทดสอบเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอื่น ๆ โดยการควบคุม pH8 ที่เวลา 12-24 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ผลดีทั้งที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C และมีค่า Emulsification index (E_{24}) สูงสุดคือ 71 จากการศึกษาวัดค่า Oil displacement test ของ BS ที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมภาวะให้เหมาะสม พบว่าพื้นที่วงใสจากการทดสอบจะมีค่ากว้างสูงสุดและคงที่ตลอดไปตั้งแต่ เวลา 24-72 ชั่วโมง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสาร BS ที่ผลิตได้จะมีปริมาณความเข้มข้นสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป นอกจากนี้การทดลองครั้งนี้ยังสามารถเตรียมสาร BS กึ่งบริสุทธิ์ได้โดยการแยกสารด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วทดสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ด้วย HPLC และพบว่าสารที่แยกได้นี้เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 5,000 คาลตัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

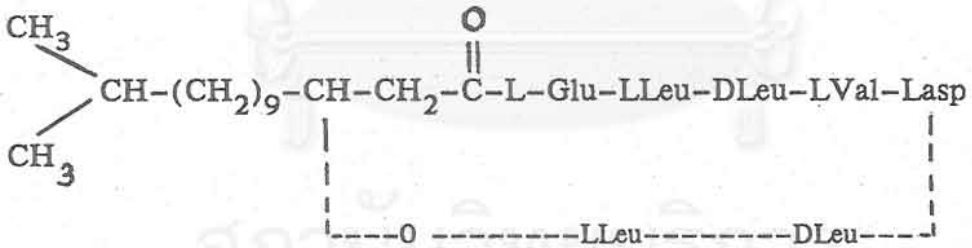
เลขหมู่ วศ
ว๓๑๕
เลขทะเบียน ๐๑๐๔๖๐
วัน.เดือน.ปี ๒๖ ก.ค. ๔๔

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสำคัญและที่มาของการทำวิจัย

Biosurfactant หมายถึง สารลดแรงตึงผิว (surface-active substance) ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจากจุลินทรีย์ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต biosurfactant ได้ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิด biosurfactant มีด้วยกันหลายชนิด แตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิต โดยทั่วไปพบว่า biosurfactant มีโครงสร้างที่เรียกว่า amphiphatic structure ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น hydrophobic และส่วนที่เป็น hydrophilic เราสามารถแบ่ง biosurfactant ตามลักษณะโครงสร้างเท่าที่พบในปัจจุบันออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ 1.) Glycolipid 2.) Phospholipid หรือ Fatty acid 3.) Lipopeptide หรือ Lipoprotein 4.) Polymeric 5.) ชนิดอื่น ๆ (ตารางที่ 1.) (Falbe, 1987)

Biosurfactant ชนิดที่รู้จักกันดีคือชนิดที่เรียกว่า Surfactin ซึ่งผลิตมาจาก *Bacillus subtilis* เป็น biosurfactant ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดอันหนึ่ง สามารถที่จะลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่น 72 mN/m ไปเป็น 27.0 mN/m นอกจากนี้ยังพบว่า surfactin ยังสามารถที่จะยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ด้วย (Antibiotic activity) surfactin มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย lipid และ peptide หรือ aminoacid ชนิด L,D-amino acid 7 ชนิด ดังโครงสร้างในรูป (Kluge และคณะ, 1988) (Morikawa และคณะ, 1993)



โครงสร้างของ surfactin

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจุบัน Biosurfactant ได้ทวีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้น (Fiechter, 1992 และ Kosaric, 1993) และเข้ามามีส่วนแบ่งในตลาดของ surfactant ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องมาจากปัจจัยหลายอย่างเช่น biosurfactant มีสูตรโครงสร้างต่าง ๆ กัน และมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทำให้ประยุกต์ใช้กับงานต่าง ๆ ได้กว้างขวาง ตัวอย่างเช่น สามารถนำไปใช้เป็น emulsifier, wetting, foaming, solubilizer และ viscosity-reduction เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่า biosurfactant สามารถเข้าไปแทนที่ synthetic surfactant ได้อย่างแพร่หลาย ทั้งในด้านการเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยา กระดาษ เส้นใย และเครื่องสำอางค์ นอกเหนือไปจากการใช้เพื่อกำจัดน้ำมันที่ก่อให้เกิดมลภาวะตามบริเวณชายฝั่งทะเลและมหาสมุทรที่เป็นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์สนใจเป็นอย่างมาก การผลิต biosurfactant นั้นมีข้อได้เปรียบว่าการสังเคราะห์ surfactant ด้วยวิธีทางเคมีหลายประการ เช่น เราสามารถพัฒนาขบวนการผลิตให้มีกรรมวิธีหรือเทคโนโลยีที่ทันสมัย ตลอดจนสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ เช่น อาจจะใช้อาหารจากแหล่งธรรมชาติอื่น ๆ และสามารถจะปรับปรุงสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ที่สำคัญ biosurfactant ยังสามารถย่อยสลายได้โดยขบวนการธรรมชาติ (biodegradable) และไม่เป็นพิษอีกด้วย

Biosurfactant ที่ใช้ในการกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนตามบริเวณชายฝั่งทะเลหรือมหาสมุทร หรือใช้ทำความสะอาดคราบน้ำมันในถังเก็บน้ำมัน ท่อน้ำมัน นั้นเรารู้จักกันในนามทางการค้าว่า Emulsan ซึ่งเป็น biosurfactant ที่ผลิตได้มาจาก *Acinetobacter* sp. ส่วน Sophorolipid ที่ผลิตได้มาจาก *Torulopsis bombicola* ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เครื่องสำอางค์ผสมในแชมพูและครีมทาผิว นอกจากนี้ biosurfactant ยังสามารถประยุกต์ใช้สำหรับวัตถุประสงค์อื่น ๆ อีกดังแสดงตารางที่ 2 (Falbe, 1987)

ผู้วิจัยสามารถคัดแยกเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2.2 ที่สามารถผลิต biosurfactant ได้ ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญ 2 ประการคือเป็นสารที่สามารถลดแรงตึงผิวสามารถดูดซับสารประกอบ hydrocarbon ได้ และพบว่ายังสามารถที่จะยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย ยีสต์และราได้ จึงคิดว่าน่าจะมีการทำวิจัยถึงการผลิตสาร biosurfactant ที่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในแง่ที่เป็น surfactant ที่มีคุณสมบัติเป็น antibiotics ได้พร้อมกันและโดยจากการที่สาร biosurfactant ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ F2.2 ซึ่งคัดแยกจากอาหารหมักดอง จึงมีความปลอดภัยต่อการใช้งาน ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อแก้ปัญหาของสิ่งแวดล้อมเป็นพิษจากโรงงานอุตสาหกรรม และ

เพื่อให้มีสุขภาพอนามัยที่ดีขึ้น น่าจะมีการส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการใช้ biosurfactant แทน chemical surfactant กันให้มากขึ้นในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ทดสอบคุณสมบัติของสารที่ผลิตได้ ที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
2. ทดสอบคุณสมบัติการเป็น surfactant ของสาร
3. หาแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อ *B. lichenisformis* F2.2 เพื่อการผลิตสารจำนวนมาก
4. หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร
5. แยกสารที่ผลิตได้ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารที่ผลิตได้จาก *B. lichenisformis* F2.2 ทั้งในแง่ที่เป็น antimicrobial substant และ biosurfactant
2. ทราบองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตสาร biosurfactant จาก *B. lichenisformis* F2.2 เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารจำนวนมากต่อไป
3. สามารถเตรียมสารที่ผลิตได้ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE 1 Major Types of Biosurfactants Produced by Microorganisms

Biosurfactant type	Producing microbial species
A. Glycolipids	
Trehalose mycolates	*Rhodococcus erythropolis*
	Arthrobacter paraffineus
	Mycobacterium phlei
Trehalose esters	*Mycobacterium fortitum*
	Micromonospora spp.
	Mycobacterium smegmatis
	Mycobacterium paraffinicum
	Rhodococcus erythropolis
Mycolates of mono-, di-, and trisaccharide	*Corynebacterium diphtheriae*
	Mycobacterium smegmatis
	Arthrobacter spp.
Rhamnolipids	*Pseudomonas* spp.
Sophorolipids	*Torulopsis bombicola*
	Torulopsis petrophilum
	Torulopsis apicola
	Candida spp.
B. Phospholipids and Fatty Acids	
Phospholipids and fatty acids	*Candida* spp.
	Corynebacterium spp.
	Micrococcus spp.
	Acinetobacter spp.
Phospholipids	*Thiobacillus thiooxidans*
	Aspergillus spp.
C. Lipopeptides and Lipoproteins	
Gramicidens	*Bacillus brevis*
Polymyxins	*Bacillus polymyxa*
Ornithine–lipid	*Pseudomonas rubescens*
	Thiobacillus thiooxidans
Cerilipin	*Gluconobacter cerinus*
Lysin–lipid	*Agrobacterium tumefaciens*
	Streptomyces sioyaensis
Surfactin, subtilysin	*Bacillus subtilis*
Peptide–lipid	*Bacillus licheniformis*
D. Polymeric Surfactants	
Lipoheteropolysaccharide	*Arthrobacter calcoaceticus RAG-1*
Heteropolysaccharide	*A. calcoaceticus* A2
Polysaccharide–protein	*A. calcoaceticus* strains
	Candida lipolytica
Manno–protein	*S. cerevisiae*
Carbohydrate–protein	*Candida petrophilum*
	Endomycopsis lipolytica
Mannan–lipid complex	*Candida tropicalis*
Mannose/erythrose–lipid	*Shizonella melanogramma*
	Ustilago maydis
Carbohydrate–protein–lipid complex	*Pseudomonas* spp.
	Pseudomonas fluorescens
	Debaryomyces polymorphus
E. Particulate Biosurfactants	
Membrane vesicles	*Acinetobacter* sp. H01-N
Fimbriae	*A. calcoaceticus*
Whole cells	Variety of microbes

Table 2. Biosurfactants – technical application

Products	Microorganisms	Patents
Emulsan	*Arthrobacter sp.* ATCC 31012	Biotechnol. Aktienges., US 4276094 (1981)
Biosurfactant	*Corynebacterium hydrocarboclastus* NRRL-B-5631	Canadian Patents and Development Ltd., US 3997398 (1976)
Biosurfactant	*Arthrobacter, Bacillus, Corynebacterium, Nocardia, Pseudomonas*	Canadian Patents and Development Ltd., CA 1114759 (1981)
Biosurfactant	*Arthrobacter* RAG 1	Gutnik, D., Rosenberg, E., DE 2415897 (1974)
Lipopeptide	*Methylomonas clara* ATCC 31226	Hoechst AG, DE 3312166 (1984)
Biosurfactant	*Penicillium spiculisporum*	Inoue-Japax Research Inc., Jpn., Kokai 7837, 189 (1978)
Sophorose lipid	*Torulopsis bombicola*	Kao Soap Co., Ltd. DE 2834118 (1979), DE 2938383 (1980), Jpn. Kokai Tokkyo Koho 8192, 786 (1981), EP 0005004 (1983)
Glycolipids (trehalose lipids)	*Arthrobacter paraffineus* ATCC 15591 *Corynebacterium hydrocarbolastus* ATCC 15592	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., DE 1905472 (1970), US 3637461 (1972)
Fructose lipids	*Arthrobacter paraffineus* ATCC 15591 *Corynebacterium hydrocarboclastus* ATCC 21628	Kyowa Hakka Kogyo Co. Ltd., DE 2440942 (1975)
Spiculisporic acid	*Penicillium spiculisporum* ATCC 16071	Kobayashi, T., Tabuchi, T., US 3625826 (1971)
Biosurfactant	*Thiobacillus, Bacillus, Nocardia, Pseudomonas*	Phillips Petroleum Comp., US 2907389 (1959), US 3185216 (1965)
Emulsan	*Acinetobacter sp.* ATCC 31012	Petroleum Fermentation N. V., US 4311829 (1982) US 4311832 (1982)
Sophorose lipid	*Torulopsis magnoliae* *Torulopsis apicola*	Spencer, J.F.T., Tulloch, A.P., Gorin, P.A.J., US 3205150 (1965)
Surfactin	*Bacillus subtilis* ATCC 21331	Takeda Chemical Ind. Ltd., US 3687926 (1972)
Biosurfactant	*Candida*	VEB Petrol-chemisches Kombinat Schwedt, DD 139069 (1979)
Biosurfactant	*Candida, Pichia, Nocardia Mycobacterium, Pseudomonas*	Wintershall AG, DE 2410267 (1975), DE 2843685 (1980), DE 2911016 (1980)
Trehalose lipid	*Rhodococcus erythropolis* DSM 43215	Wintershall AG, DE 3248167 (1984)
Biosurfactant	*Corynebacterium salvinicum*	Zajic, J.E., Gerson, R.K.: US 4355109 (1982)

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองและเคมีภัณฑ์

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environment Incubator Shaker)

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) รุ่น J2-21

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/vis Spectrophotometer)

เครื่องระเหยแห้ง (Lyophilizer)

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

เครื่องวัด Surface tension (Tensiometer)

กระดาษกรอง (Millipore membrane) pore size 0.45 u และอุปกรณ์ทางจุลชีววิทยา

HPLC

1.2 เคมีภัณฑ์

แบคโต-เปปโตน (Bacto-Peptone)

แบคโต-ทริปโตน (Bacto-Tryptone)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)

กลูโคส (Glucose)

เอทานอล (Ethanol)

เมทานอล (Methanol)

อะซีโตไนไทร์ (Acetonitrile)

ไตรฟลูโอโรอะซิติก แอซิด (Trifluoroacetic acid)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide)

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade) จากบริษัท

ต่าง ๆ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 ชนิดของจุลินทรีย์

Bacillus licheniformis F2.2

1.4 ชนิดของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ใช้ทดสอบ

1. *Totulopsis glabrata*
2. *Saccharomyces cerevisiae*
3. *Candida albicans*
4. *Bacillus subtilis*
5. *Pseudomonas aeruginosa*
6. *Escherichia coli*
7. *Aspergillus niger*

1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ดูในภาคผนวก)

YEPD

LB

Defined medium

2. วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2.2

2.1.1 ศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา ชีวเคมี และสัณฐานวิทยา โดยศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ การเกิดปฏิกริยาทางชีวเคมีกับรีเอเจนต์ที่ใช้ทดสอบ การเจริญในสภาวะและที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตลอดจนศึกษาขนาดรูปร่างและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ผสมกับ tributyrin 0.5% และ gall powder 0.2% (tributyrin–agar plate) ป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24–48 ช.ม. สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี

2.1.3 การทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Antibiotic assay)

2.1.3.1 แบบ surface method

โดยนำเชื้อ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2.2 ที่เจริญใน YEPD หรือ LB–slant อายุ 24 ช.ม. มาขีดไขว้ลงบน YEPD–MB medium ที่มีเชื้อทดสอบกลุ่มต่าง ๆ เจริญอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48–72 ช.ม. ตรวจดูและวัดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ

2.1.3.2 แบบวิธี well test

โดยนำเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในอาหารเหลว (YEPD broth) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปทำปราศจากเชื้อโดยการฉีดผ่านกระดาษกรอง (Millipore Filter Membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

<u>การเตรียมเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ</u>

จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ใช้ Nutrient broth

จุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ ใช้ YM medium

จุลินทรีย์กลุ่มเชื้อรา ใช้ PDA medium

ทำการเลี้ยงในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ปริมาตร 50 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18–20 ช.ม. จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยการนับด้วย Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไม้พันสำลีจุ่มน้ำกลั่นที่มีเซลล์จุลินทรีย์เจือจางอยู่มา Swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งใช้ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 10 มม. เจาะลงบนวุ้นเพาะเชื้อจำนวน 3 หลุมต่อ 1 จาน เลี้ยงเชื้อโดยให้แต่ละหลุมห่างกันพอสมควร หยอด 100 ไมโครลิตร ของน้ำเลี้ยงเซลล์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ลงในแต่ละหลุมนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1–2 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

2.1.4 การทดสอบการสร้างสาร Biosurfactant บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (halo test)

โดยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD หรือ LB ที่ราดทับด้วยน้ำมันดิบ (crude oil) 20 ul ป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีที่สร้างสาร Biosurfactant หรือ BS เป็นเวลา 24–48 ช.ม.

2.2 การเปรียบเทียบค่า Surface activity ของ BS ที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหารทดสอบชนิดต่าง ๆ เตรียมหัวเชื้อ (starter) ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียง (YEPD–stant) ที่มีอายุ 24 ช.ม. ลงในอาหารเหลว Defined–medium ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C อัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 12–15 ช.ม. จนได้ความเข้มข้นของเชื้อเมื่อนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.7 จากนั้นถ่าย 4% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ

Defined medium, YEPD และ LB medium ปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C อัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 0 72 ช.ม.

วัดค่า Surface activity ของ BS ที่เชื้อสร้างได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง Tensiometer ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และติดตามการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด–ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต Biosurfactant (BS)

ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่าเตรียมหัวเชื้อและเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.2 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Defined–medium) สภาวะต่าง ๆ ที่ทำการศึกษา ได้แก่

2.3.1 ศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์

ทำการศึกษาหาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในขวดเขย่า โดยการแปรค่าระยะเวลาที่ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0–72 ช.ม.

2.3.2 ศึกษาความเป็นกรด–ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์

ทำการศึกษาความเป็นกรด–ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด Defined–medium ในขวดเขย่าโดยการแปรผันค่าความเป็นกรด–ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 6.5–9.0 (โดยแปรผันค่าทีละ 0.5)

2.3.3 ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์

2.3.3.1 ทำการศึกษาการเจริญและการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ชนิด Defined-medium หาชนิด และปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต โดยทำการแปรผันแหล่งของคาร์บอน เช่น กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และแป้ง ที่ความเข้มข้นชนิดละ 2% และแปรผันปริมาณของน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5%-2.5% เก็บตัวอย่างติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการลดแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัด Tensiometer และค่าอิมัลชั่น อินเด็กซ์ (emulsion index)

2.3.3.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต ทำการแปรผันแหล่งของไนโตรเจน 4 ชนิด ได้แก่ NH_4Cl, NH_4NO_3 , $(NH_4)_2 SO_4$ และ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้นชนิดละ 0.4% ในอาหารเลี้ยงเชื้อและวัดผลเช่นเดียวกับข้อ 2.3.3.1

2.4 การวัดค่า Oil displacement activity ของสาร BS นำ crude oil 15 ul หยดลงบนพื้นผิวน้ำกลั่น 40 ml (เตรียมในจานที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 150 mm.) จากนั้นจึงหยด 10 ul ของสาร BS ที่ผลิตได้เมื่อควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ตามข้อ 2.3 ตั้งเวลา 12-72 ชั่วโมง ลงตรงกลางจานจะเกิดวงใสขึ้น ซึ่งมาสามารถวัดพื้นที่ของวงใสได้โดยใช้สูตร วิธีนี้จะใช้ได้กับสารที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 10 ug หรือ 10 nml ขึ้นไป (Morikawa และคณะ, 1993)

*หมายเหตุ วิธีการวัดค่า ST (1:100), E_{24} และ Oil displacement test โปรดดูในภาคผนวก

2.5 การเตรียมสาร BS กึ่งบริสุทธิ์ (Jiraporn และคณะ, 1992)

เนื่องจากสารไบโอเซอแฟกแตนท์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ จะมีคุณสมบัติควบคู่ไปกับความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบอื่น ๆ (Jenny และคณะ, 1991) (Kitamoto และคณะ, 1993) (Kluge และคณะ, 1988) ในการทำวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้อาศัยการทดสอบการฆ่าเชื้อยีสต์ เพื่อติดตามการทำให้สารที่ผลิตได้จาก F2.2 ให้บริสุทธิ์ดังมีลำดับขั้นตอน

2.5.1 การแยกเซลล์ *Bacillus* sp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

หลังจากเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 เพื่อผลิตสาร BS ได้ตามต้องการแล้วจึงนำมาแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แยกน้ำใสส่วนบนไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง (Millipore Filter Membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปสกัดต่อในขั้นตอนต่อไป

2.5.2 การแยกสาร BS โดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)

นำน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 มล. มาตกตะกอนด้วย 6 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริกจนมีค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 2.5 แยกเก็บตะกอนโดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ละลายตะกอนที่ได้ใน 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 7.5 ปริมาตร 50 มล. นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน โดยเขย่าเป็นครั้งคราวจนกว่าตะกอนจะละลายหมด

2.5.3 การสกัดแยกด้วยบิวทานอล (Butanol)

นำสารละลายตะกอนจากข้อ 2.5.2 มาเติม –20°C อะซิโตนที่เย็นจัดปริมาตร 116 มล. เขย่าจะเกิดตะกอนขึ้นมาอีก นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 1–2 ช.ม. จากนั้นนำไปปั่นแยกเพื่อเก็บส่วนน้ำใสที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 0°C กำจัดอะซิโตนออกโดยนำไประเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ (Vacuum Evaporation) นำสารที่เหลืออยู่ไปสกัด 2 ครั้ง ด้วยบิวทานอล 50 มล. โดยใช้กรวยแยก (Separatory Funnel) เก็บส่วนชั้นบิวทานอลไว้ นำไปลดปริมาตรโดยการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศจนเหลือประมาณ 5 มล.

2.5.4 การแยกสาร BS โดยการทำโครมาโตกราฟี

2.5.4.1 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซิลิกาเจล

เตรียมเจลโดยชั่งซิลิกาเจล (Wako gel C–200) ประมาณ 100 กรัม นำไปอบแห้งเพื่อกำจัดโมเลกุลของน้ำที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง แช่ในบิวทานอล 500 มล. คนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียด จากนั้นบรรจุเจลลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.4x45 เซนติเมตร ให้ได้เจลสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ผ่านบิวทานอลลงในคอลัมน์ประมาณ 2–3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหลประมาณ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ค่อย ๆ ใส่สารละลายของสารตัวอย่างที่อยู่ในชั้นบิวทานอลจากข้อ 2.5.3 5 มิลลิลิตรมาผ่านลงบนผิวหน้าเจล ชะโปรตีนภายในคอลัมน์ออกด้วย 200 มิลลิลิตรของบิวทานอล, อะซิโตน, เอทานอล, อะซิโตไนไทร์ และเมทานอล ตามลำดับ เก็บลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ทดสอบความสามารถในการฆ่าของสารต่อยีสต์ทดสอบในแต่ละหลอด จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกัน นำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ วัดปริมาตรแล้วละลายกลับด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร

2.5.4.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี–เซฟาเด็กซ์ เอ–50

ชั่งดีอีเออี–เซฟาเด็กซ์ เอ–50 ประมาณ 1 กรัม ในสารละลาย 500 มิลลิลิตร 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ต้มให้เดือด 2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองเต็มที่ เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียด ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นนำเจลบรรจุลงในคอลัมน์หลอดฉีดยาขนาดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ข้ามคืนจนเจลอยู่ในสภาวะสมดุล มีอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อย ๆ ใส่สารละลายของสารตัวอย่างที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล 1 มิลลิลิตร จากข้อ 2.5.4.1 ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกให้หมดด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.5 ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ 0 จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับด้วยเจลออกด้วย 0–1.0 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นรวมหลอดที่ออกมากับโปรตีนในยอด (peak) เดียวกันเข้าด้วยกัน นำไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศ และละลายกลับด้วย 3 มิลลิลิตรของ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ นำมาทดสอบความสามารถในการฆ่าของสารต่อยีสต์ทดสอบ

2.5.4.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี–75

เตรียมเจลที่จะใช้โดยแช่เซฟาเด็กซ์ จี–75 ประมาณ 1 กรัม ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 200 มล. ต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 ช.ม. ปล่อยให้เย็นแล้วบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.0x35 ซ.ม. ให้ได้เจลสูงประมาณ 30 ซ.ม. ผ่านสารละลาย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ประมาณ 2–3 เท่าของปริมาตรเจลด้วยอัตราการไหลประมาณ 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายของสารที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี–เซฟาเด็กซ์ เอ–50 และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการทำให้แห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศจากข้อ 2.5.4.2 มาผ่านลงคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี–75 เก็บสารละลายโปรตีนลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นรวมหลอดที่ออกมากับโปรตีนยอด (peak) เดียวกันเข้าด้วยกัน นำไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศและละลายกลับด้วย 3 มิลลิลิตร ของ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ นำมาทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบ

2.5.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร BS ด้วยเครื่อง HPLC

นำสารตัวอย่างก่อนและหลังการผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ ไปตรวจสอบด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (Shimadzu LC-3A) โดยใช้ Reverse phase Lichro CART 250-4 (100 RP-18) คอลัมน์ขนาด 250x4 มม. ID. ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany มีลิเนียร์เกรเดียนท์ 0-100% ของ 10% และ 90% อะซิโตไนไทร์ในน้ำ เป็นตัวพาอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

<u>สรุปแผนภาพขั้นตอนการเตรียมสาร BS กึ่งบริสุทธิ์</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2

↓ 10,000 รอบ/นาที 10 นาที ที่ 4°C

ส่วนน้ำใส

↓ กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 2.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (6 N)

↓ 10,000 รอบ/นาที 15 นาที ที่ 0°C

ตะกอน

↓ ละลายด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5)

เติม -20°C อะซิโตน แล้วตั้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 1-2 ช.ม.

↓ 12,000 รอบ/นาที ที่ 0°C

ส่วนน้ำใส

↓ กำจัดอะซิโตนโดยการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ

สกัดแยกด้วยบิวทานอล 2 ครั้ง

ชั้นบิวทานอล

ลดปริมาตรโดยการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ

ผ่านลงบนคอลัมน์ซิลิกาเจล (Wacogel C-2000)

ชะโปรตีนในคอลัมน์ด้วยบิวทานอล อะซิโตน เอธานอล อะซิโตไนไทร์ และเมธานอล ตามลำดับ

เก็บส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ

ผ่านลงบนคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5)

ชะโปรตีนส่วนที่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกด้วย 0-1.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์

เก็บส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ

ผ่านลงบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

ชะโปรตีนในคอลัมน์ออกด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5)

เก็บส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่ได้ด้วย HPLC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2.2

จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 ทั้งทางด้านสรีระวิทยา ชีวเคมี และสัณฐานวิทยา ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติต่าง ๆ ของ *B. licheniformis* F2.2

Gram stain	+
Shape of cell	rod (0.8x2 um)
Spore formation	+
Catalase	+
V–P test	+
Utilization of Citrate	+
Hydrolysis of	
Casein	+
Starch	+
Growth in NaCl	
2–7%	+
Growth at	
20°–50°C	+
Anaerobic growth	+
Lipase test	+
Emulsified halo test	+

3.2 ผลการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Antibiotic assay)

จากการทำการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มต่าง ๆ ทั้ง แบคทีเรีย รา และยีสต์ ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ทั้งวิธีการขีดไขว้ลงบนอาหาร

YEPD-MB ที่มีเชื้อทดสอบต่าง ๆ เจริญอยู่และวิธี well test ตรวจดูพบบริเวณใสที่ชัดเจน เมื่อทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ช.ม. โดยพบว่าจะให้ผลดีมากในการฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ และให้ผลดีในการฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย โดยไม่มีความจำกัดต่อชนิดแกรมบวกหรือลบดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง Antibiotic activity ของ Biosurfactant ที่ผลิตได้จาก *B. licheniformis* F2.2 ต่อยีสต์ แบคทีเรีย และรา

Microorganism	Growth media	Test media	Temperature (°C)	Inhibition Zones	
				YEPD-MB	Well test (cm)
Torulopsis glabrata	YM	YEPD-MB	30°C	+	2.8
Saccharomyces cerevisiae	YM	YEPD-MB	30°C	+	3.8
Candida albicans	YM	YEPD-MB	30°C	+	3.0
Bacillus subtilis	NA	YEPD-MB	30°C	+	2.7
Pseudomonas aeruginosa	NA	YEPD-MB	30°C	+	2.0
Escherichia coli	NA	YEPD-MB	30°C	+	2.2
Aspergillus niger	PDA	YEPD-MB	30°C	+	2.2

3.3 ผลการเปรียบเทียบค่า Surface activity ของ BS ที่เชื้อผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ กัน

จากการศึกษาเปรียบเทียบค่า Surface activity ในอาหารเหลว YEPD, LB และ Defined medium จะพบว่าเชื้อ F2.2 สามารถผลิต BS ที่ให้ผลลดค่า ST ของ culture filtrate ใน Defined–medium ได้ต่ำสุดทั้งที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C ดังนั้นจึงเลือกใช้ Defined–medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า Surface activity ของ BS ที่เชื้อ F2.2 ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ กัน

	250°C				30°C			
อาหาร	OD 600m	pH	ST mN/m	%Reduc-tion	OD 600nm	pH	ST mN/m	%Reduc-tion
YEPD	3.3 (24 hr)	5.8->8	31.9 (24 hr)	29.74	3.07 (24 hr)	5.8->8.2	31.7 (24 hr)	30.29
Defined	6.36 (48 hr)	6.8->4.3	27.5 (24 hr)	49.54	4.97 (24-30 hr)	6.8->6.1	28.1 (24 hr)	48.53
LB	1.01 (24 hr)	6.3->8.1	31.7 (24 hr)	39.85	2.0 (48 hr)	6.3->8.2	31.0 (24 hr)	41.18

3.4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต biosurfactant (BS)

3.4.1 ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์

จากการทำการศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่าเพื่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ในอาหารเหลว Defined-medium โดยการแปรค่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-72 ช.ม. เก็บตัวอย่างติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการลดแรงตึงผิว (surface tension) ด้วยเครื่อง Tensiometer พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12-24 ช.ม. จะให้ค่า surface tension ต่ำสุด และจะมีค่าคงที่ต่อไปตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงจนถึง 72 ช.ม. ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาในการเลี้ยง 24 ช.ม. ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ผลแสดงดังในรูปที่ 1

3.4.2 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอ-แฟกแตนท์

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Defined-medium ในขวดเขย่าขนาด 250 มล. ปริมาตร 50 มล. อัตราเร็ว 200 รอบ/นาที โดยการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 6.5-9.0 เก็บตัวอย่างติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการลดแรงตึงผิว (surface tension) ด้วยเครื่อง Tensiometer พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 จะสามารถผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ได้ดีภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 7.0-8.0 และจะสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0 ดังแสดงในรูปที่ 2

3.4.3 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์

3.4.3.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์

จากการศึกษาเพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า ที่มีการแปรแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และแป้งที่ความเข้มข้น 2% ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการลดแรงตึงผิวพบว่า กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ซูโครส กลีเซอรอล และแป้ง ดังแสดงในรูปที่ 3

3.4.3.2 ปริมาณของแหล่งคาร์บอน

ทำการศึกษาพบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอ–แฟกแตนท์จึงได้ทำการทดลองต่อไปเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมโดยทำการแปรผันปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 0.5–2.5% (โดยแปรผันค่าทีละ 0.5%) พบว่าปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอ–แฟกแตนท์คือ 2.0% ดังรูปที่ 4

3.4.3.3 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์

จากการศึกษาเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเซอ–แฟกแตนท์ จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า ทำการแปรแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ได้แก่ NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้น 0.4% ติดตามการการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ โดยการวิเคราะห์ความสามารถในการลดแรงตึงผิว พบว่า NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตไบโอเซอแฟกแตนท์ดีสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$ และ $NaNO_3$ และดังแสดงในรูปที่ 5

3.5 ผลของการวัดค่า *Oil displacement test*

เนื่องจากได้เคยมีรายงานว่า พื้นที่ของวงใสที่เกิดจากการทดสอบ Oil displacement test จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสาร surfactants (Morikawa และคณะ, 1993) คือเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้น วงใสก็จะมีพื้นที่มากขึ้น จากการทดลองพบว่าพื้นที่ของวงใสจะกว้างมากขึ้นจนเห็นได้ชัดตั้งแต่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไปแล้วจะมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึง 72 ชั่วโมง (43–45.38 ตร.ซม.) ดังผลแสดงในตารางที่ 4

3.6 <u>การเตรียมสาร BS กึ่งบริสุทธิ์</u>

3.6.1 การสกัดแยกเซลล์ ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

จากการปั่นแยกเซลล์ ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงภายใต้อุณหภูมิต่ำ

3.6.2 การแยกโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ตกตะกอนส่วนน้ำใสที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนสารละลายมีสภาวะเป็นกรด (มีค่าความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 2.5) แล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็วสูงเพื่อเก็บส่วนตะกอน ละลายตะกอนที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด–ด่าง 7.5 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4°C จนตะกอนละลายหมด

3.6.3 การสกัดแยกด้วยบิวทานอล

เติมอะซิโตนที่เย็นจัดลงในสารละลายตะกอนที่ได้จากข้อ 3.6.2 เขย่าจนเกิดตะกอนขึ้น ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งจนตะกอนตกลงมาหมด แล้วปั่นแยกที่ความเร็วสูง 12,000 รอบ/นาที เพื่อเก็บส่วนน้ำใส นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนและส่วนตะกอนที่ไม่ต้องการมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบบนจานเพาะเชื้อที่มี *Saccharomyces cerevisiae* เจริญอยู่ พบว่า มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบหลุมทดสอบที่มีการหยอดส่วนน้ำใสอย่างชัดเจน ส่วนหลุมที่ทำการหยอดด้วยสารละลายตะกอนจะให้ผลในการทดสอบบ้างเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอะซิโตนซึ่งหลงเหลืออยู่ กำจัดอะซิโตนออกจากส่วนน้ำใสที่แยกได้โดยการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ แล้วนำส่วนที่เหลือไปทำการสกัดแยกสารด้วยบิวทานอล เก็บส่วนชั้นบนซึ่งเป็นชั้นบิวทานอลไว้ ล้าง 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่น

3.6.4 การแยกสาร BS โดยการทำโครมาโตกราฟี

3.6.4.1 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซิลิกาเจล

นำสารที่ได้จากการผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งละลายอยู่ในบิวทานอลมาผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล (ขนาด 2.4x4.5 ซม.) ที่เตรียมขึ้นตามวิธีในหัวข้อ 2.5.4.1 ชะโปรตีนภายในคอลัมน์ออกด้วยบิวทานอล, อะซิโตน, เอธานอล, อะซิโตไนไทร์ และเมธานอล ตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะออกลำดับส่วนละ 3 มล. ทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบ รูปที่ 6 แสดงผลที่ได้โดย พบว่ามีโปรตีนออกมา 5 ยอด (ทั้งนี้สารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จะอยู่ในยอดที่ 5) ชะโปรตีนในคอลัมน์ด้วยเมธานอล รวมหลอดที่ให้ผลในการทดสอบเข้าด้วยกันและนำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ แล้วละลายกลับด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 นำโปรตีนในยอดต่าง ๆ ทั้ง 5 ยอดที่ชะออกจากคอลัมน์มาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบพบว่า เฉพาะโปรตีนในยอดที่ออกมากับการชะคอลัมน์ด้วยเมธานอลเท่านั้นที่ให้บริเวณใสรอบหลุมทดสอบ

3.6.4.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 และคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

นำส่วนของสารตัวอย่างซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ซิลิกาเจลด้วยเมธานอล ที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ และผ่านการทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธีโครมาโตกราฟีบนซีเอ็ม-เซฟาเด็ก ซี-50 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคบวก (cation exchanger) ขั้นตอนนี้เพื่อกำจัด

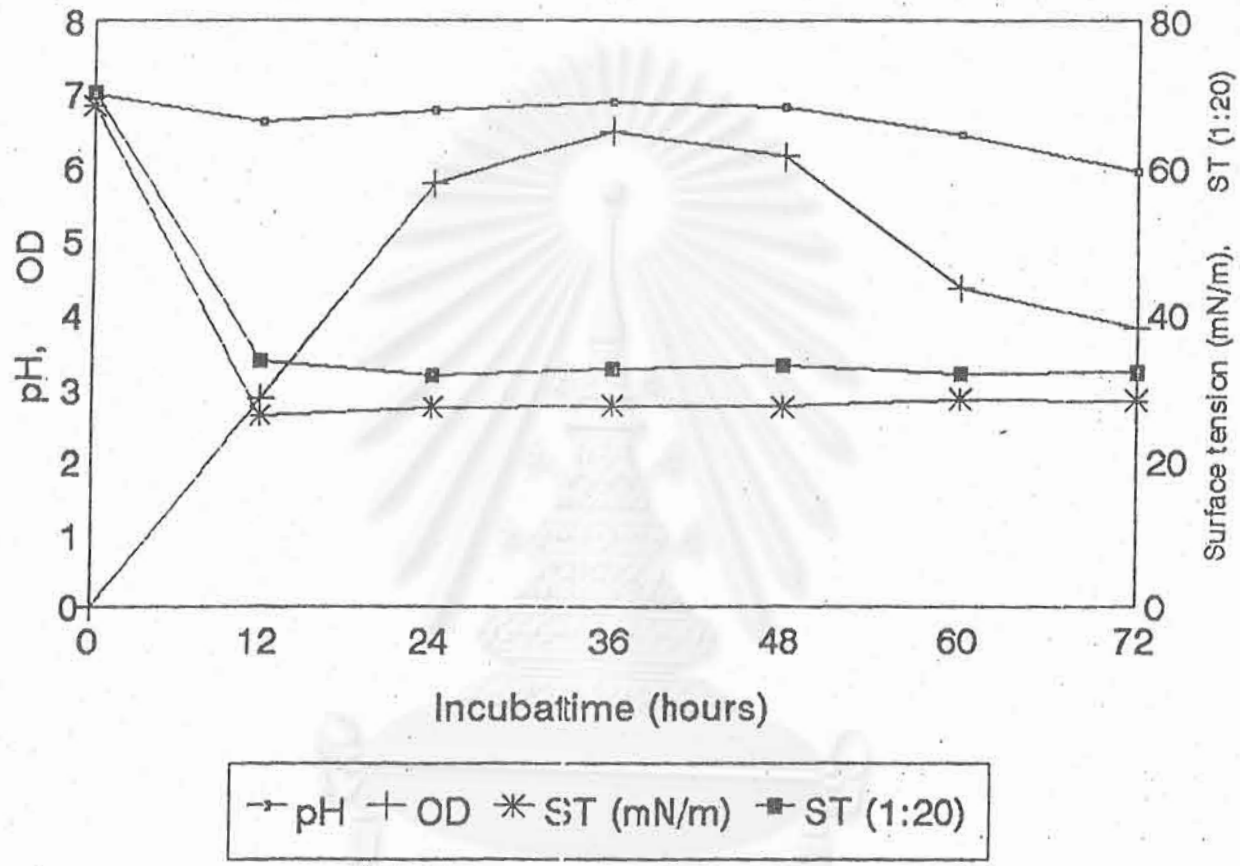
โปรตีนอื่นที่มีประจุตรงข้ามกับสารตัวอย่างออกไป และยังสามารถกำจัดโปรตีนที่มีประจุต่างกับสารตัวอย่างมาก ๆ ออกด้วย โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ต่างกัน ตามวิธีการในข้อ 2.5.4.2 ผลการทดลองพบว่าสารที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์พร้อมกับโปรตีนในส่วนที่ไม่ยึดเกาะกับตัวกลาง แสดงว่า สารตัวอย่างไม่ได้มีประจุเป็นบวก นำไปทำโครมาโตกราฟีอีกครั้งบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคลบ (cation exchanger) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 7 โดยพบว่าสารตัวอย่างจะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 50-100 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100-300 มิลลิโมลาร์ แสดงว่า สารตัวอย่างมีประจุเป็นลบ เมื่อรวมลำดับส่วนที่ 50-100 เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบพบว่า มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบหลุมทดสอบจริง ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสารตัวอย่างถูกชะออกมากับโปรตีนในยอดนี้

3.6.4.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

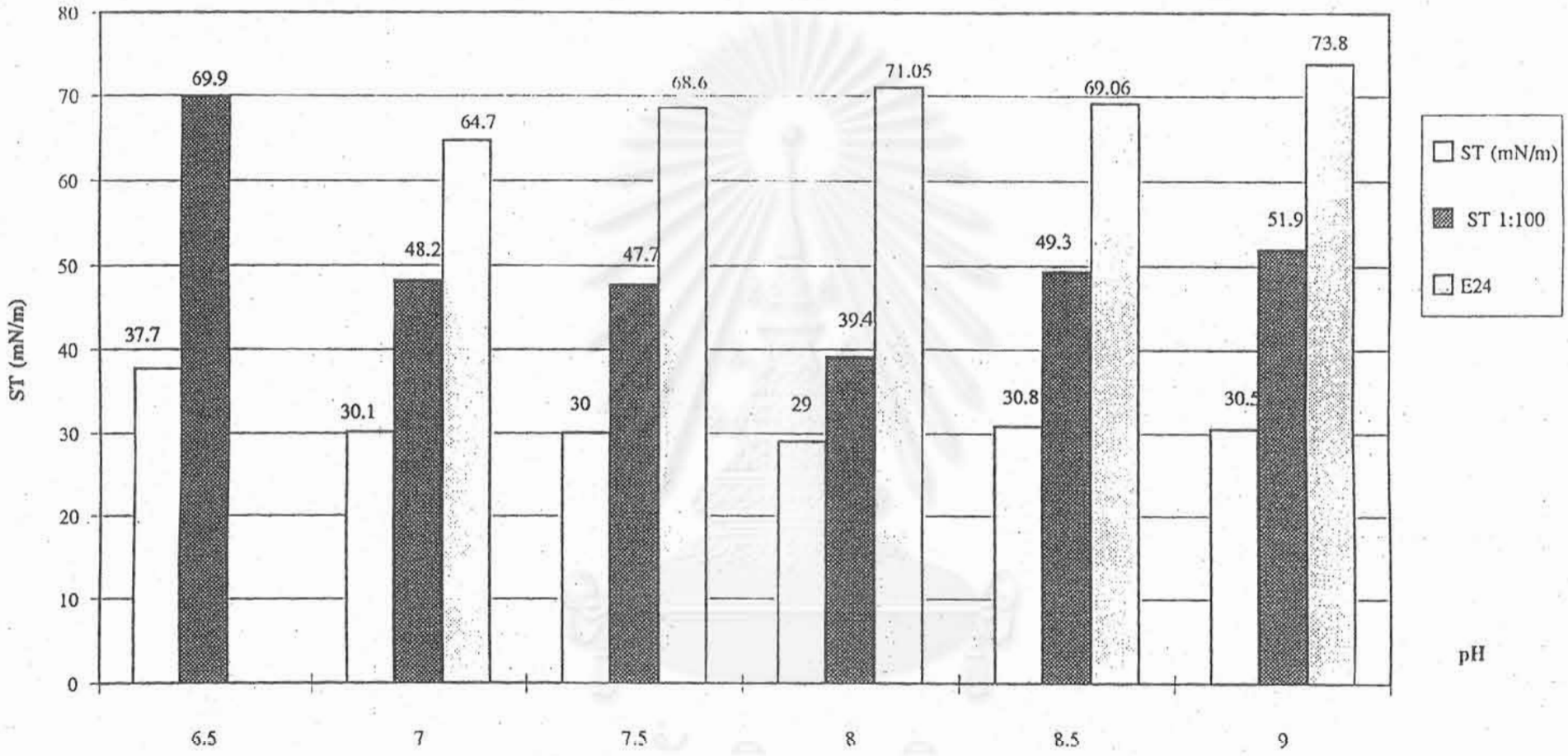
การทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ อาศัยหลักการแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างจากสารละลายตัวอย่างออกไป โดยนำมาผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ดังวิธีการในข้อ 2.5.4.3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 8 โดยผ่านสารตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ในลำดับส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ ซึ่งแขวนลอยใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงบนคอลัมน์เก็บสารละลายลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร นำโปรตีนที่ออกมาในแต่ละยอดไปทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ พบว่าเฉพาะโปรตีนที่ออกมาในลำดับส่วนที่ 52-65 จะให้บริเวณใสรอบหลุมทดสอบ

3.6.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร BS ด้วย HPLC

จากการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างก่อนและหลังการผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC พบว่า พีค (Peak) ที่ปรากฏในโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนมาก (รูปที่ 9A) นั่นคือมีส่วนที่เป็นของสารอื่นปะปนอยู่ จึงจำเป็นต้องนำสารตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีโครมาโตกราฟี และเมื่อนำสารที่ได้จากการผ่านขั้นตอนเหล่านี้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์อีกครั้งด้วย HPLC พบว่า พีคที่ปรากฏในโครมาโตรแกรมมีจำนวนลดลง (รูปที่ 9B) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารละลายตัวอย่างในลำดับสุดท้ายที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ต่าง ๆ มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

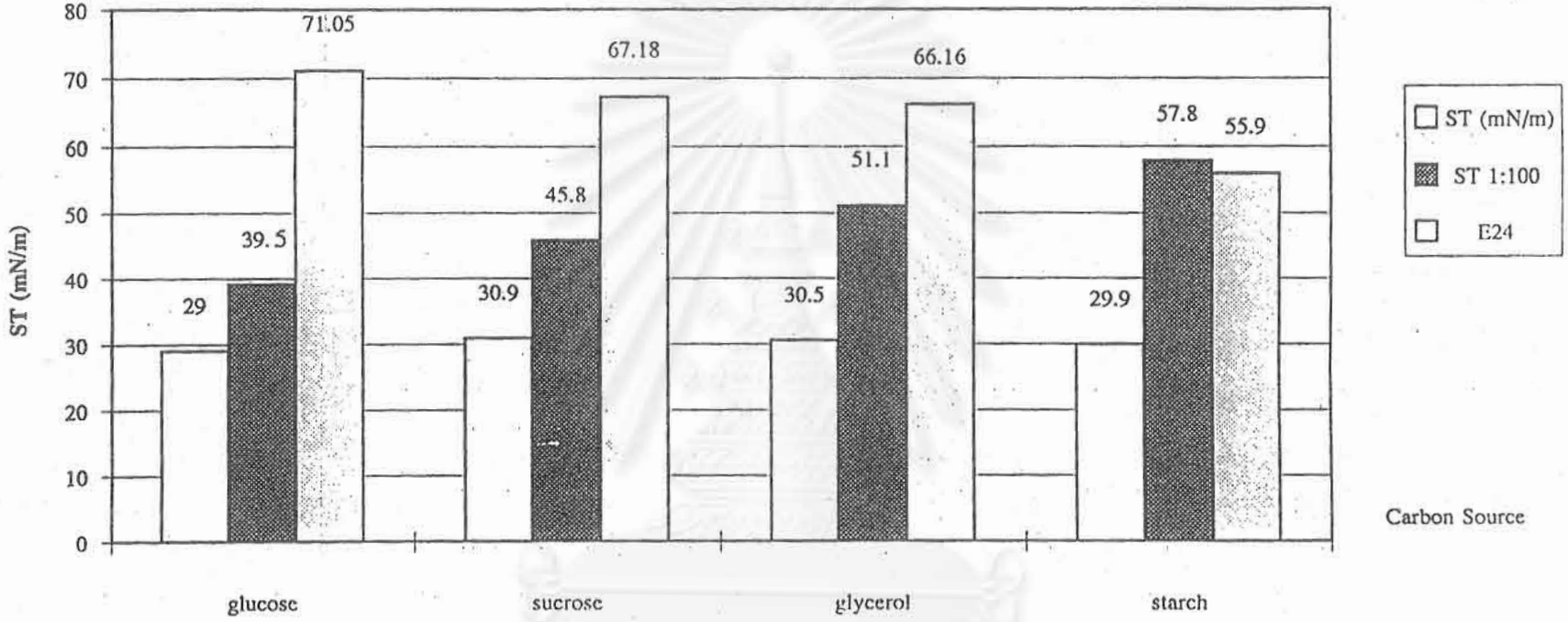


รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ, pHและ surface tension activity เมื่อเลี้ยงเชื้อ Bacillus licheniformis F2.2 ใน Defined medium ที่อุณหภูมิ 30°c



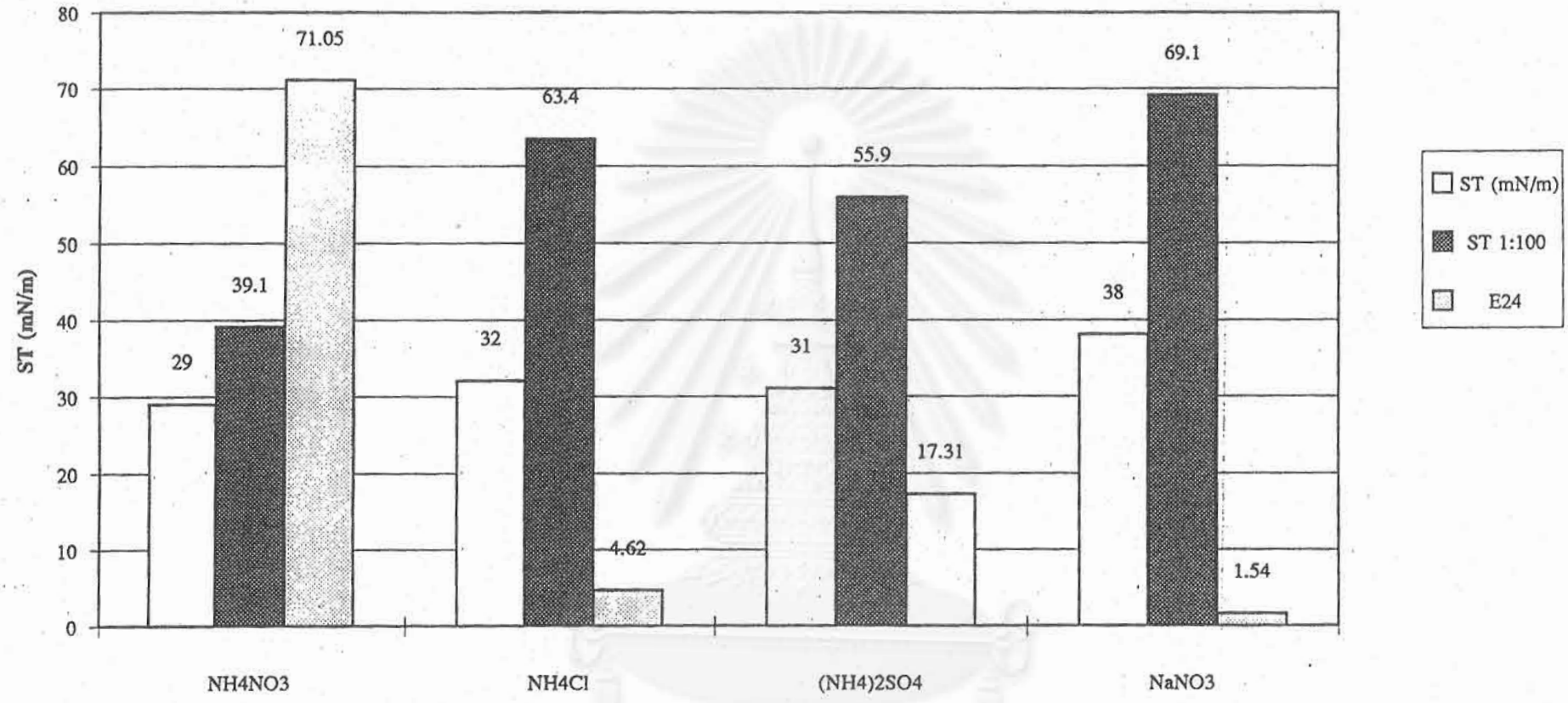
รูปที่ 2 กราฟแสดงค่า Surface tension activity ของสาร BS ที่ผลิตได้ใน Defined medium เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-9.0 ที่อุณหภูมิ 30°c

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แสดงค่า **Surface tension activity** ของ **BS** ที่ผลิตได้ใน **Defined medium** โดยแปรผันแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ (ที่ความเข้มข้น 2%) ที่ pH. 8 อุณหภูมิ 30°c

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



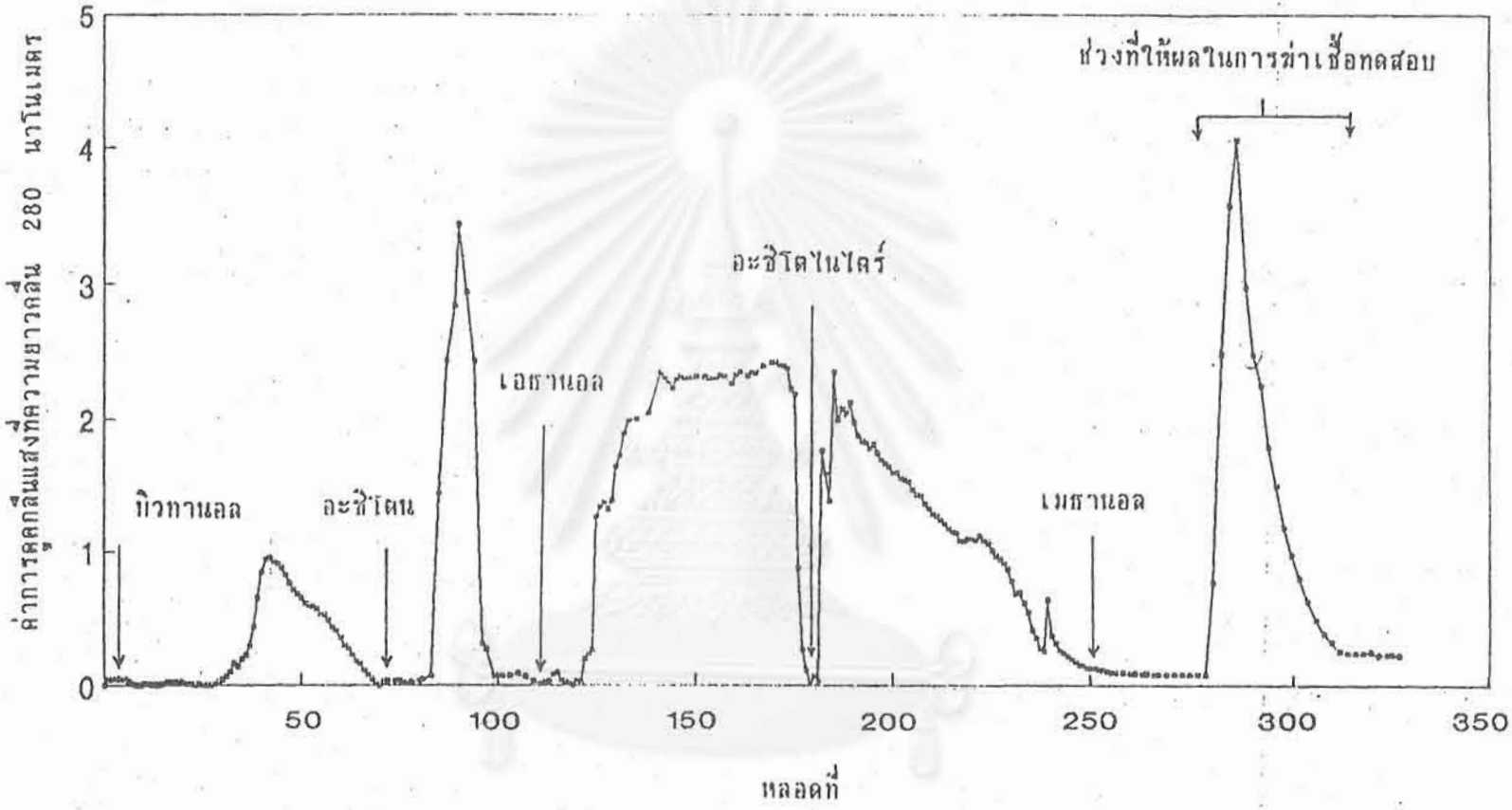
รูปที่ 5 กราฟแสดงค่า Surface tension activity และค่า Emulsitication ของสาร BS ที่ผลิตได้ใน Defined medium โดยแปรผันแหล่งไนโตเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.4%

Time (ชั่วโมง)	Oil displacement (ซ.ม.)
12	5.09
24	43.03
48	44.2
72	45.38

ตารางที่ 4 แสดงค่า Oil displacement test ของสาร BS ที่ผลิตได้ใน Defined medium ที่อุณหภูมิ 30°c pH 8 ในช่วงเวลา 12-72 ชม.

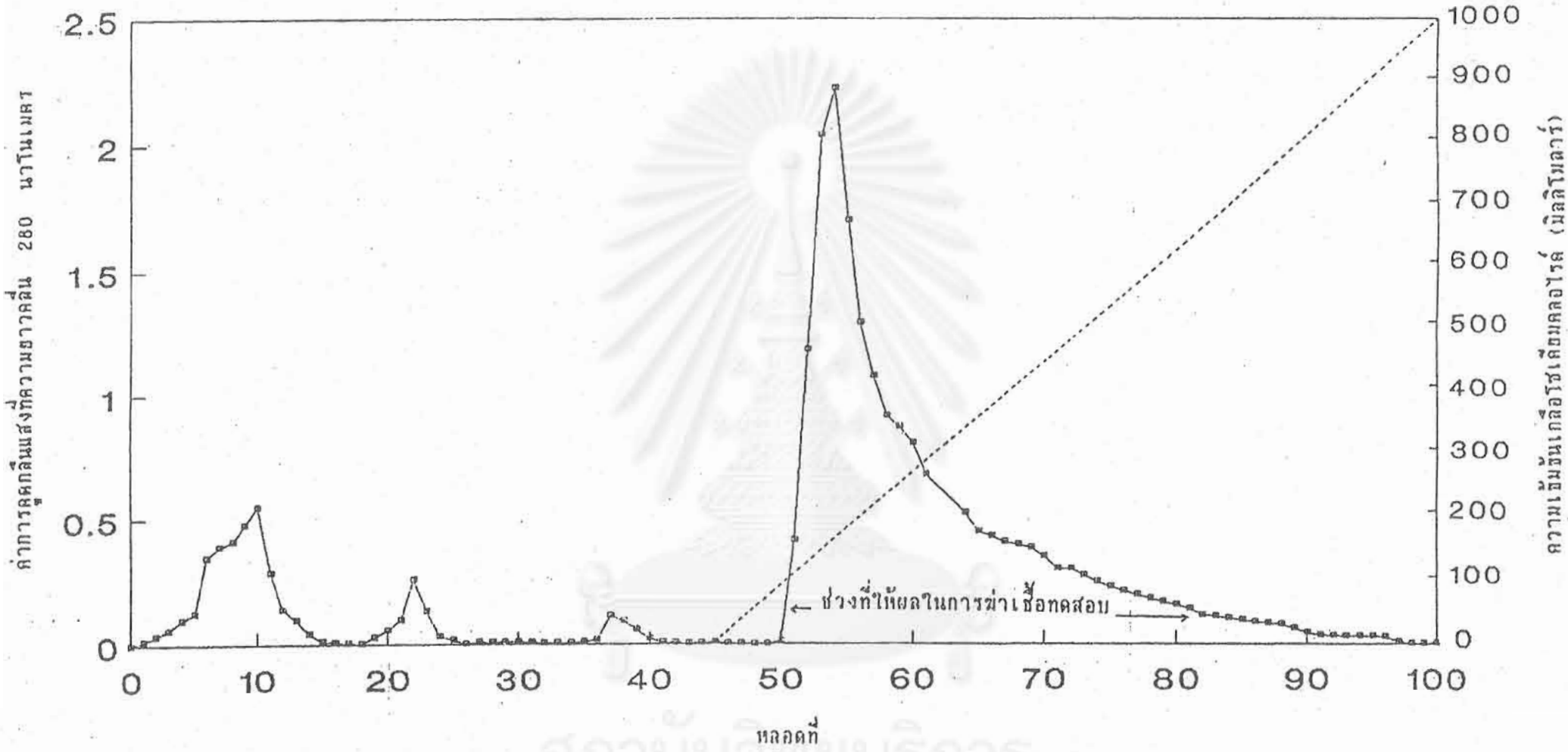
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20141149X



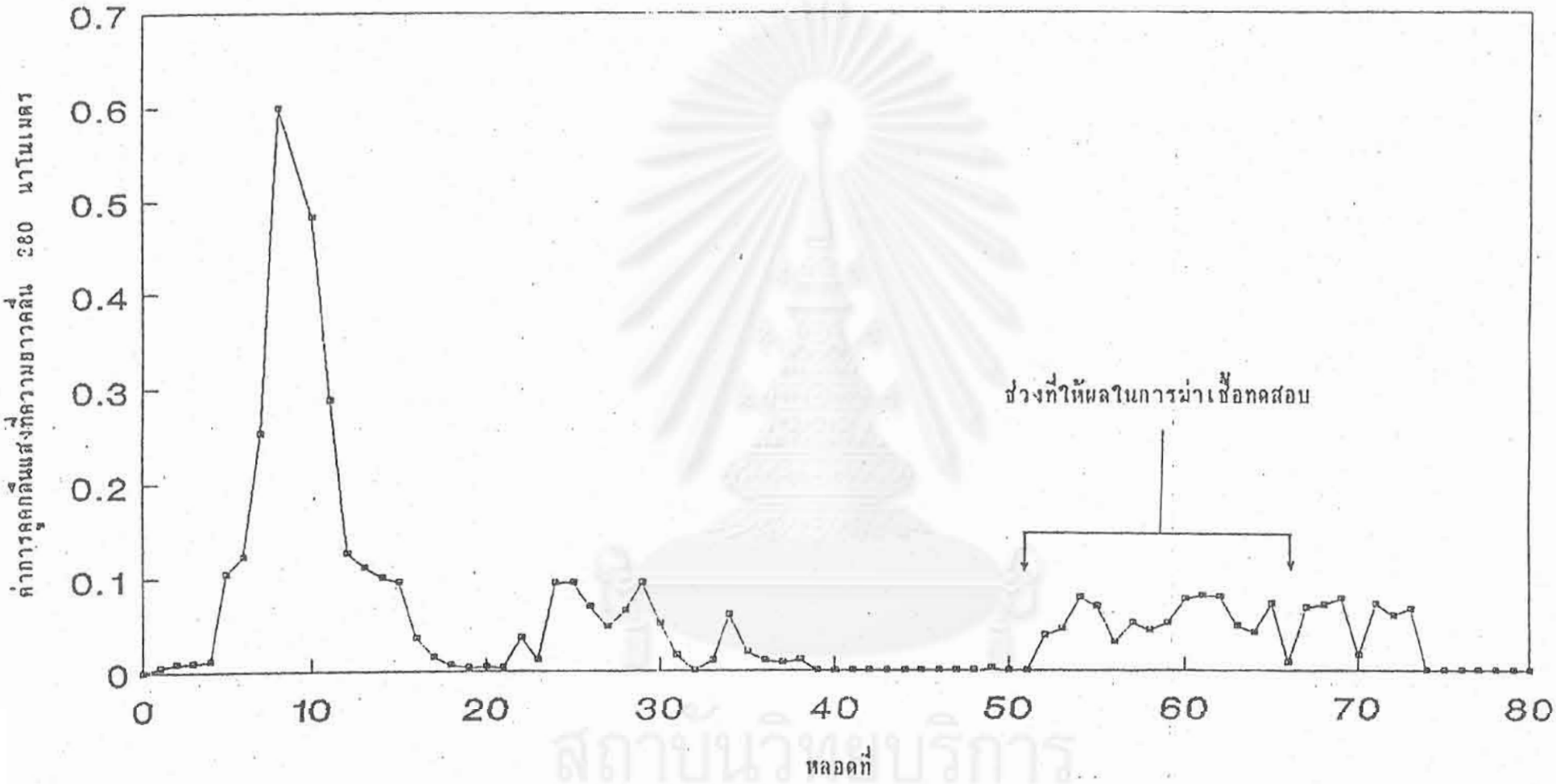
รูปที่ 6 การทำโครมาโตกราฟีของสาร BS ที่ผลิตได้โดย Bacillus sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์ซิลิกาเจล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

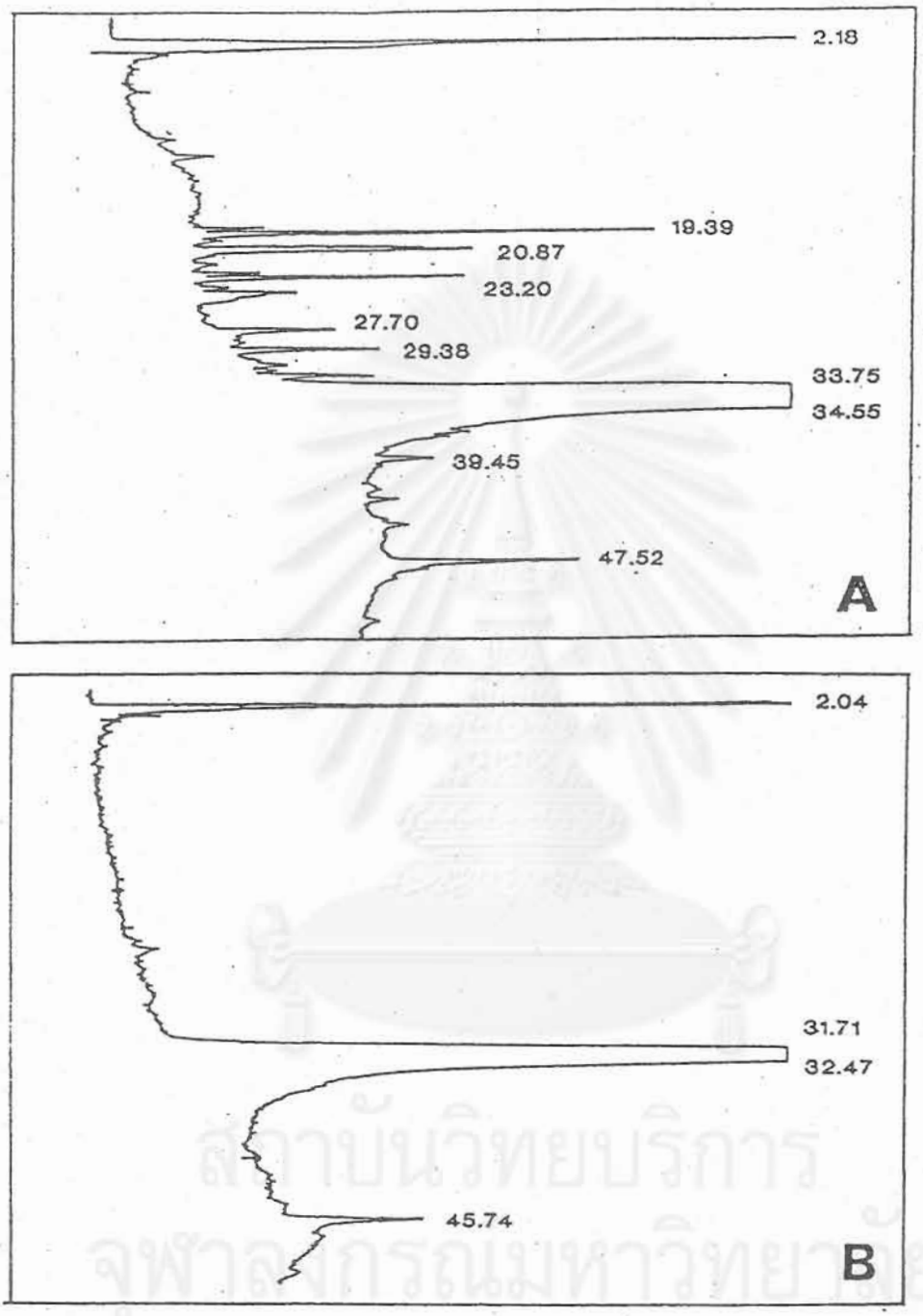


รูปที่ 7 การทำโครมาโตกราฟีของ BS ที่ผลิตโดย Bacillus sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 การทำโครมาโตกราฟีของ BS ที่ผลิตโดย Bacillus sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75



รูปที่ 9 การเปรียบเทียบ HPLC โครมาโตแกรมของสาร BS ที่ผลิตได้ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟี (A และ B ตามลำดับ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. จากการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบ ทั้งวิธีการขีดไขว้บนอาหารแข็งที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ และการสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญการดูดซึมของสารผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar diffusion) หรือ well test พบว่าทั้ง 2 วิธี สามารถให้ผลการทดสอบในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อยีสต์ แบคทีเรีย และรา โดยเฉพาะ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายและพบได้ทั่วไป ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบในการติดตามสารที่ผลิตได้ต่อไป

2. การเปรียบเทียบค่า surface tension activity ของ biosurfactant ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ Defined medium, LB และ YEPD medium พบว่าเชื้อ F2.2 สามารถสร้างสาร BS ที่มี surface tension activity ได้ใน Defined medium ดีกว่า LB และ YEPD medium โดยให้ค่า surface tension activity เท่ากับ 27.5 mN/m ที่ 24 ช.ม. อุณหภูมิ 25°C และ 28.1 mN/m 24 ช.ม. ที่อุณหภูมิ 30°C

3. ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในขวดเขย่าได้ใช้สูตรอาหารชนิด Defined medium ในการผลิต biosurfactant จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ ที่ 12-24 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ค่า surface tension activity ต่ำสุด จากนั้นจะมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง สำหรับผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 โดยจะให้ค่า surface tension activity เท่ากับ 29.0 mN/m ST (1:100) มีค่าเท่ากับ 39.4 mN/m และค่า emulsion index (E_{24}) = 71

4. จากการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต biosurfactant พบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิต biosurfactant ได้ดีที่สุด และ emulsion index (E_{24}) มีค่าสูงสุดเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ซูโครส กลีเซอรอล และแป้ง ส่วนปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตคือ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5. การศึกษาการใช้ NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$ และ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า NH_4NO_3 (0.4% น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้การเจริญของเชื้อได้ดี ลดค่า surface tension activity ได้ต่ำสุด และ emulsion index มีค่าสูงสุด ดังนั้น NH_4NO_3 จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต Biosurfactant

6. ผลของการวัดค่า Oil displacement test

เนื่องจากได้เคยมีรายงานว่า พื้นที่ของวงใสที่เกิดจากการทดสอบ Oil displacement test จะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสาร surfactants (Morikawa และคณะ, 1993) คือเมื่อความเข้มข้นของสารมากขึ้น วงใสก็จะมีพื้นที่มากขึ้น จากการทดลองพบว่าพื้นที่ของวงใสจะกว้างมากขึ้นจนเห็นได้ชัดตั้งแต่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไปแล้วจะมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึง 72 ชั่วโมง (43–45.38 ตร.ซม.)

7. ในการสกัดแยกสารที่ผลิตได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ทำโดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ค่าความเป็นกรด–ด่างในสารละลายเท่ากับ 2.5 และสกัดแยกสารออกมาโดยใช้บิวทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่โพลาร์ (Non polar) นำสารละลายซึ่งอยู่ในชั้นบิวทานอลมาทำโครมาโตรกราฟีบนคอลัมน์ซิลิกาเจล ซึ่งจัดเป็นโครมาโตรกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption chromatography) แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ บิวทานอล อะซิโตน เอธานอล อะซิโตไนไทร์ และเมธานอลที่มีค่าความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้นตามลำดับ (Hydrophobic --->Hydrophilic) พบว่า โปรตีนที่ดูดซับอยู่บนคอลัมน์จะถูกชะออกมากับตัวชะในลำดับส่วนต่าง ๆ กัน โดยโปรตีนในยอดที่ออกมากับการชะคอลัมน์ด้วยเมธานอลเท่านั้นที่จะแสดงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบ

8. เมื่อนำส่วนสารละลายตัวอย่างซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ซิลิกาเจลด้วยเมธานอล ที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบมาผ่านลงคอลัมน์ซีเอ็ม–เซฟาเด็กซ์ซี–50 พบว่า สารละลายตัวอย่างจะไม่ถูกยึดเกาะกับตัวกลาง แต่จะถูกชะออกจากคอลัมน์พร้อมกับโปรตีนอื่น ๆ แต่เมื่อนำมาผ่านลงคอลัมน์ดีอีเออี–เซฟาเด็กซ์ เอ–50 และทำการชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0–1000 มิลลิโมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 พบว่าโปรตีนที่มีแอคติวิตีในการฆ่าจุลชีพทดสอบมีเพียงยอดเดียว และจะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 100–300 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าสารในส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบมีประจุเป็นลบที่ไม่สูงมาก เนื่องจากสามารถถูกชะออกมาที่ช่วงของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่สูงมาก (100–300 มิลลิโมลาร์)

9. เมื่อรวมสารละลายในช่วงที่ให้ความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบเข้าด้วยกัน แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยอาศัยหลักการแยกตามขนาดโมเลกุลในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี–75 แล้วชะล้างคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 พบว่าเมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นั้นมีโปรตีนออกมาจำนวนหลายยอด แต่โปรตีนในยอดที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบจะออก

มาหลังจากปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ (Void volume) ในลำดับส่วนที่ 52–65 จากคุณสมบัติของเซฟาเด็กซ์ จี–75 จะสามารถแยกสารได้ดีในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000–70,000 ดาลตัน (Pharmacia Fine Chemicals, 1983) ถ้าสารที่นำมาแยกมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 70,000 ดาลตัน ก็จะไหลออกมาจากคอลัมน์พร้อมกับปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารตัวอย่างจะออกมาในลำดับส่วนหลัง ๆ ซึ่งห่างจากปริมาตรในช่องว่างของคอลัมน์มาก ดังนั้นจึงพอจะคาดได้ว่า สารที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงต่ำกว่า 5,000 ดาลตัน

10. หลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ แล้ว สารละลายตัวอย่างยังคงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบอยู่ และเพื่อเป็นการยืนยันถึงความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นของสารตัวอย่างในขั้นตอนสุดท้ายที่ได้จากคอลัมน์โครมาโตรกราฟี จึงทดลองโดยนำสารละลายตัวอย่างก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วเปรียบเทียบโครมาโตรแกรมที่ได้ ผลการทดลองพบว่าจำนวนพีคที่ปรากฏในโครมาโตรแกรมของสารที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนลดลงอย่างมาก จึงพอสรุปได้ว่า สารที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้วัดคุณสมบัติทางด้านการเป็นสารลดแรงตึงผิวของสารกึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ เช่น การวัดค่า Surface tension activity และ Oil desplacement test เป็นต้น เทียบกับสารที่เป็น commercial surfactant ซึ่งถ้ามีโอกาสคณะผู้วิจัยจะได้ดำเนินการต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 YEPD–MB medium

ผงสกัดยีสต์	10.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	10.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม
น้ำ	900.0	มล.
ฟอสเฟต–ซิเตรทบัฟเฟอร์	100.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันและอุณหภูมิมาตรฐานเมื่ออุณหภูมิลดลงจนถึง 45 ซ. จึงเติมเมทธิลลีนบลู 0.4% v/v

1.2 Defined–medium

NH_4NO_3	4	กรัม
H_3PO_4	0.0	มล.
$Na_2HPO_4.12H_2O$	14	กรัม
Trace elements #1	100	มล.
glucose 20 g + H_2O	90	มล.
Trace elements #2	100	มล.
Vitamin	10	มล./1000 มล. ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 Nutrient broth

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
น้ำ	1000.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

เอกสารอ้างอิง

Falbe, J. 1987. Surfactans in Consumer Products. Theory, Technology and Application. Springer-Verlag Heidelberg p.1-535. ISBN 0-387-17019-7 (U.S)

Fiechter, A. 1992. Biosurfactants : moring towards industrial application. TIBTECH 10:208-217.

Fujimoto, M, A. Kuninaka, S. Yonei, T. Kohama and H. Yoshino. 1969. Confirmation of the Structure of Surfaction by Mass Spectrometry. Agr. Biol. Chem. 33(11), 1669-1671.

Horowitz S., J.N. Gilbert and W. Michael Griffin 1990. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86.6,243-248.

Imanaka et al. 1994. Biosurfactant Cyclopeptide Compound Produced by Culturing A Speific Arthrobacter Microorganisms. United States Patent (19) Patent number 5,344,913.

Jenny, K., O. Kappeli and A. Fiechter. 1991. Biosurfactants from *B-licheniformis* : structural analysis and characterization. Appl. Microbiol. Biotech. 36:5-13.

Kitamoto, D., Hiroshi Yanagishita, Toshio Shinbo, Takashi Nakane, Chiyoshi Kamisawa and Tadaatsu Nakahara. 1993. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipide as biosurfactants produced by *Candida antarctica* J. of Biotech. 29,91-96.

Kosaric, N. 1993. Biosurfactants. Proudction. Properties. Applications. Marcel Dekker, New York/Basel, pp.1-483.

Kluge, B., et al. 1988. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *B. subtilis* ATCC 21332. FEB. Vol 231(1). p.107-110

Lang, S., Katsiwela, E. and Wagner, F. 1989. Antimicrobial activities of biosurfactants. Fat. Sci. Technol. 91, 363–366.

Morikawa, M. H. Daido. T. Takado, S. Murata, Y. Shimonishi and T. Imanaka. 1993. A New lipopeptide Biosurfactan Produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS 38 Oct, 6459–6466.

Sandrin, C., F. Peypoux, and G. Michel. 1990. Coproduction of Surfactin and Ituriwa A, Lipopeptides with Surfactant and Antifungal Properties, by *B. subtilis.* Biotech and Appl. Biochem 12, 370–375.

Thaniyavarn, S., Morikawa, K., Hamuro, T. and Imanaka, T. 1992. Exploitation of transformation system in *B. subtilis* 3/38 and its surfactin production. Microbial utilization of renewable resources Vol.8. JSPS–NRCT seminar, Oct. 28–31, Bangk9k, Thailand.

Zajic, J. E. and D. G Cooper. 1980. Surface–Active Compounds from Microorganisms. Advances in Applied Microbio. Vol. 26,229–250.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 LB

Yeast extract	0.5 %
glucose	1 %
tryptone	1 %
NaCl	0.5 %

2. Emulsification measurement

การวัด Emulsifier activity ทำได้โดย ปิเปตสารตัวอย่าง 4 ml ลงในหลอดฝาเกลียว เติม 6 ml ของ kerosene นำไป vortex เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ช.ม

วัดค่า emulsion index (E_{24}) = $\frac{\text{ความสูงของชั้น emulsion layer}}{\text{ส่วนสูงทั้งหมด}} \times 100$

3. การทำ dilution ST

ST 1 : 100 ปิเปตสารตัวอย่าง 1 ml เจือจางด้วยน้ำกลั่น 99 ml เท่ากับ (dilution 1:100) นำไปวัดค่า surface tension ด้วยเครื่อง Tensiometer หรือ ST 1:20 ทำทำนองเดียวกัน

4. การคำนวณค่า Oil displacement test

พื้นที่วงใส = πr^2

= $\frac{\text{ได้จากค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส}}{2} = \frac{a + b}{2}$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย