

การผลิตและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1

นาย นรินทร์ รุ่งสว่าง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

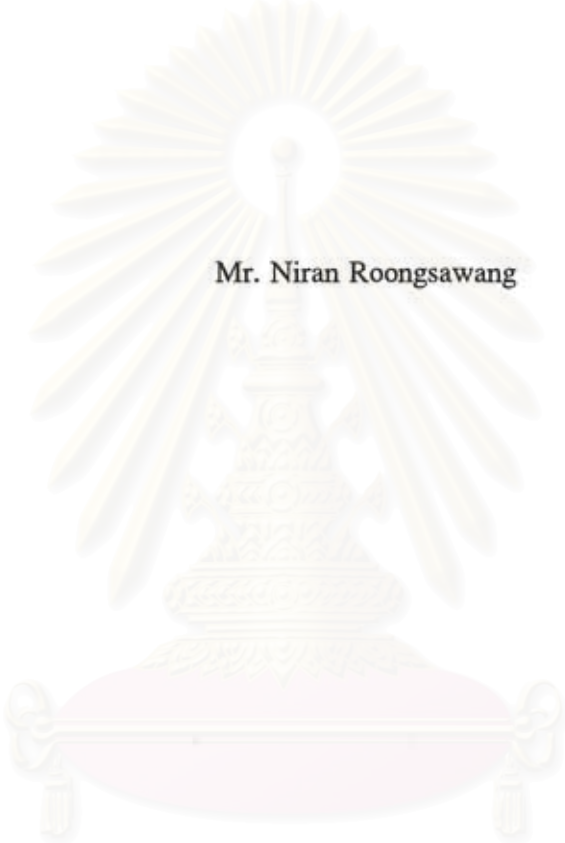
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-443-2

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT FROM
Bacillus subtilis BBK-1



Mr. Niran Roongsawang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-333-443-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis*
BBK-1

โดย นายนิรันดร์ รุ่งสว่าง
ภาควิชา จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

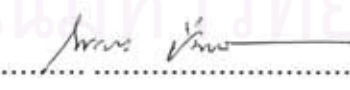

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

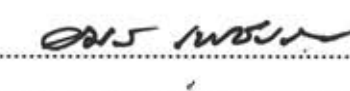
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

นายนิรันดร์ รุ่งสว่าง : การผลิตและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT FROM *Bacillus subtilis* BBK-1)

อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. จิราภรณ์ ธนียวัน 139 หน้า.
ISBN 974-333-443-2

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างดิน ทวาย น้ำทะเล และอาหารหมักดอง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* มีความสามารถสูงสุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ *Bacillus subtilis* BBK-1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีซูโครส 0.5% w/v เป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรท 0.2% w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน สารสกัดจากยีสต์ 0.5% w/v เป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน เกลือแร่และวิตามิน และโซเดียมคลอไรด์ 3% w/v ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 40 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดด้วยเมทานอลมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 50-100 °C เป็นเวลา 5 ชม. และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที และสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% w/v และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5-10 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์เท่ากับ 12 mg/l ซึ่งต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ sodium dodecyl sulfate, cetylpyridinium chloride, tween 80 และ triton X-100 ผลการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC, LC-MS และการหาคาร์บอนไอที่เป็นองค์ประกอบ พบว่าแบคทีเรียนี้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ได้ 3 ชนิด ได้แก่เบซิลไมซิน L ไพลาสดาติน และเซอร์แฟกติน การโคลนนิ่งที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์จาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ด้วยวิธี Southern และ colony hybridization โดยการใส่ *sfp*⁰ จาก *Bacillus subtilis* MI113 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ผลิตเซอร์แฟกตินเป็นดีเอ็นเอตรวจจับ พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกขนาด 4 กิโลเบส ที่ได้จากการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของ BBK-1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* สามารถทำให้ *Bacillus subtilis* MI113 ผลิตเซอร์แฟกติน และไม่ผลิตเมื่อทำกลายพันธุ์ชิ้นดีเอ็นเอนี้ตรงตำแหน่ง *SacI* ดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง *SacI* มี 1 open reading frame ขนาด 672 เบส เมื่อแปลรหัสจะให้กรดอะมิโน 224 ตัว ซึ่งมีความเหมือนกับโปรตีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์จาก *Bacillus subtilis* อื่นๆ หลายสายพันธุ์

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต..... ชัยสิทธิ์ ช่างสัง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... จิราภรณ์ ธนียวัน

NIRAN ROONGSAWANG : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF
BIOSURFACTANT FROM *Bacillus subtilis* BBK-1

THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUTHEP THANİYAVARN, PH.D. AND
ASSIST. PROF. JIRAPORN THANİYAVARN 139 pp. ISBN 974-333-443-2


Halotolerant biosurfactant producing bacteria were isolated from various sources including soil, sand, marine water and fermented food. Among these, a strain designated BBK-1 which was later identified as *Bacillus subtilis* gave the best biosurfactant activity. The strain gave high biosurfactant yield upon cultivated by using 0.5 % w/v sucrose as carbon source, 0.2 % w/v NH_4NO_3 as nitrogen source, 0.5 % w/v yeast extract as nitrogen source and trace mineral, 3 % w/v NaCl, pH 7.5 at room temperature (30 ± 2 °C), 200 rpm agitation for 24 hours. Under such condition *Bacillus subtilis* BBK-1 could produce biosurfactant with a relative biosurfactants concentration at 40. The methanol extracted biosurfactant is found stable to temperature ranging from 50 to 100 °C upto 5 hours while at 121 °C for 30 min. The biosurfactant showed activity in the present of 15 % w/v NaCl as well as to pH from 5.0-10.0. The CMC value of product was at 12 mg/l which was lower than that of chemical surfactants such as sodium dodecyl sulfate, cetylpyridinium chloride, tween 80 and triton X-100. The results from HPLC, LC-MS and amino acid composition analyses indicated that *Bacillus subtilis* BBK-1 produced 3 types of lipopeptide biosurfactants identified as bacillomycin L, plipastatin and surfactin. Regulatory gene for biosynthesis of these biosurfactants in *Bacillus subtilis* BBK-1 was cloned by Southern and colony hybridization using *sfp*⁰ gene from surfactin nonproducing *Bacillus subtilis* MI113 as probe. The recombinant plasmid obtained containing 4 kb-DNA insert which was the *EcoRI* fragment of the BBK-1 chromosomal DNA could transform *Bacillus subtilis* MI113 to a surfactin producer. Frame shift mutation at *SacI* site on the DNA insert resulted in losing surfactin producing ability of *Bacillus subtilis* MI113. Nucleotide sequence between *SacI* site was determined upon which a one large open reading frame (672 bp., 224 amino acid residues) was identified. The deduced amino acid sequence of this open reading frame shares high identity with regulatory protein of lipopeptide biosurfactants production in *Bacillus subtilis* strains.

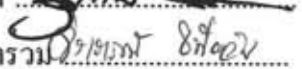
ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต.....^{ลิว 6} หิวดา ¹ ช่งเส่งถาง

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....¹ 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษารวม.....¹ 

กิตติกรรมประกาศ



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยมาด้วยดีตลอดข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ Prof. Dr. Shigenori Kanaya, Assoc. Prof. Dr. Masaaki Morikawa และ Assist. Prof. Dr. Mitsuru Haruki ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในระหว่างการทำวิจัยที่ประเทศญี่ปุ่นเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นลินี นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่ได้รับเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของบัณฑิตวิทยาลัย และสำนักงานวิจัยแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชา Material and Life Science มหาวิทยาลัยโอซากา ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

เนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้ภายในประเทศได้รับมาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่มอบให้แก่ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน และทุนการวิจัยในต่างประเทศได้รับจากมหาวิทยาลัยโอซากา และสมาคมการศึกษานานาชาติแห่งประเทศไทย (AIEJ) จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายสุดผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ณ
คำย่อ	ด
บทที่	
1. บทนำ	1
2. การตรวจเอกสาร	3
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง	35
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	58
5. สรุปผลการทดลอง	112
รายการอ้างอิง	114
ภาคผนวก	125
ประวัติผู้เขียน	139

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ความสามารถในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียทนเค็มที่คัด เลือกได้ 9 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแอลบีที่ผสม โซเดียมคลอ ไรด์ 5 %	59
4.2	ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1	61
4.3	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1	62
4.4	ความเหมือนของจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 เมื่อเปรียบเทียบกับจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA ของ <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ ต่างๆ	64
4.5	เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ของส่วนในที่ได้ จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแอลบีที่ผสม 0.5 และ 3 % โซเดียมคลอไรด์ ...	71
4.6	เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ	83
4.7	เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ ผลิตได้จาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 กับสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์บางชนิด .	88
4.8	สมบัติบางประการของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ที่ผลิต จาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ต่างๆ	95
4.9	น้ำหนักโมเลกุลและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงดึงผิวชีว ภาพที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1	105

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	3
2.2 การเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น	4
2.3 โครงสร้างของกรดไมโคลิก	7
2.4 โครงสร้างของทีฮาโลสลิปิดที่ผลิตจาก <i>Rhodococcus erythropolis</i>	7
2.5 โครงสร้างของแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.6 แสดงโครงสร้างของซอบพอโรสลิปิดที่ผลิตจาก <i>Torulopsis</i> sp.	9
2.7 โครงสร้างของ rubiwettin RG1 ที่ผลิตจาก <i>Serratia rubidaea</i> ATCC 27593	10
2.8 โครงสร้างของกลูโคสลิปิดที่ผลิตจาก <i>Alcanivorax borkumensis</i> สายพันธุ์ MM1.	11
2.9 โครงสร้างของออร์นิติลิปิดที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas rubescens</i>	12
2.10 โครงสร้างของ rubiwettin R1 ที่ผลิตจาก <i>Serratia rubidaea</i> ATCC 27593	12
2.11 โครงสร้างโดยทั่วไปของฟอสโฟลิปิดที่แยกได้จากจุลินทรีย์	13
2.12 โครงสร้างของเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	15
2.13 โครงสร้างของเบซิลไมซิน L ที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> NCIB8872	16
2.14 โครงสร้างของไพลพาสตาตินที่ผลิตจาก <i>Bacillus cereus</i> BMG302-fF67	17
2.15 โครงสร้างของวิสโคซินที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas fluorescens</i>	17
2.16 โครงสร้างของไลเคนนิซิน ซี ที่ผลิตจาก <i>Bacillus licheniformis</i> PG204	18
2.17 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวบีแอล 86 ที่ผลิตจาก <i>Bacillus licheniformis</i> 86 ...	19
2.18 โครงสร้างของ Serrawettin W2 ที่ผลิตจาก <i>Serratia marcescens</i> NS25	20
2.19 โครงสร้างของอาร์โทรแฟคตินที่ผลิตจาก <i>Arthrobacter</i> sp สายพันธุ์ MIS38	20
2.20 โครงสร้างของไลเคนนิซิน เอ ที่ผลิตจาก <i>Bacillus licheniformis</i> BAS50	22
2.21 จีนที่มีความจำเป็นและกลไกการสังเคราะห์เซอร์แฟคตินจาก <i>Bacillus subtilis</i>	31
3.1 แสดงการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อ การวิเคราะห์ลำดับเบส	41
3.2 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อภายหลังทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น	43
3.3 แสดงการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ สังเคราะห์ 16S rRNA	48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.1 การเจริญและค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย ทนเค็ม 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ค่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วย อัตราการใช้ 200 รอบต่อนาที	60
4.2 ลำดับเบสของของจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1	63
4.3 รูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ของ <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอ ไรด์ 5 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการใช้ 200 รอบต่อนาที	66
4.4 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของ สารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลว 3 ชนิด ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 บ่ม บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการใช้ 200 รอบต่อนาที ..	68
4.5 การเจริญและค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบีที่แปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอ ไรด์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 $^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการใช้ 200 รอบต่อนาที	69
4.6 การเจริญและค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % ค่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการใช้ 200 รอบต่อนาที	72

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 ผลของปริมาณจุลินทรีย์ต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดย <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรปริมาณจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	74
4.8 การเจริญและค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีจุลินทรีย์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้น 1.37 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที	75
4.9 ผลของปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรตต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดย <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีจุลินทรีย์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรต บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	77
4.10 ผลของการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในรูปสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมไนเตรตต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดย <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีจุลินทรีย์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมไนเตรต 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เริ่มต้น ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรปริมาณไนโตรเจนในรูปสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมไนเตรต บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	78

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดย <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ มีสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน กลีโกลและวิตามิน แปรค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	80
4.12 ผลของอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดย <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครส 5 กรัม ต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ มีสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน กลีโกลและวิตามิน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ...	81
4.13 ผลของความเร็วยรอบในการเขย่าต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดย <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ มีสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน กลีโกลและวิตามิน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) แปรความเร็วรอบในการเขย่า เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	82
4.14 ผลของการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ BBK-1 ต่อค่าแรงดึงผิว ...	85
4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ BBK-1 กับค่าแรงดึงผิว	86
4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์กับค่าแรงดึงผิว	87
4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารลดแรงดึงผิวกับพื้นที่การกระจายน้ำมัน	89
4.18 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการลดแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1.....	91

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.19 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการลดแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1	92
4.20 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1	93
4.21 โครมาโตแกรมของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์มันซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี	96
4.22 โครมาโตแกรมของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS	97
4.23 Mass spectrum ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ A	98
4.24 Mass spectrum ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ B	101
4.25 Mass spectrum ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ C	103
4.26 โครงสร้างตามความคาดหมายของเบซิลโลไมซิน L, ไพลพาสตาติน และเซอร์แฟกตินที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1	106
4.27 ลำดับเบสของจีน <i>sfp</i> ⁰ ที่โคลนจาก <i>Bacillus subtilis</i> MI113	109
4.28 ลำดับเบสและลำดับของกรดอะมิโนของจีนขนาด 4 กิโลเบส บริเวณตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>SacI</i> ที่โคลนจาก <i>Bacillus subtilis</i> BBK-1	110
4.29 ความเหมือนของโปรตีน SFP-B กับโปรตีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ต่างๆ	111

คำย่อ

$^{\circ}\text{ซ}$	=	องศาเซลเซียส
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
ชม.	=	ชั่วโมง
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
%	=	เปอร์เซ็นต์
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
cm^2	=	ตารางเซนติเมตร
mN/m	=	มิลลินิวตันต่อเมตร
mg/l	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
M	=	โมลาร์
sec	=	วินาที
min	=	นาที
CMC	=	ค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์
γ_{CMC}	=	ค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์
CMC^{-1}	=	ค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
RT	=	Retention Time
m/z	=	ค่ามวลต่อประจุ
kb	=	กิโลเบส
ORF	=	Open Reading Frame



บทที่ 1

บทนำ

ปัญหาทางมลภาวะอันเกิดจากกระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรมเป็นปัญหาที่สำคัญประการหนึ่ง จึงมีผู้สนใจปรับปรุงกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเพื่อลดผลกระทบทางมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมให้น้อยที่สุด สาเหตุของมลพิษที่สำคัญข้อหนึ่งคือการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมการผลิต สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์เป็นสารเคมีที่มีความจำเป็นและมีความต้องการสูงในอุตสาหกรรมหลายด้าน ในปี ค.ศ.1992 มีการใช้สารลดแรงตึงผิวในสหรัฐอเมริกา มีมูลค่าประมาณ 1.7 พันล้านเหรียญ และประมาณการว่าจะเพิ่มขึ้นอีก 3-5 % ต่อปี (Lin, 1996) แต่สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Fiechter, 1992) ดังนั้นจึงมีผู้สนใจหันมาศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อนำมาใช้แทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพหมายถึง สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายชนิดตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ ไกลโคลิปิด , ไลโปเพปไทด์ , ฟอสโฟลิปิด , ไขมัน/กรดไขมัน และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เป็นต้น (Cooper และ Zajic, 1980 ; Desai และ Desai, 1993)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เนื่องจากมีความหลากหลายในชนิดและสมบัติ สามารถผลิตจากวัตถุดิบที่มีการผลิตทดแทนขึ้นใหม่ สามารถทำการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อลดต้นทุนการผลิต หรือปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพการผลิตที่ดีขึ้น นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางธรรมชาติจึงไม่มีพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม สามารถประยุกต์ใช้กับงานต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง เช่น สามารถนำไปใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ สารทำให้เกิดฟอง สารช่วยในการทำละลาย และสารลดความหนืด เป็นต้น จึงสามารถใช้แทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยา เครื่องสำอาง ปิโตรเลียมและปิโตรเคมี เป็นต้น (Fiechter, 1992)

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจในการค้นหาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานต่างๆ โดยอาจคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากธรรมชาติ จากนั้นนำมาศึกษาองค์ประกอบและสมบัติของสาร แต่การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียทนเค็มที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ยังมีไม่มาก (Cameotra และ Makkar, 1998) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ ศึกษาสมบัติของสารที่ผลิตได้และวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสาร รวมทั้งทำการโคลนจีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยคาดว่าสารลดแรง

ตั้งผิวชีวภาพที่ผลิตได้จะมีความสามารถในการลดค่าแรงดึงผิวได้เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง ซึ่งจะเป็นสมบัติที่ดีที่จะสามารถนำไปใช้เป็นสารลดแรงดึงผิวในผลิตภัณฑ์บางชนิดที่มีโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ ตลอดจนสามารถประยุกต์ใช้เป็นสารลดแรงดึงผิวในสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต ศึกษาสมบัติของสารที่ผลิตได้และวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสาร รวมทั้งทำการโคลนนิ่งที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. คัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ
2. จำแนกสกุลของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน
3. ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ
4. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ
5. ทำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์บางส่วน และวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้น

ของสาร

6. การโคลนนิ่งที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

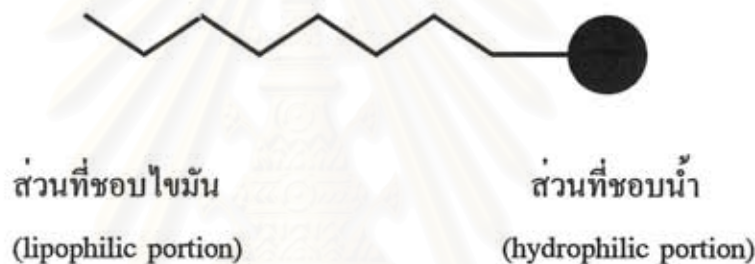
สามารถทำการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้จากแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวาง ทราบข้อมูลเกี่ยวกับสมบัติและองค์ประกอบเบื้องต้นของสาร โดยคาดว่าสารลดแรงดึงผิวที่ผลิตได้น่าจะมีสมบัติที่ดีที่จะสามารถนำมาใช้แทนสารลดแรงดึงผิวที่สังเคราะห์จากวิธีทางเคมี ตลอดจนทราบข้อมูลเกี่ยวกับเงินที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactants) หมายถึง สารลดแรงตึงผิว (surface-active molecule) ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และ รา (Cooper และ Zajic, 1980 ; Fiechier, 1992) โดยทั่วไปจะมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาธิค (amphipathic) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) แสดงดังรูปที่ 2.1 ส่วนที่ชอบไขมันจะเป็นส่วนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมัน ซึ่งอาจเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว และอาจมีหมู่ไฮดรอกซิลร่วมอยู่ด้วย สำหรับส่วนที่ชอบน้ำอาจประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ฟอสเฟต น้ำตาล หรือกรดอะมิโน

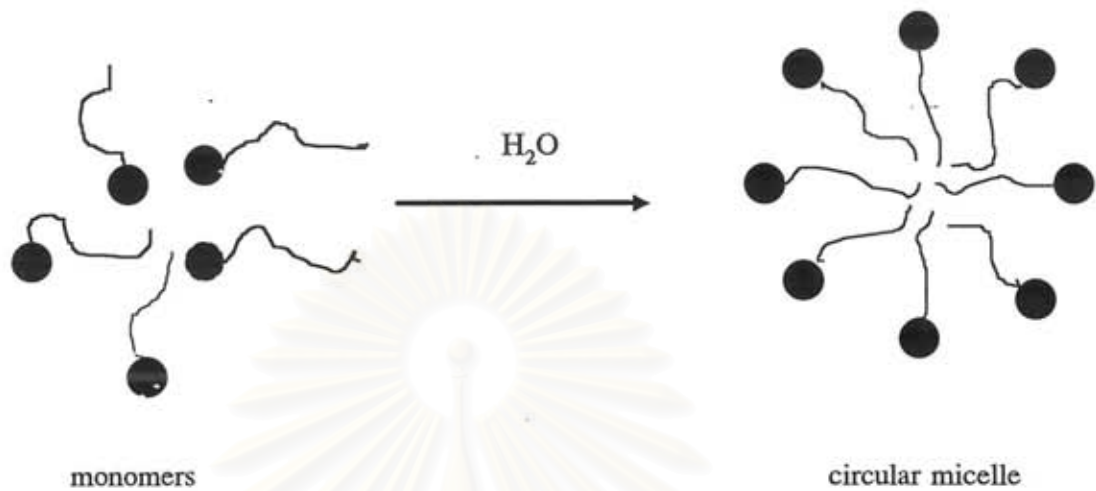


รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะ โครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Cooper, 1986)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนมากจะมีประจุสุทธิเป็นกลางหรือเป็นลบ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบนั้น อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของหมู่คาร์บอกซิลิก หมู่ฟอสเฟต หรือ หมู่ซัลเฟต เป็นต้น ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นบวกนั้น อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของหมู่แอมีน (amine) แต่เท่าที่พบมีจำนวนน้อย (Cooper, 1986)

สารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในตัวทำละลายเช่น น้ำ จะเกิดการรวมตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) โดยจะหันเอาส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอก และส่วนที่ชอบไขมันไว้ด้านใน แสดงดังรูปที่ 2.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์เรียกว่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ Critical Micelle Concentration (CMC) ซึ่งจะมีค่าจำเพาะสำหรับสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด โครงสร้างไมเซลล์ในน้ำจะอยู่ตัวเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างหมู่ไฮโดรคาร์บอนซึ่งอยู่ด้านในของไมเซลล์ แรงนี้เรียกว่า hydrophobic interaction การเกิดโครงสร้างในรูปไมเซลล์ทำให้สารลดแรงตึงผิวละลายน้ำได้ และสามารถลดแรงตึงระหว่าง

ชั้น (phase) ของสารที่มีขั้วแตกต่างกันได้ เช่น ระหว่างน้ำมันกับน้ำ อากาศกับน้ำ หรือน้ำกับของแข็ง



รูปที่ 2.2 การเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (Desai และคณะ, 1994)

2.1 วิธีการวัดการผลิตและประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1. การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) และค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันกัน (interfacial tension)

1.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) เป็นการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับอากาศ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ออกคุณภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สำคัญ มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ไดน์ (dyne) ส่วนใหญ่ใช้วิธีวัดจากส่วนไซที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ โดยถ้าจุลินทรีย์สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 40 mN/m แสดงว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ถ้าต่ำกว่า 35 mN/m แสดงว่ามีประสิทธิภาพดี (Cooper, 1986) เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp. MIS38 (Morikawa และคณะ, 1993), *Bacillus subtilis* (Arima และคณะ, 1972) และ *Bacillus licheniformis* (Yakimov และคณะ, 1995) สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้เท่ากับ 24, 27 และ 28 mN/m ตามลำดับ ซึ่งนับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีมาก

1.2 การวัดค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันกัน (interfacial tension) เป็นการวัดค่าแรงตึงระหว่างของเหลวกับของเหลว มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) เช่น การวัดค่าแรงตึงระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน, เฮกซะเดคเคน (hexadecane), น้ำมัน

ก๊าส (kerosene) เป็นต้น โดยทั่วไปค่าแรงตึงระหว่างน้ำกับเฮกซะเดคเคน และน้ำมันก๊าสมีค่าประมาณ 50 และ 30 - 40 mN/m และพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทั่วไปสามารถลดค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันกันลงได้เหลืออยู่ในช่วง 0.1- 1.0 mN/m (Gerson, 1993)

2. การเกิดอิมัลชัน (Emulsification)

การวัดการเกิดอิมัลชัน (Emulsification) เป็นการวัดความสามารถในการทำให้น้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น น้ำมัน รวมตัวกันซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์หลายชนิด โดยสารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับน้ำมัน เป็นผลทำให้น้ำมันมีสภาพเป็นหยดเล็กๆอยู่ในน้ำเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน (Cooper และ Zajic, 1980)

3. การหาค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Relative Biosurfactants Concentration (CMC⁻¹))

การหาค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นที่นิยมในการวัดหาค่าความเข้มข้นทางอ้อมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้น โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ภายหลังจากการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ ค่าความเข้มข้นของการเจือจางที่ค่าแรงตึงผิวเริ่มมีค่าเพิ่มสูงขึ้น เรียกความเข้มข้น ณ. จุดนี้ว่าค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณเริ่มต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (Cooper และคณะ, 1981 ; Sheppard และ Mulligan, 1987 ; Ghurye และ Vipulanandan, 1994)

4. การวัดประสิทธิภาพของสาร โดยวิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์

เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวรวมตัวเป็นไมเซลล์ และสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุด (Desai และคณะ, 1994 ; Lin, 1996) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใดมีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์น้อยนับว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพดี

5. วิธีไฮเพอร์มานซ์ลิควิด โครมาโตกราฟี

มีการพัฒนานำวิธีวิธีไฮเพอร์มานซ์ลิควิด โครมาโตกราฟีแบบ reversed phase มาใช้หาปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ รวดเร็ว ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย และมีความแม่นยำสูง แต่นิยมที่จะใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ ผลิตขึ้นมาใช้เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากลักษณะของโครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป (Carreru และคณะ, 1993 ; Lin และคณะ, 1993 ; Yakimov และคณะ, 1996)

นอกจากนี้ Sandrin และคณะ (1990) ; Peypoux และ Michel (1992) หาปริมาณเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* S499 โดยการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดแอสปาร์ติก ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งในส่วนเพปไทด์ด้วยวิธี dinitrophenylation ในขณะที่ Kim และคณะ (1997a) หาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ C9-BS ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* C9 ด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณของเพปไทด์ด้วยวิธีของ Bradford ในขณะที่การหาปริมาณของแรมโนลิปิดอาจใช้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลแรมโนส (Guerra-Santos และคณะ, 1984 ; 1986 ; Ramana และ Karanth, 1989 ; Zhang และ Miller, 1992 ; Patel และ Desai, 1997 ; Sim และคณะ, 1997) เป็นต้น

2.2 การจัดกลุ่มสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพอาจสามารถจัดจำแนกออกได้เป็น 6 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีได้แก่ 1. ไกลโคลิปิด (Glycolipid) 2. ลิโปเพปไทด์ (Lipopeptides) และไลโปโปรตีน (Lipoprotein) 3. กรดไขมันและไขมัน (Fatty acid and Neutral lipid) 4. ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) 5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (Polymeric Biosurfactants) และ 6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค (Particulate Biosurfactants)

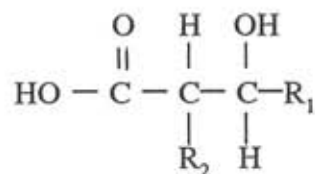
1. ไกลโคลิปิด (Glycolipid)

ไกลโคลิปิดเป็นกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับ aliphatic acid หรือ hydroxy-aliphatic acid ไกลโคลิปิดที่มีการศึกษาสมบัติในแง่ของสารลดแรงตึงผิวได้แก่

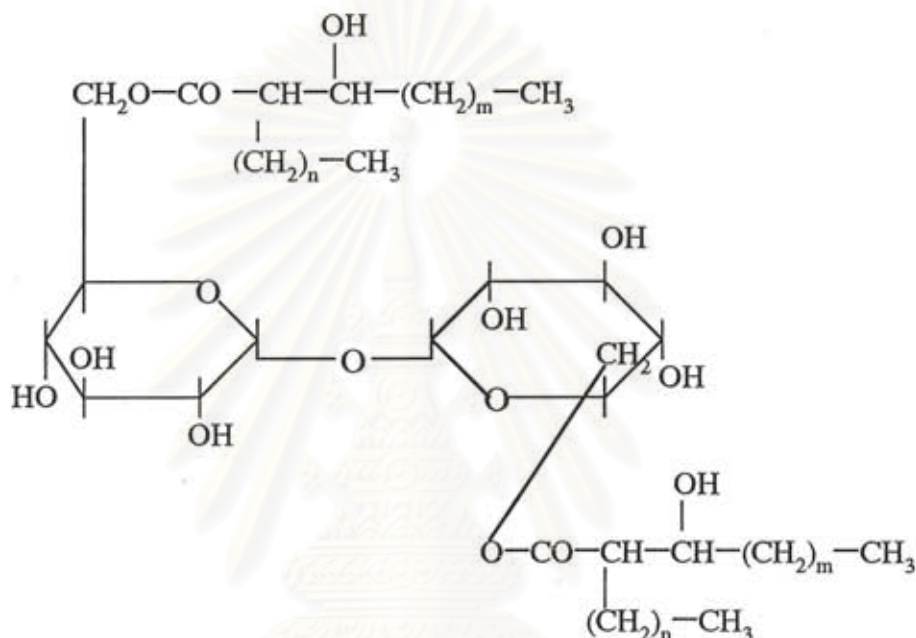
1.1 ทีฮาโลสลิปิด (Trehalose lipids)

ทีฮาโลสลิปิดสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายสกุล เช่น *Rhodococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Mycobacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp. และ *Nocardia* sp. โครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวประเภทนี้ประกอบด้วยกรดไมโคลิก (mycolic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันสายยาวที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ตรงตำแหน่งบิต้าคาร์บอน และคาร์บอนตำแหน่งแอลฟาอาจเชื่อมต่อกับหมู่อัลคิล (alkyl) อื่นๆ แสดงดังรูปที่ 2.3 โดยหมู่คาร์บอกซิลของกรดไมโคลิกนี้จะเชื่อมต่อกับน้ำตาลทีฮาโลสตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ด้วยพันธะ acyl (Rosenberg, 1986) เป็นทีฮาโลสลิปิดโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.4

ทีฮาโลสลิปิดที่ผลิตจาก *Rhodococcus erythropolis* สามารถลดแรงตึงผิว และค่าแรงตึงระหว่างผิวประจันได้เหลือ 25-30 mN/m และ 1mN/m ตามลำดับ



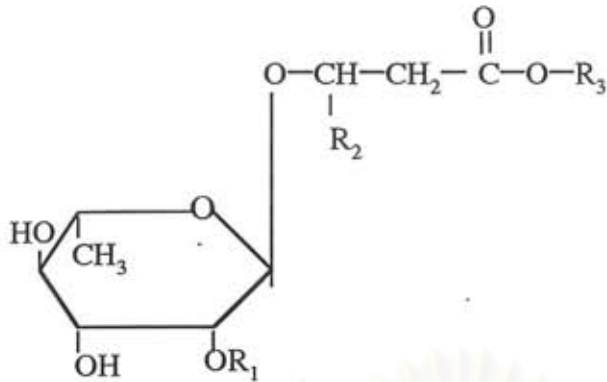
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดไมโคลิก (Cooper และ Zajic, 1980)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของทีฮาโลสลิปิดที่ผลิตจาก *Rhodococcus erythropolis* ที่ประกอบด้วยกรดไมโคลิก 2 โมเลกุลเชื่อมกับน้ำตาลทีฮาโลสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (Rosenberg, 1986)

1.2 แรมโนลิปิด (Rhamnolipids)

จุลินทรีย์ในสกุล *Pseudomonas* sp. และ *Arthrobacter* sp. สามารถผลิตแรมโนลิปิดได้หลายชนิด โครงสร้างโดยทั่วไปประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุลที่เชื่อมต่อกับกรดบีตาไฮดรอกซีเดคาโนอิก (β -hydroxydecanoic acid) 1 หรือ 2 โมเลกุล ที่ด้านปลายรีดิวซ์ (reducing end) แสดงดังรูปที่ 2.5 แรมโนลิปิด RL1 และ RL3 ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่แรมโนลิปิด RL2 และ RL4 ผลิตขึ้นในระยะพักของเซลล์ (Fiechter, 1992)



RL1, RL2 ;	R_1	= H
	R_2	= $-(CH_2)_6-CH_3$
	R_3 : (RL1)	= $\begin{array}{c} -CH-CH_2-COOH \\ \\ (CH_2)_6-CH_3 \end{array}$
	R_3 : (RL2)	= H
RL3, RL4 ;	R_1	= rhamnosyl
	R_2	= $-(CH_2)_6-CH_3$
	R_3 : (RL3)	= $\begin{array}{c} -CH-CH_2-COOH \\ \\ (CH_2)_6-CH_3 \end{array}$
	R_3 : (RL4)	= H
RL5, RL6 ;	R_1 : (RL5)	= $-CO-CH=CH-(CH_2)_6-CH_3$
	R_1 : (RL6)	= rhamnosyl-O-CO-CH=CH-(CH ₂) ₆ -CH ₃
	R_2	= $-(CH_2)_6-CH_3$
	R_3	= $\begin{array}{c} -CH-CH_2-COOH \\ \\ (CH_2)_6-CH_3 \end{array}$

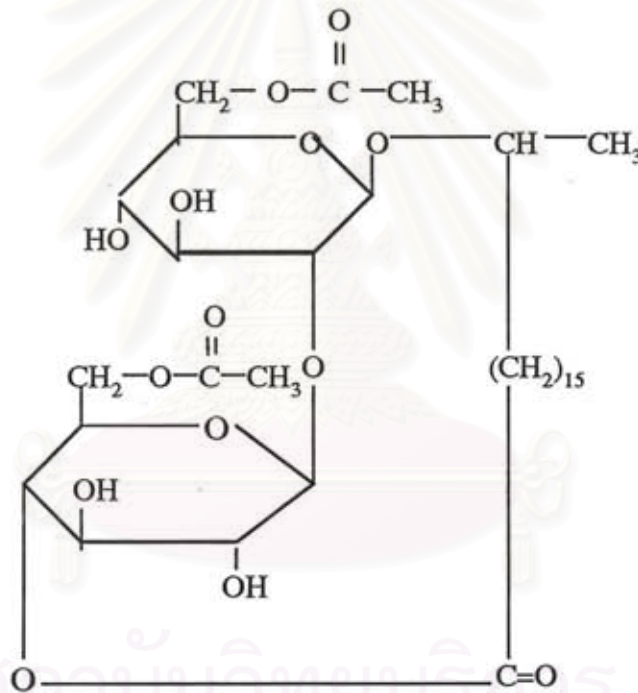
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* ตัดแปลงจาก Fiechter (1992) ; Lang และ Wallbrandt (1999)

แรมโนลิปิดนับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีชนิดหนึ่ง โดยแรมโนลิปิดบริสุทธิ์มีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ประมาณ 10-30 mg/l และสามารถลดค่าแรงตึง

ระหว่างผิวประจันของน้ำกับเฮกซาเดคเคนได้เหลือ 1 mN/m (Rosenberg, 1986) และช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper และ Zajic, 1980)

1.3 ซอบพอโรสลิปิด (Sophorose lipids)

จุลินทรีย์ในสกุล *Torulopsis* sp. หลายชนิดสามารถผลิตซอบพอโรสลิปิดได้ โครงสร้างโดยทั่วไปประกอบด้วยน้ำตาลซอบพอโรส (กลูโคส 2 โมเลกุลที่เชื่อมกันด้วยพันธะ บีต้า 1-2) เชื่อมต่ออยู่กับกรดไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิก (hydroxycarboxylic acids) สายยาวตรงตำแหน่งปลายรีดิวซ์ โดยปลายคาร์บอกซิลิกของกรดไขมันอาจเกิดการรวมตัวกับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลเกิดเป็นวงแลคโตน (lactone ring) แสดงดังรูปที่ 2.6 หรือถ้าอยู่ในรูปอิสระจะเป็นสารที่มีประจุเป็นลบ (Rosenberg, 1986)



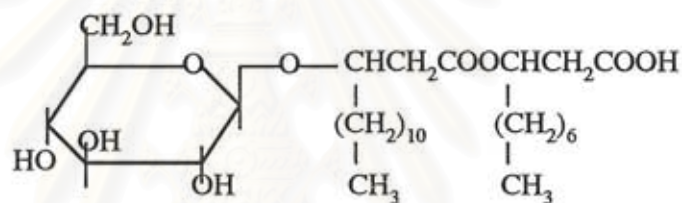
รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างของซอบพอโรสลิปิดที่ผลิตจาก *Torulopsis* sp. เมื่อปลายคาร์บอกซิลิกของกรดไขมันรวมตัวกับหมู่ไฮดรอกซีของน้ำตาลเป็นวงแลคโตน (Cooper และ Zajic, 1980)

ซอบพอโรสลิปิดนับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีชนิดหนึ่ง โดยซอบพอโรสลิปิดบริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นประมาณ 10 mg/l สามารถลดค่าแรงตึงระหว่างผิวประจันของน้ำกับเฮกซาเดคเคนลงจาก 40 mN/m เหลือ 5 mN/m และช่วยส่งเสริมการเจริญของ

จุลินทรีย์ในอาหารที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้เช่นเดียวกับทีฮาโลสลิปิด และแรมโนลิปิด แต่ไม่มีความสามารถในการก่อให้เกิดอิมัลชัน (Rosenberg, 1986)

1.4 กลูโคสลิปิด (glucoselipid)

กลูโคสลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคลิปิดชนิดใหม่กล่าวคือ Matsuyama และคณะ (1990) รายงานว่า *Serratia rubidaea* ATCC 27593 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่เรียกว่า rubiwettin RG1 จากการศึกษาคโครงสร้างทางเคมีพบว่าส่วนลิปิดประกอบด้วย β -hydroxy fatty acid ที่มีคาร์บอนจำนวน 10 และ 14 อะตอมเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ และส่วนลิปิดนี้จะเชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ด้วยพันธะไกลโคสิดิก โครงสร้างแสดงดังรูป 2.7 rubiwettin RG1 สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำลงได้เหลือ 26 mN/m



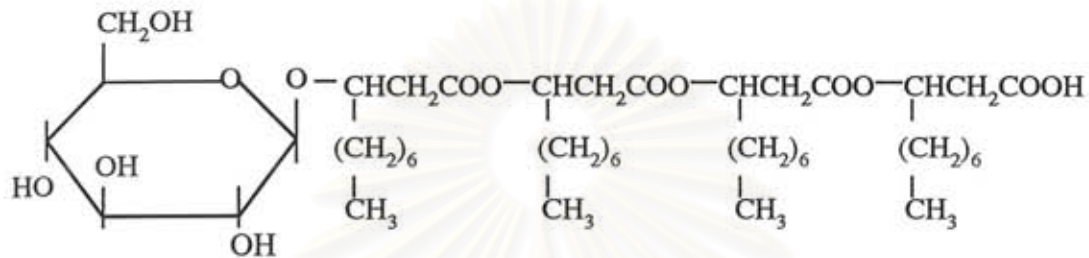
รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ rubiwettin RG1 ที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593 (Matsuyama และคณะ, 1990)

Passeri และคณะ (1992) ; Yakimov และคณะ (1998) รายงานว่า *Alcanivorax borkumensis* สายพันธุ์ MM1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ผลิตกลูโคสลิปิดที่ส่วนลิปิดประกอบด้วย β -hydroxy fatty acid ที่มีคาร์บอนจำนวน 10 อะตอมจำนวน 4 โมเลกุลที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ และส่วนลิปิดนี้จะเชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ด้วยพันธะไกลโคสิดิก โครงสร้างแสดงดังรูป 2.8 กลูโคสลิปิด MM1 ที่ความเข้มข้น 25 mg/l สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำลงได้เหลือ 30 mN/m และลดค่าแรงตึงระหว่างผิวประจันของน้ำและเฮกซะเด็กเคนได้เหลือน้อยกว่า 5 mN/m

2. ไลโปเพปไทด์ (Lipopeptides) และไลโปโปรตีน (Lipoprotein)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์นี้มักเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นร่วมด้วย (antibiotic) ตัวอย่างเช่น เซอร์แฟกติน (surfactin) หรือ ซับทีไลซิน (subtilysin) โพลีมิกซิน (polymyxins) และ ไลเคนนิซิน (lichenysin) ที่ผลิตจาก

Bacillus subtilis, *Bacillus polymyxa* และ *Bacillus licheniformis* ตามลำดับ (Rosenberg 1986) แต่ชนิดที่ได้รับการศึกษาเป็นอย่างมากคือเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* เนื่องจากเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีเยี่ยม โดยที่ปริมาณเพียง 0.005% โดยน้ำหนักสามารถลดค่าแรงตึงผิวของ 0.1 M NaHCO₃ จาก 71.6 mN/m ลงเหลือ 27.9 mN/m (Arima และคณะ, 1968)



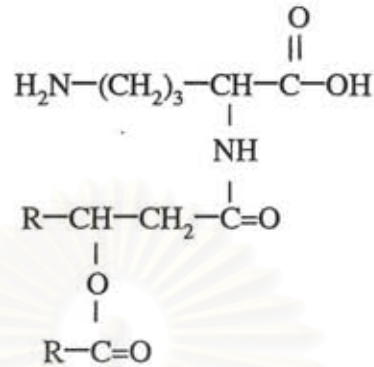
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของกลูโคสลิปิดที่ผลิตจาก *Alcanivorax borkumensis* สายพันธุ์ MM1 คัดแปลงจาก Passeri และคณะ (1992)

ออร์นิตินลิปิดเป็นสารที่ผลิตจาก *Pseudomonas rubescens* มีสมบัติในการก่ออิมัลชัน โครงสร้างโดยทั่วไปประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียงชนิดเดียวคือ ออร์นิติน (ornithine) เชื่อมต่อกับกรดบีต้าไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิก โดยกรดบีต้าไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิกยังเชื่อมต่อกับกรดคาร์บอกซิลิก อีก 1 โมเลกุลที่ตำแหน่งบีต้าไฮดรอกซีด้วยพันธะเอสเทอร์ แสดงดังรูปที่ 2.9 ออร์นิตินลิปิดมีโครงสร้างเป็น zwitterion คือมีทั้งประจุบวกและประจุลบในโมเลกุล เนื่องจากมีหมู่คาร์บอกซิลและเอไมด์อิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น *Thiobacillus thiooxidans*, *Agrobacterium temefaciens* และ *Gluconobacter cerinus* ผลิตสารที่มีโครงสร้างคล้ายออร์นิตินลิปิด โดยอาจแตกต่างกันที่ชนิดของกรดอะมิโนหรือชนิดของกรดไขมัน (Cooper และ Zajic, 1980)

3. กรดไขมันและไขมัน (Fatty acid and Neutral lipid)

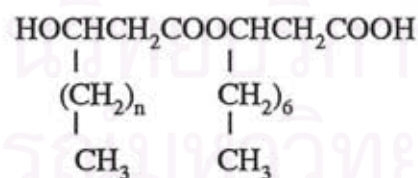
กรดไขมันและไขมันพบได้ในเซลล์จุลินทรีย์ทุกชนิด เมื่อผลิตแล้วมักปลดปล่อยออกนอกเซลล์ซึ่งประกอบด้วย กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ มีสมบัติในการลดแรงตึงผิว เช่น กรดโครีโนไมโคลิก (corynomycolic acid) ที่ความเข้มข้น 0.5 g/l สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ลงเหลือประมาณ 40 mN/m และลดค่าแรงตึงระหว่างผิวที่ประจันกันระหว่างน้ำกับเฮกซะเด็กเคนลงเหลือประมาณ 10 mN/m

ไขมัน (neutral lipid) ที่ผลิตจาก *Mycobacterium rhodochrous* ที่ความเข้มข้น 0.5 g/l สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำลงเหลือประมาณ 44 mN/m สามารถก่อเกิดอิมัลชัน และยังช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์อีกด้วย (Cooper และ Zajic, 1980)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของออร์นิตินลิปิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas rubescens* ; R แทนหมู่อัลคิล (Cooper และ Zajic, 1980)

Matsuyama และคณะ (1990) รายงานว่า *Serratia rubidaea* ATCC 27593 นอกจากจะผลิต rubiwettin RG1 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไกลโคลิปิดชนิดใหม่แล้ว ยังผลิต rubiwettin R1 ซึ่งเป็นลิปิดที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิว จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีพบว่า rubiwettin R1 เป็นสารผสมของลิปิดชนิด β -hydroxy fatty acid ที่มีคาร์บอนจำนวน 10 อะตอมเชื่อมต่อกับ β -hydroxy fatty acid ที่มีคาร์บอนจำนวน 12 , 14 หรือ 16 อะตอมด้วยพันธะเอสเทอร์ โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.10

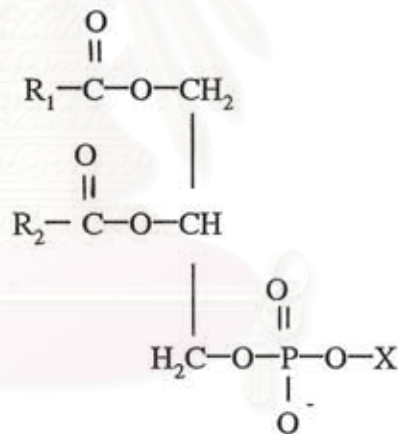


เมื่อ $n = 8, 10, 12$

รูปที่ 2.10 โครงสร้างของ rubiwettin R1 ที่ผลิตจาก *Serratia rubidaea* ATCC 27593 (Matsuyama และคณะ, 1990)

4. ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid)

ฟอสโฟลิปิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์จุลินทรีย์ แต่มีส่วนน้อยที่ปลดปล่อยออกมาสู่นอกเซลล์ หรือสามารถวัดสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิว โครงสร้างโดยทั่วไปของฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยกลีเซอรอลต่อกับกรดไขมัน 2 หมู่ และฟอสเฟต 1 หมู่ด้วยพันธะเอสเทอร์ แสดงดังรูปที่ 2.11 จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตฟอสโฟลิปิดได้ เช่น *Thiobacillus thiooxidans* ผลิตสารที่สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารจาก 72 mN/m ลงได้ถึง 49 mN/m ฟอสโฟลิปิดที่ผลิตสามารถแยกได้หลายชนิด เช่น ฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) , ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) และกรดฟอสฟาติก (phosphatidic acid) ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ที่ผลิตจาก *Rhodococcus erythropolis* มีค่า CMC เท่ากับ 30 mg/l และสามารถลดค่าแรงตึงระหว่างน้ำกับเฮกซะเด็กเคนลงเหลือน้อยกว่า 1 mN/m นอกจากนี้ยังพบการผลิตฟอสโฟลิปิดใน *Corynebacterium alkanolyticum*, *Candida tropicalis* และ *Micrococcus cerificans* เป็นต้น (Cooper และ Zajic, 1980 ; Rosenberg, 1986)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างโดยทั่วไปของฟอสโฟลิปิดที่แยกได้จากจุลินทรีย์ (Cooper และ Zajic, 1980) R_1 และ R_2 คือหมู่อัลคิล, $\text{X}=\text{H}$ เป็น กรดฟอสฟาติก, $\text{X}=\text{CH}_2\text{NH}_2$ เป็น ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน, $\text{X}=\text{อินซิทอล (inositol)}$ เป็น ฟอสฟาติดีลอินซิทอล, $\text{X}=\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2$ เป็น ฟอสฟาติดีลกลีเซอรอล

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (Polymeric Biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทนี้เป็นไบโอพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น อิมัลแซน (Emulsan) ไบโอดีสเพอร์แซน (Biodispersan) ลิโปแซน (Liposan) และชนิดอื่นๆ (Desai และ Desai, 1993) เป็นต้น

5.1 อิมัลชัน (Emulsan)

อิมัลชันเป็นสารก่อเกิดอิมัลชันที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 มีลักษณะเป็นไลโปเฮเทอโรพอลิแซ็กการไรด์ (lipoheteropolysaccharide) ที่มีประจุเป็นลบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9.9×10^5 ดาลตัน เฮเทอโรโพลิแซ็กการไรด์ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิด (1 หน่วย) ได้แก่ N-acetyl-D-galactosamine , N-acetylgalactosamine uronic acid และ N-acetyl amino acid ที่ยังไม่ทราบชนิดที่เรียงตัวซ้ำๆกัน 840 หน่วย โดยมีกรดไขมันมาเชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักด้วยพันธะโควาเลนต์ (Rosenberg, 1986) อิมัลชันเป็นสารที่ไม่มีสมบัติในการลดแรงตึงระหว่างผิวประจัน แต่เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการก่อเกิดอิมัลชันโดยใช้ปริมาณเพียง 0.001 - 0.01% ก็สามารถก่อให้เกิดอิมัลชันได้ และอิมัลชันที่เกิดขึ้นก็มีความเสถียร

5.2 ไบโอดีสเพอร์แซน (Biodispersan)

ไบโอดีสเพอร์แซนเป็นสารที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* A2 มีลักษณะเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กการไรด์ (heteropolysaccharide) ที่มีประจุเป็นลบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 51,400 ดาลตัน โครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ glucosamine , 6-methylaminohexose , galactosamine uronic acid และ amino sugar ที่ยังไม่ทราบชนิด (Desai และ Desai, 1993)

5.3 ไลโปแซน (Liposan)

ไลโปแซนเป็นสารที่ก่อให้เกิดอิมัลชันได้ดีชนิดหนึ่งที่ผลิตจาก *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 83% และโปรตีน 17% โดยส่วนคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส กาแลคโตซามีน กรดกาแลคโตยูโรนิก (Desai และ Desai, 1993)

5.4 อะลาแซน (Alasan)

Navon-Venezia และคณะ (1995) รายงานว่า *Acinetobacter radioresistens* KA53 ผลิตอะลาแซนซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดอิมัลชันชนิดใหม่ อะลาแซนมีประจุเป็นลบมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 900,000 ดาลตัน ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน โดยส่วนคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดเรียงตัวซ้ำๆกัน และมีกรดอะมิโนชนิดอะลานีนเป็นจำนวนมาก

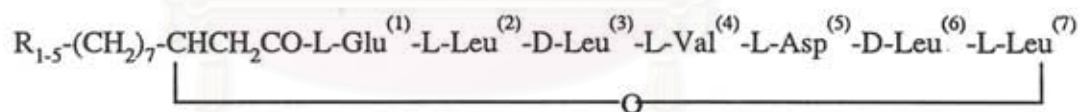
6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค (Particulate Biosurfactants)

Acinetobacter sp. H01-N ผลิต vesicles ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-50 นาโนเมตร มีความหนาแน่น 1.158 g/cm^3 vesicles ประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิปิด และไลโปโพลิแซ็กการไรด์ vesicles นี้สามารถรวมตัวกันเกิดเป็นไมโครอิมัลชัน และส่งผลต่อการนำสารประกอบอัลเคนเข้าสู่เซลล์ (Roserberg 1987) ในขณะที่ Burd และ Ward, (1996a , b , 1997)

รายงานว่ *Pseudomonas marginalis* PD-14B ผลิต spherical-shaped particales เรียกว่า PM-factor ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนและไลโปพอลิแซคคาไรด์ โดย PM-factor นี้สามารถก่อให้เกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้หลายประเภท

2.3 ความหลากหลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์

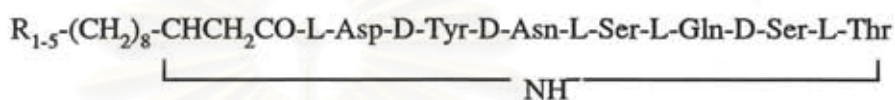
ในบรรดาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งหมดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ นับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ที่ศึกษาเป็นชนิดแรกคือ เซอร์แฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1007-1035 ดาลตัน ส่วนลิปิดหลักประกอบด้วย β -hydroxy fatty acids ที่มีกลุ่มเมทิลแบบ *iso* มีคาร์บอนจำนวน 15 อะตอม ($isoC_{15}$) และยังสร้างส่วนลิปิดที่มีคาร์บอนจำนวน 13 และ 14 อะตอม สำหรับส่วนเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ กรดกลูตามิก กรดแอสปาร์ติก วาลีน และลิวซีนในอัตราส่วน 1:1:1:4 ตามลำดับ โดยมีกรดกลูตามิกทางส่วนปลาย N-terminal และลิวซีนเป็นส่วนปลายด้าน C-terminal ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ กรดกลูตามิกจะเชื่อมต่อกับหมู่คาร์บอกซิลของลิปิด และลิวซีนเชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซิลเกิดเป็นวงแลคโตน (Arima และคณะ, 1968 Kakinuma และคณะ, 1969a,b,c,d) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.12 ต่อมาจึมีรายงานการค้นพบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไลโปเพปไทด์ชนิดใหม่และอนุพันธ์ของเซอร์แฟกตินที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.



R	MW (Da.)
R_1 (<i>iso</i> C_{13}) = $(CH_3)_2-CH-$	1007
R_2 (<i>anteiso</i> C_{13}) = $CH_3-CH(CH_3)-$	1007
R_3 (<i>normal</i> C_{14}) = $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-$	1021
R_4 (<i>iso</i> C_{15}) = $(CH_3)_2-CH-CH_2-CH_2-$	1035
R_5 (<i>anteiso</i> C_{15}) = $CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-$	1035

รูปที่ 2.12 โครงสร้างของเซอร์แฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 คัดแปลงจาก Kakinuma และคณะ (1969a,b,c,d) ; Fiechter (1992) ตัวเลขในวงเล็บแสดงลำดับของกรดอะมิโนนับจากปลาย N-terminal

Peypoux และคณะ (1984) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะในกลุ่มอิทูลิน (iturin) ที่เรียกว่าเบซิลโลไมซิน L (bacillomycin L) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* NCIB8872 เบซิลโลไมซิน L มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1020-1048 คาลตัน ส่วนเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ชนิดได้แก่ กรดแอสปาร์ติก ไทโรซีน แอสปาร์จิก กรดกลูตามิก ธีโรนีน และเซรีนในอัตราส่วน 1:1:1:1:1:2 ตามลำดับ ส่วนลิพิดประกอบด้วย β -amino fatty acids ชนิดสายตรงและชนิดที่มีกลุ่มเมทิลแบบ *iso* และ *anteiso* ที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 14 ถึง 16 อะตอม โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.13

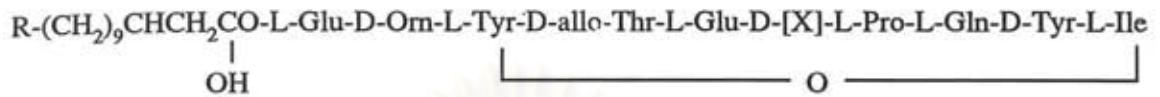


R	MW (Da.)
R_1 (normal C_{14}) = $CH_3-CH_2-CH_2-$	1020
R_2 (<i>iso</i> C_{15}) = $(CH_3)_2-CH-CH_2-$	1034
R_3 (<i>anteiso</i> C_{15}) = $CH_3-CH_2-CH(CH_3)-$	1034
R_4 (<i>iso</i> C_{16}) = $(CH_3)_2-CH-CH_2-CH_2-$	1048
R_5 (normal C_{16}) = $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$	1048

รูปที่ 2.13 โครงสร้างของเบซิลโลไมซิน L ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* NCIB8872 ดัดแปลงจาก Peypoux และคณะ (1984)

Nishikiori และคณะ (1986) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโพลีฟอสฟาตาสแตติน (plipastatins) ที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* BMG302-ff67 ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A_2 พบว่า *Bacillus cereus* BMG302-ff67 สามารถผลิตโพลีฟอสฟาตาสแตตินได้ 4 ชนิดได้แก่โพลีฟอสฟาตาสแตติน A1, A2, B1 และ B2 มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1462-1504 คาลตัน ส่วนเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 8 ชนิดได้แก่ ออร์นิติน ธีโรนีน อะลานีน (หรือวาลีน) โพรลีน ไอโซลิวซีน กรดกลูตามิก ไทโรซีน และกรดกลูตามิก ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1:1:2:2 ตามลำดับ ส่วนเพปไทด์ของโพลีฟอสฟาตาสแตติน A1 และ A2 ต่างจาก B1 และ B2 ตรงที่มีอะลานีน (89 คาลตัน) แทนที่วาลีน (117 คาลตัน) ส่วนลิพิดของโพลีฟอสฟาตาสแตติน A1 และ B1 ประกอบด้วย β -hydroxy fatty acids ชนิดสายตรงที่มีคาร์บอนจำนวน 16 อะตอม ในขณะที่ส่วนลิพิดของ

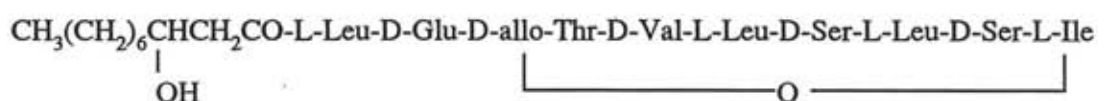
โพลีฟอสฟาตอสแตติน A2 และ B2 ประกอบด้วย β -hydroxy fatty acids ที่มีกลุ่มเมทิลแบบ *anteiso* ซึ่งมีคาร์บอนเท่ากับ 17 อะตอม โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.14 Tsuge และคณะ (1996) รายงานว่า *Bacillus subtilis* YB8 สามารถผลิตเซอร์แฟคตินและโพลีฟอสฟาตอสแตติน B1 โดยโพลีฟอสฟาตอสแตติน B1 มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแสดงสมบัติของการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



plipastatins	R	X	MW (Da.)
A1	<i>normal</i> C ₁₆ = CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	Ala	1462
A2	<i>anteiso</i> C ₁₇ = CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -	Ala	1476
B1	<i>normal</i> C ₁₆ = CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	Val	1490
B2	<i>anteiso</i> C ₁₇ = CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -	Val	1504

รูปที่ 2.14 โครงสร้างของโพลีฟอสฟาตอสแตตินที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* BMG302-ff67 คัดแปลงจาก Nishikiori และคณะ (1986)

Neu และคณะ (1990) ค้นพบว่า *Pseudomonas fluorescens* สามารถผลิตวิสโคซิน (*viscosin*) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1126 ดาลตัน ส่วนเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ชนิดได้แก่ ลิวซีน เซรีน ไอโซลิวซีน วาลีน กรดกลูตามิก และธรีโอนีน ในอัตราส่วน 3:2:1:1:1:1 ตามลำดับ ส่วนลิปิดประกอบด้วย β -hydroxy fatty acids ชนิดสายตรงที่มีคาร์บอนจำนวน 10 อะตอม โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.15 วิสโคซินมีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์เท่ากับ 150 mg/l และสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เหลือ 26.5 mN/m

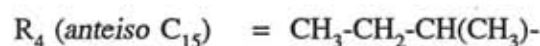
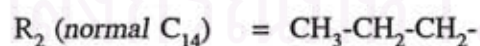
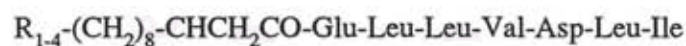


รูปที่ 2.15 โครงสร้างของวิสโคซินที่ผลิตจาก *Pseudomonas fluorescens* (Neu, 1996)

นอกจากนี้ *Pseudomonas fluorescens* ยังผลิตสารประเภทไลโปเพปไทด์อีกชนิดหนึ่งซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าวิสโคซิน ส่วนเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดได้แก่ ลิวซีน วาลีน และ โพรลีน ในอัตราส่วน 1:1:6 ตามลำดับ ไลโปเพปไทด์ชนิดนี้สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้เหลือ 38.5 mN/m

Baumgart และคณะ (1991) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเซอร์แฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 และ OKB105 พบว่า *Bacillus subtilis* สร้างเซอร์แฟกตินทั้งหมด 3 ชนิด โดยชนิดที่มีปริมาณมาก (70-80%) มีโครงสร้างที่เหมือนกับเซอร์แฟกตินตามรายงานของ Kakinuma และคณะ (1969a,b,c,d) ส่วนอนุพันธ์อีก 2 ชนิดซึ่งมีปริมาณประมาณ 10-20% เรียกว่าเซอร์แฟกติน บี และเซอร์แฟกติน ซี ในส่วนของเพปไทด์กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 7 เปลี่ยนจากลิวซีนเป็นวาลีนและไอโซลิวซีนตามลำดับ

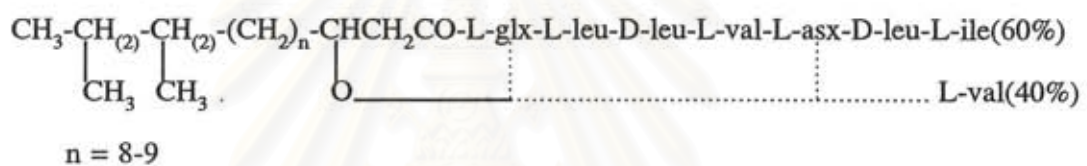
Jenny และ คณะ (1991) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ ไลเคนนิซิน ซี (lichenysin C) ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* PG204 พบว่าส่วนลิปิดประกอบด้วย β -hydroxy fatty acids ที่มีกลุ่มเมทิลแบบ *iso* และ *anteiso* จำนวน 4 ชนิดที่มีคาร์บอนเท่ากับ 14 และ 15 อะตอม ส่วนเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ชนิดได้แก่ กรดกลูตามิก กรดแอสปาร์ติก วาลีน ลิวซีน และไอโซลิวซีนในอัตราส่วน 1:1:1:3:1 ตามลำดับ โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.16 โดยส่วนเพปไทด์และส่วนลิปิดแตกต่างจากเซอร์แฟกตินตรงตำแหน่งของลิวซีนลำดับที่ 7 ถูกแทนที่ด้วยไอโซลิวซีน และไม่พบส่วนลิปิดที่มีคาร์บอน 13 อะตอมดังเช่นที่พบในเซอร์แฟกติน ไลเคนนิซิน ซี นับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพดีชนิดหนึ่ง เนื่องจากไลเคนนิซิน ซี ปริมาณ 15 mg/l สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ลงเหลือ 27 mN/m



รูปที่ 2.16 โครงสร้างของไลเคนนิซิน ซี ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* PG204 ดัดแปลงจาก

Jenny และคณะ (1991)

Horowitz และ Griffin (1991) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวบีแอล 86 (surfactant BL86) ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* 86 พบว่าสารลดแรงตึงผิวนี้เป็นส่วนผสมของไลโปเพพไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 979-1091 คาลตัน โดยมีขนาดเพิ่มขึ้นทีละ 14 คาลตันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของหมู่เมธิลีน (-CH₂-) หรือความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง วาลีน (117 คาลตัน) กับ ไอโซลิวซีน (131 คาลตัน) ส่วนเพพไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ชนิดได้แก่ กรดกลูตามิกหรือกลูตามีน กรดแอสปาดิกหรือแอสปารากีน วาลีน ลิวซีน และไอโซลิวซีน ในอัตราส่วน 1.0:1.0:1.4:3.0:0.6 ตามลำดับ และ 40% ของโมเลกุลประกอบด้วยวาลีน แทนที่ ไอโซลิวซีน (60%) สำหรับส่วนลิปิดประกอบด้วยลิปิดชนิดสายตรงและโซ่กิ่ง ตำแหน่งของวงแลคโตนอาจเกิดขึ้นจากหมู่ไฮดรอกซิลของ β -hydroxy fatty acids เชื่อมต่อกับหมู่คาร์บอกซิลในส่วนเพพไทด์ โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.17

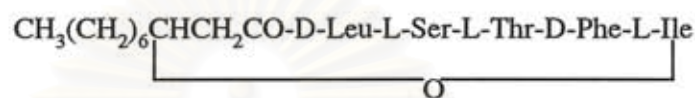


รูปที่ 2.17 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวบีแอล 86 ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* 86 (Horowitz และ Griffin, 1991)

จากการศึกษาความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวบีแอล 86 พบว่า ส่วนของสารลดแรงตึงผิวบีแอล 86 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1007 , 1021 , 1035 , 1049 และ 1063 คาลตันสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ลงเหลือ 27 , 28 , 36 , 34 และ 27 mN/m ตามลำดับ และส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวบีแอล 86 มีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์เท่ากับ 10 mg/l

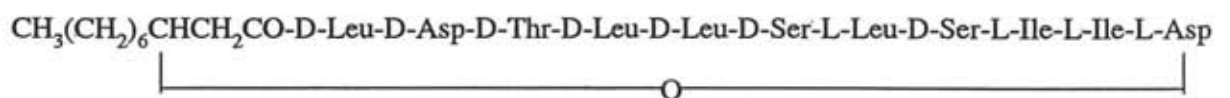
Peypoux และคณะ (1991) รายงานว่า *Bacillus subtilis* S499 ผลิตเซอร์แฟกตินที่มีส่วนเพพไทด์แตกต่างกัน 2 ชนิด กล่าวคือ เซอร์แฟกติน เอส 1 มีโครงสร้างที่เหมือนกับเซอร์แฟกตินเดิม โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1007, 1021 และ 1035 คาลตัน เนื่องจากส่วนลิปิดประกอบด้วยคาร์บอน 13 , 14 และ 15 อะตอมตามลำดับ ส่วนเซอร์แฟกติน เอส 2 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเซอร์แฟกตินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 993 , 1007 และ 1021 คาลตัน ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเซอร์แฟกติน เอส 1 อยู่ชนิดละ 14 คาลตันเนื่องจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 7 เปลี่ยนจากลิวซีน (131 คาลตัน) เป็นวาลีน (117 คาลตัน) เช่นเดียวกับเซอร์แฟกติน บี ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC21332 (Baumgart และคณะ, 1991)

Matsuyama และคณะ (1992) รายงานว่า *Serratia marcescens* NS25 ผลิต Serrawettin W2 ซึ่งเป็นสารประเภทไลโปเพปไทด์ที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิว โดยสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำลงได้เหลือ 33.9 mN/m จากการศึกษาคโครงสร้างทางเคมีของ Serrawettin W2 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 731 ดาลตัน ส่วนลิปิดเป็น β -hydroxy fatty acids ชนิดสายตรงที่มีคาร์บอนจำนวน 10 อะตอม ส่วนเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ชนิดได้แก่ ลิวซีน เซรีน ธีโรนีน ฟีนอลานีล และ ไอโซลิวซีน ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 โครงสร้างของ Serrawettin W2 ที่ผลิตจาก *Serratia marcescens* NS25 (Matsuyama และคณะ, 1992)

Morikawa และคณะ (1993) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของอาร์โทรแฟคติน (arthrofactin) ซึ่งผลิตจาก *Arthrobacter* sp สายพันธุ์ MIS38 พบว่าเป็นสารไลโปเพปไทด์ชนิดใหม่ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1354 ดาลตัน ส่วนลิปิดเป็น β -hydroxy fatty acids ชนิดสายตรงที่มีคาร์บอนจำนวน 10 อะตอมซึ่งเป็นลิปิดที่มักพบโดยทั่วไปภายในเซลล์ สำหรับส่วนเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ชนิดได้แก่ กรดแอสปาทิก ธีโรนีน เซรีน ไอโซลิวซีน และ ลิวซีน ในอัตราส่วน 2:1:2:2:4 ตามลำดับ โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.19 อาร์โทรแฟคตินมีประสิทธิภาพดีกว่าเซอร์แฟคตินที่ใช้ในงานวิจัยนี้ประมาณ 6 เท่า เนื่องจากมีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์เท่ากับ 13.5 mg/l ในขณะที่เซอร์แฟคตินมีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์เท่ากับ 72.5 mg/l และอาร์โทรแฟคตินที่ความเข้มข้น 135.5 mg/l สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ลงเหลือ 24 mN/m จากการทดสอบการกระจายน้ำมันพบว่าอาร์โทรแฟคตินมีความสามารถในการกระจายน้ำมันได้ดีกว่า Triton X-100 และ Sodium dodecyl sulfate ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ จึงนับได้ว่าอาร์โทรแฟคตินเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ที่มีประสิทธิภาพดีชนิดหนึ่ง



รูปที่ 2.19 โครงสร้างของอาร์โทรแฟคตินที่ผลิตจาก *Arthrobacter* sp สายพันธุ์ MIS38 (Morikawa และคณะ, 1993)

Peypoux และคณะ (1994) รายงานว่า *Bacillus subtilis* S499 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะลานีนเป็นแหล่งไนโตรเจน จะผลิตอนุพันธ์ชนิดใหม่ของเซอร์แฟคตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าเซอร์แฟคติน 28 คาลตันเนื่องจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 เปลี่ยนจากวาซีน (117 คาลตัน) เป็นอะลานีน (89 คาลตัน) อนุพันธ์ของเซอร์แฟคตินชนิดนี้มีความสามารถในการลดแรงดึงผิวที่ต่ำกว่าเซอร์แฟคตินซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อความสามารถในการลดแรงดึงผิว สามารถใช้เป็นข้อมูลในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อไป

Lin และคณะ (1994a) ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของไลเคนนิซิน บี (lichenysin B) ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* JF-2 (ATCC3097) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 1035 คาลตัน ส่วนลิปิดประกอบด้วย β -hydroxy fatty acids ชนิดสายตรงและชนิดที่มีกลุ่มเมทิลแบบ *iso* และ *anteiso* มีคาร์บอนจำนวน 15 อะตอมเชื่อมอยู่กับส่วนเพพไทด์ที่มีกรดอะมิโนเหมือนกับเซอร์แฟคตินไลเคนนิซิน บี มีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลส์เท่ากับ 10 mg/l

Yakimov และคณะ (1995, 1999) รายงานว่า *Bacillus licheniformis* BAS50 ผลิตไลเคนนิซิน เอ (lichenysin A) ซึ่งเป็นสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพพไทด์ชนิดใหม่ ส่วนของลิปิดประกอบด้วย β -hydroxy fatty acids ชนิดสายตรงและชนิดที่มีกลุ่มเมทิลแบบ *iso* และ *anteiso* จำนวน 14 ชนิด ที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 12 ถึง 17 อะตอม สำหรับส่วนเพพไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ชนิด ได้แก่ กลูตามีน, กรดแอสปาร์ติก, วาซีน, ไอโซลิวซีน และลิวซีนในอัตราส่วน 1:1:1:1:3 ตามลำดับ โดยเป็นสารลดแรงดึงผิวประเภทไลโปเพพไทด์ชนิดแรกที่มีกลูตามีน (146 คาลตัน) แทนที่กรดกลูตามิก (147 คาลตัน) จึงทำให้ไลเคนนิซิน เอ มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าเซอร์แฟคตินอยู่ 1 คาลตัน โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.20

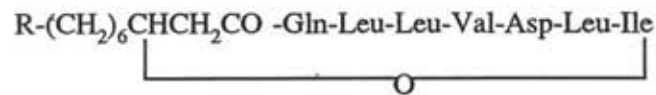
การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงดึงผิวของส่วนผสมไลเคนนิซิน เอ ซึ่งมีส่วนลิปิดแตกต่างกันพบว่าส่วนผสมไลเคนนิซิน เอ ที่มีส่วนลิปิดเป็นชนิดสายตรงและมีคาร์บอนจำนวน 14 อะตอม ($n C_{14}$) ในปริมาณสูงมีประสิทธิภาพในการลดแรงดึงผิวที่ดีกว่าส่วนผสมไลเคนนิซิน เอ ที่มีส่วนลิปิดเป็นชนิด *iso C_{14}*, *iso C_{15}* และ *anteiso C_{15}* โดยมีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลส์เท่ากับ 12 mg/l และสามารถลดแรงดึงผิวของน้ำลงเหลือ 28 mN/m (Yakimov และคณะ, 1996)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

1. แหล่งคาร์บอน

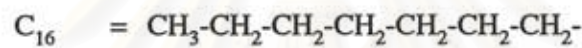
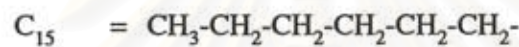
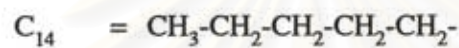
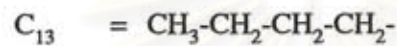
แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตและโครงสร้างของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป

ขึ้นกับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์นำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งอาจแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

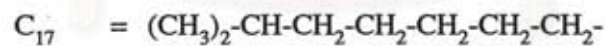
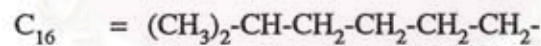
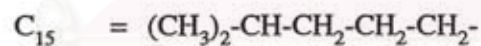
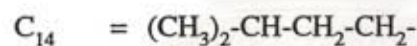
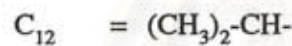


R =

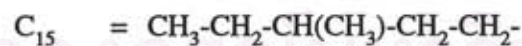
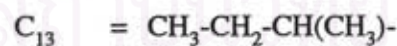
normal



iso



anteiso



รูปที่ 2.20 โครงสร้างของไลเคนนิจีน เอ ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* BAS50 คัดแปลงจาก Yakimov และคณะ (1995, 1999)

1. สารประกอบที่ละลายน้ำได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล์ เป็นต้น ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ในสกุล *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas*

sp. ตัวอย่างเช่น การผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ กลูโคส กลีเซอรอล และ แมนนิทอล เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ (Ramana และ Karanth, 1989) Roubin และ Mulligan (1989) พบว่าการเติมซิงค์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ขณะที่ Sandrin และคณะ (1990) รายงานว่าการผลิตเซอร์แฟคตินโดย *Bacillus subtilis* S499 จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้ กลูโคส ฟรุกโตส หรือ ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ถ้าใช้ แลคโตส กลีเซอรอล ซอบิทอล แมนนิทอล หรือ แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณการผลิตเซอร์แฟคตินจะลดลง

2. สารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ เช่น สารประกอบไฮโดรคาร์บอน ไขมันและกรดไขมัน เป็นต้น แหล่งคาร์บอนประเภทนี้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ในสกุล *Pseudomonas* sp. เช่น น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 และชนิดของแรมโนลิปิดจะเปลี่ยนแปลงไปขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ เช่น เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนจุลินทรีย์จะผลิตแรมโนลิปิดได้เพียง 2 ชนิด (Robert และคณะ, 1989) ขณะเดียวกันจากการศึกษาโดย Cooper และคณะ (1981) ; Sandrin และคณะ (1990) และ Kim และคณะ (1997a) พบว่าแหล่งคาร์บอนประเภทนี้เช่น เฮกซาเดเคน มีผลยับยั้งการผลิตเซอร์แฟคติน และสารประกอบอัลเคนที่มีคาร์บอน 10 และ 12-16 อะตอม จะยับยั้งการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 ได้ (Robert และคณะ, 1989)

จุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ประเภทร่วมกันสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตัวอย่างเช่น *Bacillus* sp. AB-2 ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีเมื่อใช้กลูโคสและกรดโอลิอิกเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกัน (Banat, 1993) Deshpande และ Daniels (1995) รายงานว่าการผลิตซอบโพโรสลิปิดจาก *Candida bombicola* ATCC 22214 จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้ กลูโคสและไขมันสัตว์เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปอินทรีย์สารเช่น คาร์บอนไดออกไซด์ สำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นจากการศึกษาของ Morikawa และ Imanaka (1993) พบว่า *Pseudomonas* sp. HD-1 สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและสามารถสะสมสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไว้ภายในเซลล์ โดยสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นเพื่อใช้ในการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์

2. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตและโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมอาจอยู่ในรูป

ของอินทรีย์สารหรืออินทรีย์สารขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ และชนิดของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น แอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซอร์แฟคติน (Cooper และคณะ, 1981 ; Roubin และ Mulligan, 1989 ; Sen, 1997) และไลเคนนิซิน (Lin และคณะ, 1993) ขณะที่โซเดียมไนเตรทจะเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์สารที่เหมาะสมต่อการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* (Arino และคณะ, 1996 ; Guerra-Santose และคณะ, 1984 ; Ramana และ Karanth, 1989 ; Robert และคณะ, 1989 ; Sim และคณะ, 1997)

แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตและโครงสร้างของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุลของ *Bacillus* sp. เป็นส่วนใหญ่ จากการศึกษาพบว่ากรดอะมิโนในส่วนของเพปไทด์ของเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* S499 สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อชนิดกรดอะมิโนที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเปลี่ยนไป เช่นการผลิตเซอร์แฟคตินที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 7 เปลี่ยนจากลิซีนเป็นวาเลอีนจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ แอล-วาเลอีน หรือ แอล-ไอโซลิซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน (Peypoux และ Michel, 1992) Sandrin และคณะ (1990) รายงานว่าการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* S499 จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้ บีตา-อะลานีน, แอล-กลูตามิก, แอล-วาเลอีน หรือ แอล-ไลซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ขณะเดียวกันการผลิตไลเคนนิซิน เอ จาก *Bacillus licheniformis* BAS50 จะเพิ่มขึ้น 2 และ 4 เท่าเมื่อใช้ แอล-กลูตามิก และแอล-แอสปาราจินเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแอมโมเนียไนเตรทตามลำดับ และการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนนี้ยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดของลิปิดที่เป็นองค์ประกอบของไลเคนนิซิน เอ (Yakimov และคณะ, 1996)

นอกจากนี้ปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพต้องได้สัดส่วนกับการบ่ม กล่าวคือต้องมีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยส่วนมากถ้าอัตราส่วนนี้มีค่ามาก หรือจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะทำให้การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น ตัวอย่างเช่นการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 var RC II จะลดลงเมื่อมีปริมาณไนโตรเจนสูงขึ้น โดยปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เอนไซม์กลูตามินซินที่ทดสอบลดลง (Mulligan และ Gibbs, 1989) Guerra-Santose และคณะ (1984) รายงานว่าการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 18 และการผลิตจะลดลงเมื่อค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนต่ำหรือสูงกว่านี้ เช่นเดียวกับการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 ที่พบว่าค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดเท่ากับ 38 (Ramana และ Karanth, 1989) การจำกัดปริมาณไนโตรเจนนอกจากจะมีผล

ต่อการผลิตแล้ว ยังส่งผลทำให้องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้อีกด้วย (Desai และ Banat, 1997)

3. แหล่งเกลือแร่และวิตามิน

เกลือแร่และวิตามินเป็นปัจจัยที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญนอกเหนือจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้นหรือยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เกลือแร่ที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ แมงกานีส แมกนีเซียม เหล็ก และฟอสฟอรัส (Fiechter, 1992 ; Kim และคณะ, 1997a ; Sen, 1997) จากการศึกษาของ Cooper และคณะ (1981) พบว่าการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการเติมเกลือของเหล็ก และแมงกานีส ในขณะที่การควบคุมความเข้มข้นของเหล็ก ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แคลเซียม โปตัสเซียมและโซเดียมที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 (Guerra-Santose และคณะ, 1984 ; 1986) ในทางตรงกันข้ามการเติมเกลือของเหล็ก จะยับยั้งการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 (Ramana และ Karanth, 1989) และการเติมแคลเซียม และโซเดียมไม่มีผลต่อการผลิตเซอร์แฟคติน C9-BS จาก *Bacillus subtilis* C9 (Kim และคณะ, 1997a) ขณะที่โซเดียมมีผลยับยั้งการผลิตไลเคนินจันจาก *Bacillus licheniformis* JF-2 ในระดับขวดเขย่า (Lin และคณะ, 1993) แต่ช่วยเพิ่มการผลิตได้เมื่อทำการเลี้ยงในถังหมัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของปริมาณออกซิเจนในภาวะของการเลี้ยงเชื้อ (Lin และคณะ, 1994b)

นอกจากนี้แหล่งเกลือแร่และวิตามินชนิดอินทรีย์เช่นสารสกัดจากยีสต์ ไม่มีผลต่อการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (Cooper และคณะ, 1981) และยับยั้งการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 (Guerra-Santose และคณะ, 1984) แต่จะช่วยเสริมการผลิตเซอร์แฟคติน C9-BS และซอบพอโรสลิปิด ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* C9 และ *Torulopsis apicola* IMET 43747 ตามลำดับ (Kim และคณะ, 1997a ; Hommel และคณะ, 1987)

4. ปัจจัยทางกายภาพ

ปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ พีเอชเป็นปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และในการผลิตนิยมทำการควบคุมค่าพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จากการศึกษาของ Guerra-Santose และคณะ (1984) พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตแรมโนลิปิดเท่ากับ 6.25 ถ้าค่าพีเอชต่ำหรือสูงกว่านี้จะทำให้การผลิตแรมโนลิปิดลดลง

อย่างชัดเจน ในขณะที่การผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. ค่าพีเอชที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 8.0-8.5 (ธนขวัญ นุชบัน, 2539 ; บงกช สุทธิวาณิชกุล, 2540 ; Kim และคณะ, 1997a) การผลิตซอบพอโรสลิปิดจาก *Candida bombicola* ATCC 22214 จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อควบคุมค่าพีเอชให้เท่ากับ 3.4 (Deshpande และ Daniels, 1995)

อุณหภูมินอกจากจะเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแล้วยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพบางชนิด เช่น ส่วนของไขมันของอิมัลชันที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 จะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อทำการแปรอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อ (Kim และคณะ, 1997b) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น *Arthrobacter protophormiae* ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 10 °C (Prathi และ Cameotra, 1997) Guerra-Santose และคณะ (1986) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 อยู่ในช่วง 31-34 °C โดยอุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงกว่านี้จะทำให้การผลิตลดลง ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. (Kim และคณะ, 1997a ; Sen และ Swaminathan, 1997) ในขณะที่ *Bacillus* sp. บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 °C (Banat, 1993 ; Gurjar และคณะ, 1995 ; Lin และคณะ, 1993 ; Yakimov และคณะ, 1995)

อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศเป็นปัจจัยที่สำคัญ จากการศึกษาของ Sheppard และ Cooper (1990) พบว่าการให้อากาศเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 และการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* DSM 3256 จะเพิ่มสูงขึ้นถ้ามีอัตราการกวนที่ต่ำและเพิ่มอัตราการให้อากาศให้สูงขึ้น (Sen และ Swaminathan, 1997) ในทางตรงกันข้ามการจำกัดปริมาณออกซิเจนจะทำให้การผลิตไลเคนนิซิน และเซอร์แฟคติน C9-BS เพิ่มสูงขึ้น (Lin และคณะ, 1994b ; Kim และคณะ 1997a)

2.5 การทำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร

วิธีการที่นิยมในการทำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ ประกอบไปด้วยขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ ขั้นแรกเป็นการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก แอมโมเนียมซัลเฟต หรือ ไควเลนท์แคทอออนบางชนิด แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบต่างๆ เช่น โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography) โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) เรซินที่นิยมใช้คือซิลิกาเจล (silica gel) โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) ตัวอย่างเช่น ดีอีเอตี-เซฟาโรส (DEAE-

Sepharose) โครมาโตกราฟีแบบคัดแยกขนาดโมเลกุล (gel permeation chromatography) จากนั้นนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องไฮเพอร์มานซ์ลิวคโครมาโตกราฟี วิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นด้วยวิธีอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตเมทรี วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีแมสสเปกโทรเมทรี วิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันด้วยวิธีแกสลิควิดโครมาโตกราฟี - แมสสเปกโทรเมทรี หรือนิวเคลียร์แมกเนติกเรซอนานซ์ และวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนหรือนิวเคลียร์แมกเนติกเรซอนานซ์ ตัวอย่างการทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์โดยนักวิทยาศาสตร์กลุ่มต่างๆ ได้แก่

Arima และคณะ (1968) ทำเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยปรับค่าความเป็นกรด - ด่างของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 2 ทำการตกตะกอนซ้ำด้วยแคลเซียมคลอไรด์ แล้วทำการสกัดด้วยอีเทอร์ จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ผ่งถ่านเพื่อกำจัดสีส่วนเกิน ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคัดแยกขนาดโมเลกุล โดยใช้ Sephadex LH 20 เป็นเรซิน

Mulligan และ Gibbs (1990) รายงานว่าสามารถใช้วิธีอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) เพียงขั้นตอนเดียวในการทำเซอร์แฟคตินและแรมโนลิปิดจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น โดยสามารถกำจัดสารส่วนเกินอื่นๆ เช่น เกลือ กรดอะมิโนอิสระ และโปรตีนที่มีขนาดเล็กอื่น ๆ ออกได้โดยง่ายและไม่เกิดการสูญเสียของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Jenny และคณะ (1991) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของไลเคนนิซิน ซี ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* PG 204 ขั้นตอนแรกทำการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์ Amberlite XAD-7 โดยมีเอทิลเอสเตอร์เป็นเรซิน ทำส่วนไขมันให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ โดยมีซิลิกาเจลเป็นเรซิน ทำการชะด้วยตัวชะที่มีความแรงของขั้วเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับได้แก่ $\text{CHCl}_3 > \text{CH}_3\text{COCH}_3 > \text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} (2:1) > \text{CH}_3\text{OH}$ พบว่าสารลดแรงตึงผิวที่ถูกชะออกมาในส่วนของ $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ และ CH_3OH จะมีปริมาณและประสิทธิภาพสูงสุด จึงนำส่วนนี้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้ DEAE- Sepharose CL6B เป็นเรซิน พบว่าสารลดแรงตึงผิวจะถูกชะออกมาในพีคเดียว เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องไฮเพอร์มานซ์ลิวคโครมาโตกราฟีพบว่าประกอบด้วย 2 พีค ในอัตรา 2.1:1 และเมื่อนำสารใน 2 พีคมาวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางพบว่ามีค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากันแสดงให้เห็นว่าสารนี้มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกัน

Peypoux และคณะ (1991,1994) รายงานว่าสามารถใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง ซึ่งมีซิลิกาเจล 60 เป็นเรซิน ในการแยกอนุพันธ์ของเซอร์แฟคติน 2 ชนิดที่กรดอะมิโนใน

ตำแหน่งที่ 4 เปลี่ยนวาซีนเป็นอะลานีน และกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 7 เปลี่ยนจากลิวซีนเป็นวาซีนออกจากเซอร์แฟคตินมาตรฐาน โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ประกอบด้วย chloroform / methanol / propan-1-ol / 0.25%KCl / ethyl acetate (25 : 13 : 25 : 9 : 15 v/v) และ butanol / acetone / water (32 : 48 : 8 v/v) ตามลำดับ

Imanaka และคณะ (1994) ทำการแยกอาร์โทรแฟคตินโดยนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาทำให้เข้มข้นประมาณ 10 เท่าด้วยวิธีอุตราฟิลเตรชัน แล้วทำการตกตะกอนด้วยการเติมแคลเซียมคลอไรด์และกรดไฮโดรคลอริก นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วทำการสกัดส่วนไขมันด้วยเฮกเซนหรือเอทิลเอซิเตท หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับโดยใช้ซิลิกาเจล จี 200 เป็นเรซิน และวิธีไฮเพอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

2.6 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนอกจากจะมีความหลากหลายในชนิดแล้ว ยังพบว่า เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีสมบัติหลากหลาย อาจสามารถสรุปสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดังนี้

1. มีความสามารถในการลดแรงตึงผิว ลดค่าแรงตึงระหว่างผิวประจัน สามารถทำให้เกิดอิมัลชัน (Cooper และ Zajic , 1980) ตลอดจนมีความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Morikawa และคณะ , 1993) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีประสิทธิภาพดีและใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ กล่าวคือโดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ประมาณ 10 ถึง 40 เท่า (Desai และ Banat, 1997) ตลอดจนมีความเป็นพิษต่ำและถูกย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางธรรมชาติ จึงไม่มีพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Fiechter, 1992)

2. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลายชนิดมีสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะ โดยพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่นเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* (Rosenberg , 1986) ไลเคนินที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* (Jenny และคณะ , 1991 ; Yakimov และคณะ , 1995) แรมโนลิปิด วิซโคซินที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. (Itoh และคณะ, 1971 ; Neu และคณะ, 1990) และไกลโคลิปิดที่ผลิตจาก *Torulopsis apicola* (Hommel และคณะ, 1987)

3. เซอร์แฟคตินสามารถทำให้เกิดการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง โพรโตพลาสต์และสเฟียโรพลาสต์ของแบคทีเรีย สามารถยับยั้งการแข็งตัวของไฟบริน (Arima และคณะ , 1968) สามารถรักษาและป้องกันอาการ hypercholesterolemia ช่วยยับยั้งการสูญเสียประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะบางชนิด (Arima และคณะ , 1972) ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Kameda , 1974) ช่วยเพิ่ม

ประสิทธิภาพการทำงานของสารต่อต้านเชื้อรา (Thimon และคณะ , 1992a) นอกจากนี้ยังพบว่า เซอร์แฟคตินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclic AMP phosphodiesterase (อ้างถึงใน Vollenbroich และคณะ , 1997) และเอนไซม์ alkaline phosphatase (Bortolato , 1997)

4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำการปรับปรุงเพิ่มประสิทธิภาพให้สูงขึ้นได้ เช่น Thimon และคณะ (1992b) รายงานว่าเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* S499 จะมีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้นด้วยการเติมแคทอิออนในสารละลายของเซอร์แฟคติน ซึ่งจะทำการลดค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลลดลงจาก 240 mg/l เหลือเพียง 8-90 mg/l ขึ้นกับชนิดและปริมาณของแคทอิออน ขณะเดียวกันพบว่าเมื่อนำเซอร์แฟคตินนี้มาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน จะได้เซอร์แฟคตินที่หมู่คาร์บอกซิลของแขนงข้างในกรดกลูตามิกเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ (surfactin-Glu- γ -methyl ester) เซอร์แฟคตินนี้มีค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลลดลงเหลือเพียง 30 mg/l และความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย (Thimon และคณะ , 1994)

Kim และคณะ (1997b) ; Gorkovenko และคณะ (1997) รายงานว่าอิมัลชันที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 จะมีประสิทธิภาพในการก่ออิมัลชันเพิ่มขึ้นเมื่อโครงสร้างในส่วนของไขมันเปลี่ยนแปลงไป โดยสามารถคัดแปลงส่วนของลิปิดของอิมัลชันด้วยการเปลี่ยนชนิดของกรดไขมันที่ใช่เป็นแหล่งคาร์บอน และภาวะของการเลี้ยงเชื้อ

5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทั่วไปมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และโซเดียมคลอไรด์ในช่วงกว้าง จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการค้าได้ (Horowitz และคณะ , 1990)

6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดสามารถยับยั้งการยึดเกาะกับเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Lactobacillus* sp. (Velraeds และคณะ , 1996) และ *Streptococcus thermophilus* (Busscher และคณะ , 1997) สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *Enterococcus faecalis* และ *Candida albicans* , *Candida tropicalis* ตามลำดับ

7. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตจากวัตถุดิบที่มีการผลิตทดแทนขึ้นใหม่ สามารถทำการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อลดต้นทุนการผลิต ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น จึงสามารถประยุกต์ใช้กับงานต่างๆได้อย่างกว้างขวาง เช่น สามารถนำไปใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ สารทำให้เกิดฟอง สารช่วยในการทำละลาย และสารลดความหนืด เป็นต้น จึงสามารถใช้แทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม ยา เครื่องสำอาง ปิโตรเลียมและปิโตรเคมี เป็นต้น

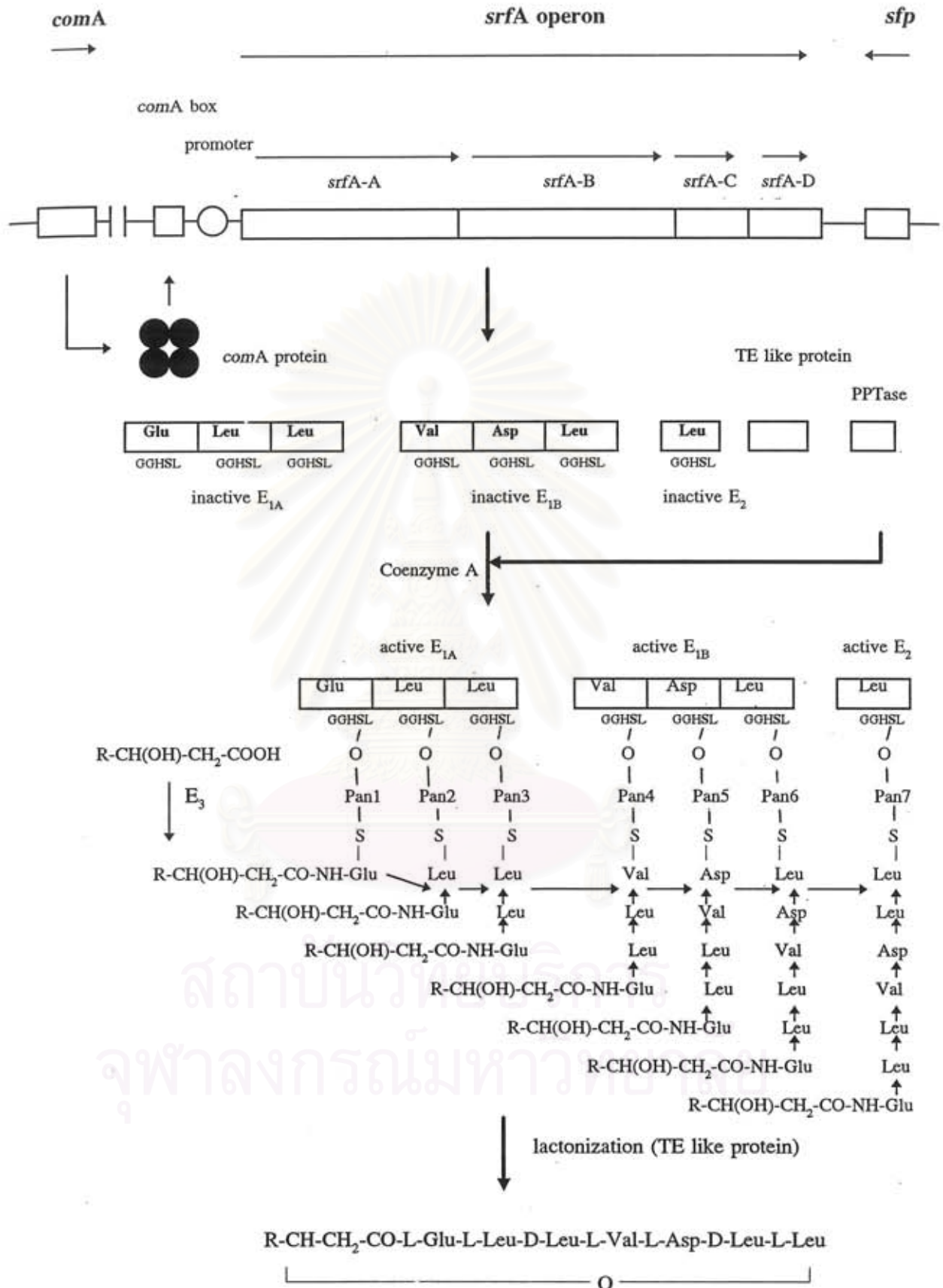
2.7 จีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซอร์แฟกตินจาก *Bacillus subtilis*

จากการศึกษาทางด้านชีวเคมีและพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของการสังเคราะห์เซอร์แฟกตินจาก *Bacillus subtilis* พบว่า *srfA* operon, จีน *comA* และ จีน *sfp* เป็นจีนที่มีความจำเป็นต่อการผลิตเซอร์แฟกติน แสดงดังรูปที่ 2.21

1. *srfA* operon มีขนาดประมาณ 25 กิโลเบสประกอบด้วย 4 open reading frame (ORF) ได้แก่ ORF1 (*srfA*-A), ORF2 (*srfA*-B), ORF3 (*srfA*-C) และ ORF4 (*srfA*-D) (Cosmina และคณะ, 1993) ORF1 ผลิตเอนไซม์ E_{1A} ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 460 กิโลดาลตัน เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการเติม กรดกลูตามิก และ ลิวซีน ในอัตราส่วน 1 : 2 ในการสังเคราะห์เซอร์แฟกติน ORF2 ผลิตเอนไซม์ E_{1B} ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 435 กิโลดาลตัน เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการเติม วาลีน, กรดแอสปาร์ติก และ ลิวซีน ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 เอนไซม์ E_2 ซึ่งผลิตจาก ORF3 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 160 กิโลดาลตัน มีความจำเพาะต่อการเติม ลิวซีน ซึ่งเป็น C-terminus ของเซอร์แฟกติน (Menkhaus และคณะ, 1993) ในขณะที่ ORF4 ผลิตเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน เอนไซม์นี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับ thioesterases จากเซลล์ตัวเลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โดยคาดว่าเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับขั้นตอนในการเกิดวงแลคโตน (Peypoux และคณะ, 1999)

2. จีน *comA* มีขนาด 642 เบสแปลรหัสให้กรดอะมิโน 214 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 กิโลดาลตัน โดยด้านปลาย C-terminal ของโปรตีน *comA* ประกอบด้วย helix-turn-helix motif 20 กรดอะมิโน ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของ DNA-binding protein (Weinrauch และคณะ, 1989) โดยโปรตีน *comA* จะเป็นตัวกระตุ้นโปรโมเตอร์ของ *srfA* operon ก่อให้เกิดการถอดรหัสของ *srfA* operon (Roggiani และ Dubnau, 1993 ; Nakano และ Zuber, 1989)

3. จีน *sfp* มีขนาด 672 เบสแปลรหัสให้กรดอะมิโน 224 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28 กิโลดาลตัน จีนนี้มีตำแหน่งอยู่ทางด้านขวามือ (downstream) ของ *srfA* operon ประมาณ 4 กิโลเบส (Nakano และคณะ, 1992) จีนนี้มีความสำคัญต่อการผลิตเซอร์แฟกติน กล่าวคือเมื่อนำจีนนี้จากเซลล์ที่ผลิตเซอร์แฟกตินเข้าสู่เซลล์ที่ไม่ผลิตเซอร์แฟกติน เช่น *Bacillus subtilis* 168 ซึ่งมี *srfA* operon ปกติแต่บกพร่องในส่วนจีน *sfp* (sfp^0) ทำให้ *Bacillus subtilis* 168 สามารถผลิตเซอร์แฟกตินได้ Quadri และคณะ (1998) รายงานว่าจีน *sfp* ผลิตเอนไซม์ phosphopantetheinyltransferase (PPTase) ซึ่งมีหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายหมู่ phosphopantethein จาก Coenzyme A ไปสู่เซรีนแต่ละตัวของเอนไซม์ E_{1A} , E_{1B} และ E_2 ซึ่งหลังจากถอดและแปลรหัสจาก *srfA* operon เอนไซม์เหล่านี้ยังไม่สามารถทำงานได้ เมื่อเอนไซม์เหล่านี้ได้รับหมู่ phosphopantethein แล้วจะสามารถทำงานได้



รูปที่ 2.21 จีโนมที่มีความจำเป็นและกลไกการสังเคราะห์เซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* ดัดแปลงจาก Cosmina และคณะ (1993) ; Nakano และ Zuber (1993) ; Peypoux และคณะ (1999)

รูปที่ 2.21(ต่อ) หมายเหตุ 1. box ที่ระบุกรดอะมิโนแสดงโดเมนของเอนไซม์ที่จำเพาะต่อการเติมกรดอะมิโนดังกล่าวในการสังเคราะห์เซอร์แฟคติน 2. GGHSL คือ consensus amino acids ที่พบในแต่ละโดเมนของเอนไซม์

นอกจากนี้เงินที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ acyltransferase (E_3) ซึ่งจำเพาะต่อ β -hydroxy fatty acids ยังไม่มีการโคลน (Peypoux และคณะ, 1999) เอนไซม์ E_3 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนแรกของการผลิตเซอร์แฟคติน E_3 จะนำ β -hydroxy fatty acids ไปสู่เอนไซม์ E_{1A} เกิดเป็น β -hydroxyacyl-L-glutamate ซึ่งเป็นสาร intermediate ตัวแรกในการสังเคราะห์เซอร์แฟคติน หลังจากนั้นเอนไซม์ E_{1A} และ E_{1B} จะกระตุ้นการสร้างสายเพปไทด์ของกรดอะมิโน 6 ตัว ตามลำดับ และในขั้นตอนสุดท้ายเอนไซม์ E_2 จะเชื่อมลิซึนเข้าสู่สายเพปไทด์ที่ปลาย C-terminal (Menkhaus และคณะ, 1993 ; Peypoux และคณะ, 1999)

2.8 การโคลนเงินที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวประเภทไลโปเพปไทด์

มีรายงานการโคลนเงินที่มีหน้าที่เหมือนกับเงิน *sfp* จากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* spp. พบว่าเงินที่ควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะหรือสารลดแรงตึงผิวประเภทไลโปเพปไทด์มีขนาดแตกต่างกันดังต่อไปนี้

Morikawa และคณะ (1992) ทำการโคลนเงิน *psf-1* จาก *Bacillus pumilus* A1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเซอร์แฟคตินด้วยวิธี Shot gun cloning โดยใช้พลาสมิด pTB522 เป็นพาหะเข้าสู่ *Bacillus subtilis* MI113 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ผลิตเซอร์แฟคติน (*sfp*⁰) พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เรียกว่า pTB522-2 kb ที่ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2 กิโลเบส ที่มี open reading frame ขนาด 699 เบส สร้างกรดอะมิโน 233 ตัว มีความเหมือนกับ PPTase ประมาณ 47 % และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน รีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ สามารถชักนำให้ *Bacillus subtilis* MI113 ผลิตเซอร์แฟคตินได้

Hiraoka และคณะ (1992) ; Huang และคณะ (1993) โคลนเงิน *Ipa-14* จาก *Bacillus subtilis* RB14 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตอิทูลิน A (iturin A) และเซอร์แฟคตินด้วยวิธี Shot gun cloning พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เรียกว่า pIB111 ที่ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 10 กิโลเบส ซึ่งสามารถชักนำให้ *Bacillus subtilis* MI113 ผลิตเซอร์แฟคตินได้ เมื่อทำการโคลนย่อย (subcloning) เข้าสู่ pC194 พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เรียกว่า pC112 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 3.3 กิโลเบส ซึ่งยังคงทำให้ *Bacillus subtilis* MI113 ผลิตเซอร์แฟคตินได้ เมื่อทำการตัดดีเอ็นเอประมาณ 800 เบสออกจาก pC112 ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เรียกว่า pC112 Δ ซึ่งไม่สามารถ

ชักนำให้ *Bacillus subtilis* MI113 ผลิตเซอร์แฟคตินได้ เมื่อชักนำ pC112 Δ เข้าสู่ *Bacillus subtilis* RB14 และชักนำให้เกิดการรวมตัวกับโครโมโซมของสายพันธุ์ RB14 พบว่า *Bacillus subtilis* RB14 เกิดความบกพร่องในการผลิตอิทูลิน A และเซอร์แฟคติน แสดงให้เห็นว่าจีน *Ipa-14* มีความจำเป็นต่อการผลิตอิทูลิน A และเซอร์แฟคติน เมื่อทำการโคลนย่อย pC112 อีกหลายครั้งพบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เรียกว่า pC115 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ที่มี open reading frame ขนาด 672 เบส แพลรหัสให้กรดอะมิโน 224 ตัว มีความเหมือนกับ PPTase ประมาณ 73 % ซึ่งจำเป็นต่อการผลิตอิทูลิน A และเซอร์แฟคติน

Borchert และคณะ (1994) ทำการโคลนจีน *gsp* จาก *Bacillus brevis* ATCC9999 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะแกรมิจิดิน เอส (gramicidin S) จีน *gsp* มีตำแหน่งอยู่ทางซ้ายมือ (upstream) ของ gramicidin S operon เข้าสู่ *Bacillus subtilis* JH642 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ผลิตเซอร์แฟคติน (*sfp*⁰) รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ที่มี open reading frame ขนาด 711 เบส แพลรหัสให้กรดอะมิโน 237 ตัว ที่มีความเหมือนกับ PPTase ประมาณ 34 % และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28 กิโลดาลตัน สามารถชักนำให้ *Bacillus subtilis* JH642 ผลิตเซอร์แฟคตินได้

Tsuge และคณะ (1996) ทำการโคลนจีน *Ipa-8* จาก *Bacillus subtilis* YB8 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตไพลพาสตาติน B1 และเซอร์แฟคตินด้วยวิธี Shot gun cloning พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เรียกว่า pTB81 ที่ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 10.5 กิโลเบส ซึ่งสามารถชักนำให้ *Bacillus subtilis* MI113 ผลิตเซอร์แฟคตินได้ เมื่อทำการโคลนย่อย (subcloning) เข้าสู่ pUB110 พบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เรียกว่า pUB8 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบส ที่มี open reading frame ขนาด 672 เบส แพลรหัสให้กรดอะมิโน 224 ตัว มีความเหมือนกับ PPTase ประมาณ 99 % ซึ่งยังคงทำให้ *Bacillus subtilis* MI113 ผลิตเซอร์แฟคตินได้ เมื่อชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับจีนนี้ โดยการสอดแทรกจีนต้านยาคลอแรมฟินิโคล เข้าสู่บริเวณกลางของชิ้นจีน เมื่อชักนำเข้าสู่ *Bacillus subtilis* YB8 และชักนำให้เกิดการรวมตัวกับโครโมโซม พบว่า *Bacillus subtilis* YB8 เกิดความบกพร่องในการผลิตไพลพาสตาติน B1 และเซอร์แฟคติน แสดงให้เห็นว่าจีน *Ipa-8* มีความจำเป็นต่อการผลิตไพลพาสตาติน B1 และเซอร์แฟคติน

2.9 แบคทีเรียทนเค็ม

แบคทีเรียทนเค็ม (halotolerant bacteria) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการโซเดียมคลอไรด์สำหรับการเจริญเติบโต แต่อาจเจริญได้ดีในภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0-1.75 % (Gilmour, 1990) และอาจเติบโตได้ในที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 10 % ขึ้นไป

ซึ่งได้แก่แบคทีเรียที่สร้างสปอร์, *Micrococci* , *Staphylococci* และ *Streptococci* เป็นต้น (Kusher, 1968)

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียทนเค็มที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังมีไม่มากนัก (Cameotra และ Makkar, 1998) ตัวอย่างเช่น Javaheri และคณะ (1985) ; McInerney และคณะ (1985, 1990) รายงานว่า *Bacillus licheniformis* JF-2 (ATCC 39307) เป็นแบคทีเรียทนเค็มที่คัดแยกได้จากบริเวณบ่อน้ำมัน สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะมีอากาศและไร้อากาศ เจริญได้ในภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 10 % อุณหภูมิสูงถึง 50 °ซ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.6-9.0 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ สามารถลดแรงตึงผิวได้เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง ซึ่งเป็นสมบัติที่ดีที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเก็บเกี่ยวน้ำมัน (Banat, 1995)

Pfiffner และคณะ (1986) รายงานว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SPO18 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีในภาวะไร้อากาศที่มีโซเดียมคลอไรด์ 4-10 % ในขณะที่ *Bacillus licheniformis* BAS50 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีในภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5 % อุณหภูมิ 35-45 °ซ และสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตขึ้นสามารถลดแรงตึงผิวได้เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10 % (Yakimov และคณะ, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (tensiometer) รุ่น K6 บริษัท Kruss, Germany

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10, G-35 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc. U.S.A.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น R-88 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc. U.S.A.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น 21 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/Vis) รุ่น PR-1 บริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น รุ่น J2-21 บริษัท Beckman, U.S.A.

เครื่องลามีนาไฟลัว รุ่น BV-124 บริษัท International Scientific supply, Thailand

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH-CO1-764604 บริษัท Olympus, Japan

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น HA-36 บริษัท Hirayama, Japan

เครื่องผสมสาร รุ่น G-560 บริษัท Scientific Industries, Inc., U.S.A.

ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- เครื่องกำเนิดไฟฟ้ารุ่น 2301 บริษัท LKB, Sweden

- เจลแอมเบอร์พร้อมอุปกรณ์เตรียมอะกาโรสเจล

เครื่องอัตโนมัติสำหรับแยกพลาสมิดจาก *E. coli* รุ่น PI-50 บริษัท Kurabo, Japan

เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR รุ่น 2400 บริษัท Perkin-Elmer, U.S.A.

เครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ รุ่น 310 บริษัท Perkin-Elmer, U.S.A.

3.1.2 เอนไซม์และเคมีภัณฑ์

DNA polymerase, DNA Blunting Kit, Takara ligation Kit, เอนไซม์ตัดจำเพาะ และ เอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนนิ่ง จากบริษัท Takara, Japan

Primer สังเคราะห์โดยบริษัท Sawady Technology และ Life Technology, Tokyo, Japan

DNA Sequencing Kit จาก PE Applied Biosystem, U.S.A.

DNA labelling Kit จาก Amersham, Life Science, U.S.A.

ชุดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจล GeneClean Kit, Bio101, U.S.A.

ชุดสกัดแยกพลาสมิด Qiagen plasmid Maxi Kit จากบริษัท Qiagen, Hilden, Germany

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) และ IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

เซอร์แฟคติน จากบริษัท Sigma, U.S.A.

โพลีเปปโตน ทริปโตน จากบริษัท Difo Laboratories, U.S.A.

สารสกัดจากยีสต์ จากสถาบันวิจัยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลูโคส, ซูโครส, กลีเซอรอล และพาราฟิน จากบริษัท E. Merck, Germany

ซูโครสเกรดอุตสาหกรรมอาหาร จากบริษัทมิตรผล ประเทศไทย

แอมโมเนียซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรท, เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตนไทน์ จากบริษัท E. Merck, Germany

ไตรฟลูโอโรอะซิติกแอซิด จากบริษัท Sigma, U.S.A.

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade) จากบริษัทต่างๆซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

3.2 จุลินทรีย์และพลาสมิด

Bacillus subtilis BBK-1 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเบซิลโลไมซิน L, ไพลพาสตาติน และเซอร์แฟคตินที่คัดแยกได้ในงานวิจัยครั้งนี้

Bacillus subtilis MI113 (*arg-15 trpC2 hsrM hsmM*) เป็นอนุพันธ์ของ *Bacillus subtilis* 168 และมีความบกพร่องในการผลิตเซอร์แฟคติน

E. coli DH5 α [F⁻, ϕ 80, *lacZ* Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(*rk*⁻,*mk*⁺), *SupE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, λ]

พลาสมิด pUC19, pCR2.1 (ampicillin resistance, lac promoter)

พลาสมิด pTB523 (tetracycline resistance)

3.3 วิธีการทั่วไปสำหรับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

3.3.1 การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอปริมาณน้อยด้วยชุดแยกโครโมโซม InstraGene Matrix (BIO-RAD, U.S.A.)

ทำตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยนำโคลนเดี่ยวของแบคทีเรียมาละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มล. แยกเก็บเซลล์โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำเซลล์ที่ได้มาละลายใน 200 ไมโครลิตรของ InstraGene Matrix บ่มที่อุณหภูมิ 56⁰ซ เป็นเวลา 15 นาที ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 100⁰ซ

เป็นเวลา 8 นาที ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3.2 การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอปริมาณมากของ *Bacillus* sp.

เลี้ยง *Bacillus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร L (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ปริมาตร 100 มล. ที่อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องเขย่า ข้ามคืน แยกเก็บเซลล์ด้วยการปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM TE pH 8.0 ปริมาตร 10 มล. ละลายเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของ 50 mM TE pH 8.0 ที่ผสม 15% ซูโครส ปริมาตร 3 มล. และเติมไลโซไซม์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มก.ต่อมล. ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ของ 50 mM TE pH 8.0 ที่ผสม 1% N-Lauryl sarcosine sodium salt (Sarkosyl reagent) ปริมาตร 3 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) 6 กรัม และเอธิลเดียมโบรไมด์ (100 มก.ต่อมล.) ปริมาตร 0.3 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 4.50 ชม. เจาะแยกแถบโครโมโซมออกจากหลอดเซนติฟิวจ์ แล้วสกัดเอธิลเดียมโบรไมด์ออกด้วย isoamyl alcohol 3 ครั้ง แยกเกลือส่วนเกินออกจากสารละลายดีเอ็นเอด้วยการ dialysis วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง และอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.3.6 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3.3 การสกัดพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมจาก *E.coli* และ *Bacillus subtilis* MI113

3.3.3.1 การสกัดพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมปริมาณน้อยจาก *E. coli*

เชื้อเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร L ปริมาตร 5 มล. ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน นำเซลล์ที่ได้ไปสกัดแยกพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเครื่องอัดโนมิตีสำหรับแยกพลาสมิด (Kurabo PI-50, Japan)

3.3.3.2 การสกัดพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมปริมาณน้อยจาก *Bacillus subtilis* MI113

เชื้อเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของ *Bacillus subtilis* MI113 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร L ปริมาตร 5 มล. ที่มียาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (tetracycline) ความเข้มข้นสุดท้าย 15 ไมโครกรัมต่อมล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 1.5 มล. ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มล. ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลาย I (50 mM กลูโคส, 10 mM EDTA และ 25 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และไลโซไซม์ที่ความเข้มข้น 4 มก.ต่อมล. ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ใส่สารละลาย II (1% SDS ใน 0.2 M NaOH) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอด 2-3 ครั้ง แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็น

เวลา 5 นาที เติมสารละลาย III (3M โปตัสเซียมอะซิเตรท pH 4.8) ที่เย็นปริมาตร 150 ไมโครลิตร กลับหลอด 2-3 ครั้ง แช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสลงในหลอดใหม่ เติมสารละลายที่นอลคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลายเดิม ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที คูณสารละลายชั้นบนในหลอดใหม่เติมเอธานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายเดิม ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 % เอธานอล และทำให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.3.6

3.3.3.3 การสกัดพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมปริมาณมากด้วยชุดแยกพลาสมิด Qiagen plasmid Maxi Kit

ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต เชื้อเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร L ปริมาตร 5 มล. ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 8 ชม. ถ่ายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร L ที่มียาปฏิชีวนะตามสูตรเดิมปริมาตร 100 มล. บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 12-18 ชม. ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 10 มล. แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 10 มล. กลับหลอดเบาๆ 4-6 ครั้ง วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ P3 ที่เย็น ปริมาตร 10 มล. กลับหลอดเบาๆ 4-6 ครั้งบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาปั่นที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 15 นาที เตรียมคอลัมน์โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QBT ปริมาตร 10 มล. ผ่านคอลัมน์ (QIAGEN-tip 500) นำส่วนใสทั้งหมดมาผ่านคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ QC ปริมาตร 30 มล. จำนวน 2 ครั้ง ชะดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ QE ปริมาตร 15 มล. เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในหลอดเซนต์ริฟิวจ์ความจุ 50 มล. ตกตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยไอโซโพรพานอล ปริมาตร 10.5 มล. แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ล้างดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% เอธานอลปริมาตร 5 มล. บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 10 นาที ทำให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 0.5-1.0 มล. วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.3.6

ในกรณีสกัดพลาสมิด pTB523 จาก *Bacillus subtilis* MI113 เชื้อเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร L ปริมาตร 25 มล. ที่มียาปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้นสุดท้าย 15

ไมโครกรัมต่อมล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน ถ่ายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 25 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร L ที่มียาปฏิชีวนะตามสูตรเดิมปริมาตร 500 มล. บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 8 ชม. ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 10 มล. และเติมไลโซไซม์ที่ความเข้มข้น 5 มก.ต่อมล. ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำตามขั้นตอนดังที่กล่าวแล้วข้างต้น

3.3.4 การแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอ GeneClean Kit

ทำตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต ภายหลังจากการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้ว ทำการตัดอะกาโรสเจลที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ กำจัดเจลส่วนเกินให้มากที่สุด ชั่งชิ้นเจลในหลอดไมโครพีพิจ์ เติมสารละลายโซเดียมไอโอดีปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (100 มก. เท่ากับ 100 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์ เมื่อเจลละลายอย่างสมบูรณ์แล้วจึงเติม glassmilk ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ทำการปั่นที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที ล้าง glassmilk ที่ได้ด้วยสารละลาย New wash ปริมาตร 0.7 มล. จำนวน 3 ครั้ง ละลายดีเอ็นเอที่จับอยู่กับ glassmilk ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 3 นาที ทำการปั่นแยก glassmilk ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.3.6

3.3.5 การเตรียม competent cell และการทรานสฟอร์ม (transformation)

3.3.5.1 การเตรียม competent cell ของ *E. coli*

ถ่ายโคลนเดี่ยวของ *E. coli* DH5 α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร L ปริมาตร 5 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน ถ่ายเซลล์ที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร L ปริมาตร 40 มล. บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 2.5-3 ชม. หรือจนกระทั่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.5 เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลาย 50 mM แคลเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 20 มล. ละลายเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลาย 50 mM แคลเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 4 มล. เติมกลีเซอรอลให้มี ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15% แบ่งใส่หลอดไมโครพีพิจ์ หลอดละ 100 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 3 ชม. เก็บสารละลายเซลล์ไว้ที่ -80°C

3.3.5.2 การทรานสฟอร์ม *E. coli* DH5 α ด้วยดีเอ็นเอลูกผสม

เมื่อใช้ *E. coli* DH5 α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ชิ้นดีเอ็นเอจะต้องเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pUC19 หรือ pCR2.1 บริเวณ lacZ เติมสารละลายดีเอ็นเอลูกผสมลงใน competent cell ของ *E. coli* DH5 α ที่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 42°C

$^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นทำการบ่มทันทีในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร L ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอถูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร L ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. และราดทับด้วย 40 มก.ต่อมล. ของ X-gal และ 100 mM IPTG อย่างละ 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชม. คัดเลือกโคโลนีสีขาวเพื่อนำไปตรวจสอบชั้นดีเอ็นเอสอดแทรกต่อไป

3.3.5.3 การทรานสฟอร์ม *Bacillus subtilis* MI113 ด้วยดีเอ็นเอถูกผสมตามวิธีของ Anagostopoulous และ Spizizen (1961)

เมื่อใช้ *Bacillus subtilis* MI113 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ชั้นดีเอ็นเอจะต้องเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pTB523 เชื้อโคโลนีเดี่ยวของ *Bacillus subtilis* MI113 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร L ปริมาตร 5 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน ถ่ายเซลล์ที่ได้ 1 มล. ลงในอาหารเหลวสูตร TF I (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) ปริมาตร 20 มล. บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชม. หรือวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.4 ซึ่งเซลล์จะเข้าสู่ระยะ late log phase ถ่ายเซลล์ที่ได้ 4 มล. ลงในอาหารเหลวสูตร TF II (ภาคผนวก ก หมายเลข 19) ปริมาตร 36 มล. บ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 1.5 ชม. เติมหาละลายดีเอ็นเอถูกผสมลงใน 1 มล. ของสารละลายเซลล์ที่เตรียมได้ บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ละลายเซลล์ได้ใน 1 มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร L บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. นำเซลล์ที่ได้ไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร L ที่มียาปฏิชีวนะเตตราไซคลินความเข้มข้นสุดท้าย 15 ไมโครกรัมต่อมล. และราดทับด้วยน้ำมันดิบ 30 ไมโครลิตร งานละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชม.

3.3.6 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

3.3.6.1 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธีอัลตราไวโอเล็ต แอบซอร์บชันสเปกโตรสโกปี (Ultraviolet Absorbance Spectroscopy)

นำสารละลายดีเอ็นเอมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260}/A_{280} ถ้าได้เท่ากับ 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ถ้าสูงกว่าเกือบใกล้ 2.00 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนอยู่มาก ถ้ามีค่าต่ำกว่า 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์มีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนอยู่

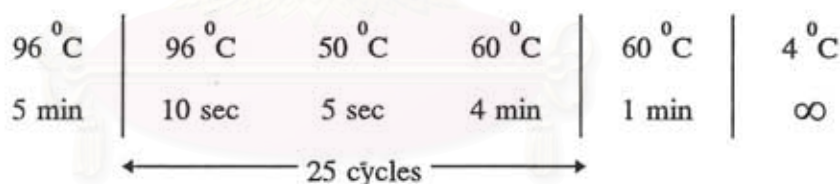
คำนวณค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเทียบว่า ถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} เท่ากับ 1 สารละลายดีเอ็นเอนั้นจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมล.

3.3.6.2 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 1.0% ซึ่งหลอมในสารละลายบัฟเฟอร์ TEA (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัว (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ในอัตราส่วน 1 : 5 หยอดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลแอมเบอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ต่อซม. ของเจล จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 2.5 ไมโครกรัมต่อมล. เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานคือ แลมดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III (λ DNA/*Hind*III) หรือแลมดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*T14I (λ DNA/*Eco*T14I)

3.3.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ขั้นตอนแรกทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอลูกผสมที่ความเข้มข้น 0.4-1.0 ไมโครกรัม เป็นแม่แบบ ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย DNA sequencing kit ปริมาตร 8 ไมโครลิตร forward primer หรือ reverse primer ความเข้มข้น 3.2 พิโคลโมล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ที่ควบคุมอุณหภูมิดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์ลำดับเบส

ภายหลังจากปฏิกิริยา PCR นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 3 M โซเดียมอะซิเตท pH 5.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 95 % เอทานอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 % เอทานอล ทำให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย template suppression reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 2 นาที และบ่มในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 1 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์

ลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™ 310 (Perkin-Elmer, U.S.A.) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม DNASIS (Hitachi Software, Tokyo)

3.3.8 การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเติม 3 M โซเดียมอะซิเตรท pH 5.2 ในอัตราส่วน 1 : 10 ของปริมาตรเดิม และเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70 % เอทานอล ทำให้แห้ง และละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3.3.9 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตของพลาสมิดพาหะ

ทำการตัดพลาสมิดพาหะ pUC19 และ pTB523 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร โดยใช้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม ที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ 15 หน่วย หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. แยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.3.6.2 และแยกดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดแยกแถบดีเอ็นเอ GeneClean Kit ตามวิธีในข้อ 3.3.4 นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แอลคาลีนฟอสฟาเทสของ *E. coli* A19 (alkaline phosphatase *E. coli* A19) ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ 0.5 หน่วย หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที ขจัดเอนไซม์ออกด้วยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรเดิม ดูดสารละลายชั้นบนมาตกตะกอนด้วยเอทานอลตามวิธีในข้อ 3.3.8 ละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

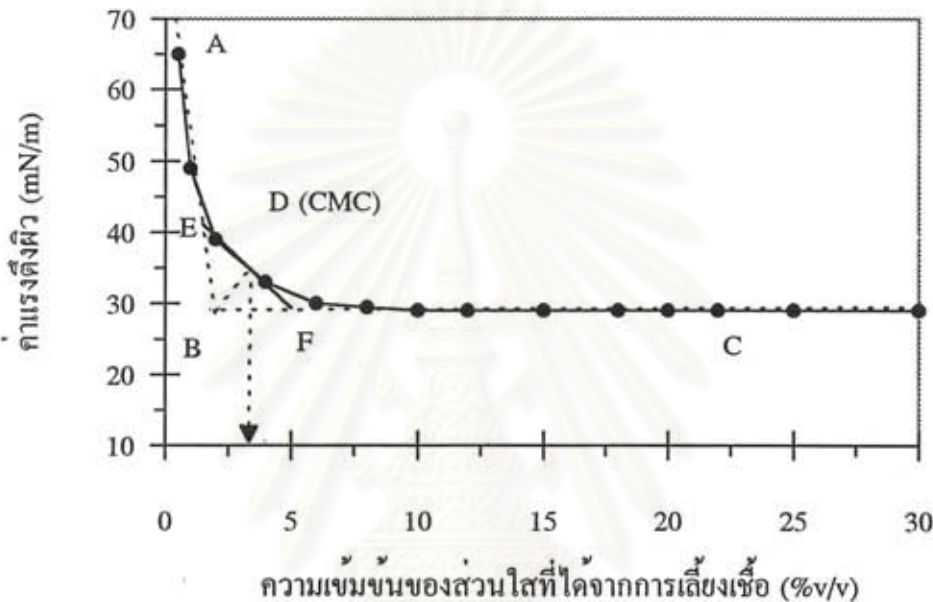
3.4 การตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.4.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension)

ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรีย โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C วัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยวิธี DeNuoy ring method ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (ring tensiometer) รุ่น K₆ (ภาคผนวก ค) ที่อุณหภูมิการวัดคงที่อยู่ที่ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

3.4.2 การวัดค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (relative biosurfactants concentration)

ความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่วัดในการทดลองนี้ เป็นการวัดหาค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเทียบกับค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ [critical micelle concentration (CMC)] ตามวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987) ; Sen (1997) โดยนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น (% ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้ววัดค่าแรงตึงผิว หาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการเขียนกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่าความเข้มข้นของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 วิธีการหาค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อภายหลังทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น

คำนวณหาเส้นสัมผัส AB , BC และหาค่าจุดตัดที่จุด B โดยอาศัยสมการการถดถอยเชิงเส้น (linear regression) เมื่อกำหนดให้

$$y_1 = b_1x_1 + a_1 \text{ เป็นสมการของเส้นสัมผัส AB}$$

$$y_2 = b_2x_2 + a_2 \text{ เป็นสมการของเส้นสัมผัส BC}$$

โดยค่าจุดตัดที่จุด B หาได้จาก

$$b_1x_1 + a_1 = b_2x_2 + a_2 \text{ เมื่อ } y_1 = y_2$$

$$b_1x_1 - b_2x_2 = a_2 - a_1$$

$$x(b_1 - b_2) = a_2 - a_1 \text{ เมื่อ } x_1 = x_2$$

$$x = (a_2 - a_1) / (b_1 - b_2) \text{ เมื่อเป็นค่าจุดตัดที่จุด B}$$

ณ จุดตัด B ลากเส้นตรง BD ตั้งฉากกับเส้นสัมผัส EF ที่จุด D ณ.จุด D เมื่อลากเส้นตรงมาตัดแกน X ค่าที่ได้คือค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ [critical micelle concentration (CMC)] และเมื่อลากเส้นตรงมาตัดแกน Y ค่าที่ได้คือค่าแรงตึงผิว ณ.จุดของการเกิดไมเซลล์ (YCMC) ซึ่งจะมีค่าแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และภาวะของการเลี้ยงเชื้อ

ความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (CMC^{-1}) คือค่าส่วนกลับของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ ($100/CMC$)

3.5 การทดสอบการกระจายน้ำมัน (oil displacement test)

ทดสอบการกระจายน้ำมันตามวิธีของ Morikawa และคณะ (1993) โดยนำงานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มม. ที่บรรจุน้ำ 40 มล. หยคน้ำมันดิบปริมาณ 15 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำ จากนั้นจึงหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าของน้ำมันดิบ สังเกตวงกลมของการกระจายน้ำมันดิบ วัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางเพื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน

3.6 การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.6.1 การแยกแบคทีเรียทนเค็มจากตัวอย่างที่เก็บได้

คัดแยกแบคทีเรียทนเค็มจากตัวอย่างดิน ทราช น้ำ น้ำทะเล และอาหารหมักดองที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง โดยการนำไปลาก (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแอลบี (LB agar ภาควงก ก หมายเลข 1) ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำแต่ละโคโลนีไปทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการนำไปจุด (spot) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % และราดทับด้วยน้ำมันดิบ (crude oil) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชม. คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้บริการบริเวณใสเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อ

3.6.2 การตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียทนเค็มที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำแบคทีเรียทนเค็มที่มีความสามารถในการกระจายน้ำมันทุกสายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบี (LB medium ภาควงก ก หมายเลข 2) ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยการวัดค่าแรงตึงผิว และค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามวิธีที่อธิบายในข้อ 3.4 คัดเลือกเฉพาะ

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการลดค่าแรงดึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำกว่า 35 mN/m และมีความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพสูงไว้ศึกษาต่อไป

3.7 การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่มีความสามารถดีที่สุดในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่เวลาต่างๆ

เลี้ยงแบคทีเรียทนเค็ม 3 สายพันธุ์ซึ่งมีความสามารถสูงในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ทำการคัดเลือกได้จากข้อ 3.6.2 ในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามและเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยการวัดค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงสุดในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพไว้ศึกษาต่อไป

3.8 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียทางอนุกรมวิธาน

นำแบคทีเรียที่มีความสามารถสูงสุดในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมาศึกษาลักษณะการเจริญ (Cultural characteristics) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical characteristics) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆเพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน โดยวิธีของ Sneath (1986) ตลอดจนการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA

3.8.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์ (Nutrient agar ภาคผนวก ก หมายเลข 4) มาศึกษารูปร่าง ขนาด สี ความโปร่งใส หรือความทึบแสงของโคโลนี ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.8.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การติดสีแกรม นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์ เป็นเวลา 24 ชม. มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมสีด้วยสารละลายแกรมคริสตอลไวโอเล็ต (Gram ' s crystal violet solution) ภาคผนวก ข หมายเลข 1 เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้งแล้วย้อมด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram ' s iodine solution) ภาคผนวก ข หมายเลข 2 เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95 % เอทานอล เป็นเวลา 20 วินาที และน้ำกลั่น แล้วย้อมด้วยสารละลายแกรมซาฟานินไอ (Gram ' s safranin straining

solution) ภาคผนวก ข หมายเลข 3 เป็นเวลา 30 วินาที ล้างน้ำแล้วจับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมสีเอนโดสปอร์ นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวทริยันท เป็นเวลา 48 ชม. มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หยดสารละลายมาลาไคท์กรีน (Malachite green) ภาคผนวก ข หมายเลข 4 ใช้ไฟลนพอให้เกิดไอเป็นเวลา 1-2 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นล้างน้ำและย้อมสีซาฟรานินโอ เป็นเวลา 1 นาที ล้างน้ำแล้วจับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนเซลล์จะติดสีแดง

การเคลื่อนที่ นำแบคทีเรียมาปลูกเชื้อแบบปักตรง (stab inoculation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (Semi-solid medium) ภาคผนวก ก หมายเลข 15 ถ้าเชื้อมีการเจริญอาหารจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีแดงเข้ม

3.8.3 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

การสร้างเอนไซม์แคตะเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 3% (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ลงบนโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นให้บันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบเมธิลคาร์บินอล (Voges-Proskauer test) ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อวีพี (Voges - Proskaver broth) ภาคผนวก ก หมายเลข 6 เป็นเวลา 3-7 วัน เติมน้ำยาทดสอบสารละลาย ก และสารละลาย ข (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) อย่างละ 2-3 หยด ถ้าอาหารมีสีแดงเกิดขึ้นภายใน 10 นาที บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงบันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol red broth base ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ที่มีกลูโคส ฟรุคโตส แมนนิทอล ไซโลส และอะราบิโนส 1 % สังเกตการสร้างกรดถ้าแบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรตได้จะสร้างกรดขึ้นมา ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟีนอล เรด เปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเหลืองบันทึกผลเป็นบวก ถ้าเชื้อสร้างแอมโมเนียจะทำให้ฟีนอล เรด เปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีแดง บันทึกผลเป็นลบ ถ้าต้องการดูการสร้างก๊าซก็ใส่หลอดคักกาซ (Durham's tube)

การเจริญในภาวะไร้อากาศ ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอาหารเหลวไทโอไกลิโคเลต (Thioglycolate broth) ภาคผนวก ก หมายเลข 14 เป็นเวลา 2 วัน ถ้าเชื้อมีการเจริญบันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่มีการเจริญบันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบการย่อยแป้ง ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสตาร์ช (Starch agar) ภาคผนวก ก หมายเลข 11 เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบการย่อยแป้งโดยการวาดด้วยสาร

ละลายไอโอดีนให้ทั่วงานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการย่อยเคซีน ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง skim milk agar ภาศผนวก ก หมายเลข 13 เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบการย่อยเคซีนโดยถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเคซีนได้บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการย่อยเจลาติน ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเทรียนท์ เจลาติน (Nutrient gelatin medium) ภาศผนวก ก หมายเลข 12 เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบการย่อยเจลาติน โดยการรดด้วยสารละลายแอมโมเนียซัลเฟตอิ่มตัวให้ทั่วงานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเจลาตินได้บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการไฮซีเตรท ปลูกเชื้อแบคทีเรียแบบปัดตรงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซิมมอน ซิเตรท (Simmon citrate medium) ภาศผนวก ก หมายเลข 7 เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบว่าสีของอาหารเปลี่ยนสีหรือไม่ ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อสามารถไฮซีเตรทได้บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการสร้างอินโดล ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอินโดลโปรดักชัน (Indole production medium) ภาศผนวก ก หมายเลข 9 ตรวจสอบสารอินโดลที่เกิดขึ้นโดยเติมสารละลายโคเวค (ภาศผนวก ข หมายเลข 7) 2 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดสีแดงอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างอินโดลได้บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการเจริญในเกลือสูง ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซอลท์ โทเลอแรนซ์ (Salt tolerance medium) ภาศผนวก ก หมายเลข 10 ถ้าเชื้อมีการเจริญบันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเทรียนท์ (Nutrient broth) ภาศผนวก ก หมายเลข 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-55 °C ถ้าเชื้อมีการเจริญบันทึกผลเป็นบวก

3.8.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้โครโมโซมของแบคทีเรียที่จะทดสอบที่สกัดด้วย InstraGene Matrix ตามวิธีในข้อ 3.3.1 เป็นแม่แบบ ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dNTP mixture, Taq DNA polymerase และสารละลายบัฟเฟอร์ โดยมี primer E-7 (5'-AAGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และ primer E-1510 (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') เป็น primer ปฏิกิริยา PCR ควบคุมอุณหภูมิแสดงดังรูปที่ 3.3

95 °C	95 °C	45 °C	72 °C	72 °C	4 °C
5 min	1 min	1 min	1.5 min	10 min	∞
← 30 cycles →					

รูปที่ 3.3 แสดงการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ 16S rRNA

แยกชิ้นจีโนมที่มีขนาดประมาณ 1,500 เบส ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ตามวิธีในข้อ 3.3.6.2 และแยกดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดแยกแถบดีเอ็นเอ GeneClean Kit ตามวิธีในข้อ 3.3.4 ทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่พลาสมิด pCR2.1 (TA Cloning Kit ; Invitrogen, U.S.A.) ในอัตราส่วนเป็นโมลของดีเอ็นเอต่อพลาสมิด 1 : 3 ด้วย T4 DNA ligase 4 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซข้ามคืน ทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ตามวิธีในข้อ 3.3.5.2 สกัดแยกพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวตามวิธีในข้อ 3.3.3.1 ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ด้วยการใส่ดีเอ็นเอลูกผสมเป็นแม่แบบ ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีโนมที่สังเคราะห์ 16S rRNA ตามวิธีในข้อ 3.3.7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสด้วยโปรแกรม BLAST

3.9 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *Bacillus subtilis* BBK-1

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °ซ ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามลักษณะการเจริญ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดค่าแรงดึงผิว และค่าความเข้มข้นสัมพันธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในขวดแก้วทรงกรวย ทำได้โดยเตรียมหัวเชื้อของ *Bacillus subtilis* BBK-1 โดยเชื้อจากหลอดอาหารแข็งที่มีอายุ 24 ชม. ลงในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °ซ ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 13 ชม. จนได้ความหนาแน่นของเชื้อ 2.5 เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นปลูกเชื้อ 4 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 %

3.10 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ทำการเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 ในสูตรอาหารต่างๆดังนี้

อาหารกำหนดสูตร (Defined medium) ภาคผนวก ก หมายเลข 17

อาหารเหลวแอลบี (Luria broth medium) ภาคผนวก ก หมายเลข 2

อาหารที่มีองค์ประกอบดังรายงานของ Carrillo และคณะ (1996) ภาคผนวก ก หมายเลข 16 ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5

3.11 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 เพื่อผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ทำการศึกษาหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ในขวดเขย่า โดยการวัดค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ตามวิธีในข้อ 3.4 เตรียมหัวเชื้อและเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.9 โดยศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่

3.11.1 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

โดยทำการแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบีตั้งแต่ 0.5 , 3 , 5 , 8 และ 10 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.11.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 โดยแปรแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส เกรตวึเคราะห์ ซูโครสเกรตอุตสาหกรรมอาหาร กลีเซอรอล และพาราฟิน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร เมื่อได้ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้วจึงทำการแปรผันหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

3.11.3 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครสปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 โดยแปรแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ทริปโตเนน โพลีเปปโตเนน แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร และทริปโตเนนผสมแอมโมเนียมไนเตรท ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้นชนิดละ 0.69 กรัมต่อลิตร เมื่อได้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้วจึงทำการแปรผันหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

3.11.4 ปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ศึกษาการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีจุลโครสปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 โดยทำการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ 0, 3, 5, 7 และ 9 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรทที่เท่ากับปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ที่เพิ่มขึ้น

3.12 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 เพื่อผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

3.12.1 ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ทำการศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในขวดเขย่า ที่มีการสร้างสารลดแรงดึงผิวชีวภาพสูงสุด โดยแปรค่าระยะเวลาในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 0-60 ชม. บันทึกผลทุกๆ 12 ชม.

3.12.2 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ศึกษาความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีจุลโครสปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน มีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นตั้งแต่ 5.0-9.0 (แปรผันค่าทีละ 0.5) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม.

3.12.3 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีจุลโครสปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน มีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 25 , 30 , อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) , และ 40 °ซ เป็นเวลา 24 ชม.

3.12.4 ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

หาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมโดยเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีจุลโครสปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน มีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 5

กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่แปรความเร็วรอบในการเขย่าตั้งแต่ 100 , 150 , 200 และ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชม.

3.13 สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus subtilis* BBK-1 ในภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.11 , 3.12 มาตกตะกอนด้วย 6 นอร์มอลกรดไฮโดรคลอริกจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน แยกเก็บตะกอนโดยการปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.0 จำนวน 3 ครั้ง นำตะกอนที่ได้มาทำการสกัดด้วยเมทานอล 3 ครั้ง ทำให้แห้งและเข้มข้นขึ้น โดยการระเหยภายใต้สภาวะสูญญากาศ นำสารที่ได้มาทดสอบสมบัติดังต่อไปนี้

3.13.1 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (CMC) ของสารที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิด

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้แก่ Triton X-100, Sodium dodecyl sulfate, Cetylpyridinium chloride และ Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาวัดค่าแรงตึงผิว เขียนกราฟระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวกับค่าแรงตึงผิวที่วัดได้ ตามวิธีของ Thimon และคณะ (1992b)

3.13.2 เปรียบเทียบค่าการกระจายน้ำมันของสารที่ผลิตได้กับเซอร์แฟคตินและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิด

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ เซอร์แฟคตินและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้แก่ Triton X-100, Sodium dodecyl sulfate, Cetylpyridinium chloride และ Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาวัดค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีในข้อ 3.5 เขียนกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวกับค่าพื้นที่ของการกระจายน้ำมัน

3.13.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว และผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทดสอบ

3.13.3.1. ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 , 3 , 5 , 8 , 10 , 15 , 20 และ 30 % บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวัดค่าแรงตึงผิว

3.13.3.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการลดค่าแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

นำสารละลายของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย 1 นอร์มอลของกรดไฮโดรคลอริกหรือ 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 บมที่อุณหภูมิ 4⁰ซ เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำไปวัดค่าแรงดึงผิว

3.13.3.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

นำสารละลายของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพไปบ่มที่อุณหภูมิ 50, 80 และ 100⁰ซ เป็นเวลา 5 ชม. และที่ 121⁰ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าแรงดึงผิวที่อุณหภูมิ 25⁰ซ

3.14 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

3.14.1 การวิเคราะห์สารลดแรงดึงผิวชีวภาพด้วยเครื่องไฮเพอร์มานซ์ลิกวิด โครมาโตกราฟี

ละลายสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดด้วยเมทานอลใน 10 % เมทานอล แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์มานซ์ลิกวิด โครมาโตกราฟี (Hewlett Packard 1100, Germany) โดยใช้คอลัมน์ C18 reversed phase cosmosil ขนาด 4.6 X 150 mm (Nacalai, Japan) มีสารละลาย A (10 % อะซิโตไนไทรล์ 0.1 % ของกรดไตรฟลูออโรอะซิติก) และสารละลาย B (100 % อะซิโตไนไทรล์ 0.05 % ของกรดไตรฟลูออโรอะซิติก) เป็นตัวพาด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มล. ต่อ นาที เริ่มต้นระบบด้วยการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย A เป็นเวลา 5 นาที และมีลิเนียร์เกรเดียนท์จาก 10-100% ของสารละลาย B เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นชะด้วย สารละลาย B เป็นเวลา 20 นาที และชะตามด้วยสารละลาย A เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เวลาทั้งหมดในการชะคอลัมน์ 50 นาที วัดผลด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

3.14.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีแมสเปคโตรเมทรี

นำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่แยกได้จากเครื่องไฮเพอร์มานซ์ลิกวิด โครมาโตกราฟี มาทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (LCQ, Finnigan, U.S.A.)

3.14.3 การวิเคราะห์หาชนิดของกรดอะมิโน

นำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่แยกได้จากเครื่องไฮเพอร์มานซ์ลิกวิด โครมาโตกราฟี 10 nmol มาย่อยสลายภายใต้ภาวะที่ประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มอล และ 0.2 % ฟีนอล ที่อุณหภูมิ 110⁰ซ เป็นเวลา 24 ชม. วิเคราะห์หาชนิดของกรดอะมิโนด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Hitachi L-8500, Tokyo) ที่สถาบันวิจัยโปรตีน มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น

3.15 การโคลนนิ่งที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

3.15.1 การโคลนนิ่ง *sfp*⁰ จาก *Bacillus subtilis* MI113

เพิ่มจำนวนจีน *sfp*⁰ จาก *Bacillus subtilis* MI113 ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* MI113 ที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.3.2 เป็นแม่แบบในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dNTP mixture, Taq DNA polymerase และสารละลายบัฟเฟอร์ โดยมี primer-1 (5'-CTAGAATTCAGATTACGGAATTTATATG-3') และ primer-2 (5'-GGGGAATTCAGGGTGTGCGGCATAC-3') เป็น primer ซึ่งจำเพาะต่อค่านชายมือและขวามือของ open reading frame ของจีน *sfp* จาก *Bacillus subtilis* OKB105 (Nakano และคณะ, 1992) ปฏิกิริยา PCR ควบคุมอุณหภูมิแสดงดังรูปที่ 3.3 หลังจากนั้นทำการทดลองตามขั้นตอนในข้อ 3.8.4

3.15.2 การติดฉลากจีน *sfp*⁰ ที่สังเคราะห์ได้เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจจับ

ทำการแยกชิ้นจีน *sfp*⁰ ออกจากดีเอ็นเอลูกผสม (pCR2.1-*sfp*⁰) ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แยกชิ้นจีน *sfp*⁰ ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 เบส ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.3.6.2 และแยกดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดแยกแถบดีเอ็นเอ GeneClean Kit ตามวิธีในข้อ 3.3.4 นำสารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม มาบ่มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5 นาที และบ่มในอ่างน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที ติดฉลากด้วยชุดติดฉลาก AlkPhose Direct ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต (Amersham, Life Science, England) ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 32 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยส่วนเชื่อมขวาง (cross linker) 2 ไมโครลิตร รีเอเจนต์ติดฉลาก (labelling reagent) 2 ไมโครลิตร และ reaction buffer 10 ไมโครลิตร หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ดีเอ็นเอที่ทำติดฉลากแล้วสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจจับได้ทันที หรือเก็บไว้ในอ่างน้ำแข็งได้นาน 2 ชม. ถ้าต้องการเก็บไว้ใช้ในระยะเวลาให้เก็บใน 50 % กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -15 ถึง -30 °ซ ซึ่งสามารถเก็บได้นานถึง 6 เดือน

3.15.3 การตรวจหาจีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี Southern hybridization

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* BBK-1 ที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.3.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* และ *SaI* โดยใช้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเอนไซม์ 30 หน่วย (*EcoRI* และ *SaI*) หรือ 40 หน่วย (*BamHI* และ *PstI*) หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 3 ชม. ขจัดเอนไซม์ออกด้วยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรเดิม ดูดสารละลายชั้นบนมาตกตะกอนด้วยเอทานอลตามวิธีในข้อ 3.3.8 ละลายดี

เอ็นเอที่ได้ควยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร แยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสตามวิธีในข้อ 3.3.6.2 ชุดควบคุมบวกคือดีเอ็นเอลูกผสม pCR2.1-*sfp*⁰ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ภายหลังจากการทำอิเล็กโทรโฟริซิส ทำการล้างเจลที่ได้ด้วยการแช่ใน 0.25 นอร์มอลกรดไฮโดรคลอริก เป็นเวลา 15 นาที 1 ครั้ง และน้ำกลั่น ทำการดีเนเจอร์ (denature) ดีเอ็นเอด้วยการแช่เจลใน denaturation buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) เป็นเวลา 30 นาที ทำการย้ายดีเอ็นเอจากเจลสู่ nylon membrane ด้วยวิธี vacuum transfer ในสารละลาย 10X SSC (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) เป็นเวลา 90 นาที ที่ความดัน 5 นิ้วปรอท นำแผ่น nylon membrane ที่ได้มาล้างด้วยสารละลาย 2X SSC ทำให้แห้ง ทำการไฮบริไดซ์ (hybridize) ดีเอ็นเอบนแผ่น nylon membrane ด้วยดีเอ็นเอตรวจจับ *sfp*⁰ ในสารละลายบัฟเฟอร์ (hybridization buffer) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย NaCl 0.5 M และ Blocking reagent 4 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 55 °ซ ข้ามคืน ล้างแผ่น nylon membrane ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ปฐมภูมิ (ภาคผนวก ข หมายเลข 13) ที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง และสารละลายบัฟเฟอร์ทุติยภูมิ (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง แล้วทำให้แห้ง นำแผ่น nylon membrane มาทำปฏิกิริยากับ detection reagent ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที และทำการ autoradiograph กับแผ่นฟิล์มในกล่องทึบแสง เป็นเวลา 2 ชม. แล้วจึงทำการล้างแผ่นฟิล์ม

3.15.4 การคัดเลือกโคลนที่ได้รับเงินเป้าหมายด้วยวิธี Colony hybridization

โครโมโซมดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* BBK-1 ที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ที่มีขนาดประมาณ 4 กิโลเบส สามารถเกิดการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอตรวจจับ แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดดังกล่าวออกจากเจลด้วยชุดแยกแถบดีเอ็นเอ GeneClean Kit ตามวิธีในข้อ 3.3.4 ทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pUC19 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ แอลคาไลน์ฟอสฟาเทสเพื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตตามวิธีในข้อ 3.3.9 โดยใส่พลาสมิดพาหะและดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Takara ligation Kit, Solution I ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 °ซ ข้ามคืน ทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ตามวิธีในข้อ 3.3.5.2 สุ่มโคลนีสีขาวมาสกัดแยกพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.3.3.1 เพื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

นำทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร L ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมล. มาทำ replica plating สู่ nylon membrane ชุดควบคุมบวกคือทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม pCR2.1-*sfp*⁰ แล้ววาง

แผ่น nylon membrane ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร L บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 ชม. เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น นำแผ่น nylon membrane มาทำให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอเจือจางโดยการแช่ใน denaturation buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) เป็นเวลา 5 นาที และ neutralize ดีเอ็นเอใน neutralization buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 11) เป็นเวลา 5 นาที ล้างแผ่น nylon membrane ด้วยสารละลาย 2X SSC ทำให้แห้ง หลังจากนั้นทำการไฮบริดด้วยดีเอ็นเอลูกผสมด้วยดีเอ็นเอตรวจจับ และทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.15.3

3.15.5 การตรวจสอบผลของจีนขนาด 4 กิโลเบสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* MI113

โคลนจีนขนาด 4 กิโลเบสที่คัดเลือกได้ จากพลาสมิด pUC19 เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pTB523 โดยทำการเชื่อมจีนขนาด 4 กิโลเบสเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pTB523 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส เพื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตตามวิธีในข้อ 3.3.9 โดยใช้พลาสมิดพาหะและดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Takara ligation Kit, Solution I ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 °C ข้ามคืน ทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *Bacillus subtilis* MI113 ตามวิธีในข้อ 3.3.5.3 ตรวจสอบความสามารถในการกระจายน้ำมันบนอาหารแข็งของรีคอมบิแนนท์ *Bacillus subtilis* MI113 ตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกด้วยการสกัดพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.3.3.2

3.15.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนขนาด 4 กิโลเบส

เนื่องจากจีนขนาด 4 กิโลเบสมีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* อยู่ 1 ตำแหน่ง เมื่อตัดจีนนี้ด้วยเอนไซม์ *SacI* จะได้ชิ้นจีนที่มีขนาด 1.4 กิโลเบส และ 2.6 กิโลเบส ทำการโคลนย่อยดีเอ็นเอนี้เข้าสู่พลาสมิด pUC19 ซึ่งจะได้รับดีเอ็นเอลูกผสม 2 ชนิดที่เรียกว่า pUC19-1.4kb และ pUC19-2.6kb ด้วยการใส่ดีเอ็นเอลูกผสมนี้เป็นแม่แบบ ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนตามวิธีในข้อ 3.3.7

3.15.7 การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของจีนขนาด 4 กิโลเบส

3.15.7.1 การเตรียมพลาสมิดพาหะ pUC19 ที่ขาดตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* (pUC19 Δ *SacI*)

ทำการตัดพลาสมิด pUC19 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* โดยใช้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ 10 หน่วย หลังปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชม. ทำลายเอนไซม์ด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ

65 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลตามวิธีในข้อ 3.3.8 นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยชุด DNA Blunting Kit ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 9 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่าของ dNTPs ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หลังการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที และบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายที่ได้มาเติมเอนไซม์ T4 DNA polymerase ความเข้มข้น 1 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นด้วยเครื่องผสมสารเพื่อทำลายเอนไซม์ และบ่มในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทำเจือจาง (dilution buffer) ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอหลังจากการเจือจางปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายไลเคชัน A ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และสารละลายไลเคชัน B ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 °C ซ้ำคืน นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ตามวิธีในข้อ 3.3.5.2 ตรวจสอบพลาสมิดที่ขาดตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* จากโคโลนีสีขาว ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *SacI* และ *DraI* พลาสมิดที่ขาดตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 700 เบส และ 2000 เบส

3.15.7.2 การเชื่อมชิ้นจีโนมขนาด 4 กิโลเบส เข้าสู่พลาสมิด pUC19 Δ *SacI*

ทำการตัดพลาสมิดพาหะ pUC19 Δ *SacI* ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส เพื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตตามวิธีในข้อ 3.3.9 ทำการเชื่อมชิ้นจีโนมขนาด 4 กิโลเบส เข้าสู่พลาสมิดที่เตรียมได้ โดยใช้พลาสมิดพาหะและดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในส่วนผสมให้เกิดปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย Takara ligation Kit, Solution I ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 16 °C ซ้ำคืน ทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* DH5 α ตามวิธีในข้อ 3.3.5.2 เนื่องจากทุกการทรานสฟอร์มเม้นท์ที่ได้จะเป็นโคโลนีสีขาว สุ่มทรานสฟอร์มเม้นท์มาสกัดแยกพลาสมิดตามวิธีในข้อ 3.3.3.1 เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

3.15.7.3 การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจีโนมขนาด 4 กิโลเบส ที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI*

นำดีเอ็นเอลูกผสม pUC19 Δ *SacI*-4kb ที่เตรียมได้จากข้อ 3.15.7.2 มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจีโนมขนาด 4 กิโลเบส ที่ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* ตามวิธีในข้อ 3.15.7.1 ตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมที่ขาดตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* ด้วยการตัดด้วย

เอนไซม์ *SacI* และ *XbaI* คือเอ็นเอลูกผสมที่ขาดตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 6.7 กิโลเบส เพียงแถบเดียว

3.15.7.4 การตรวจสอบผลของชิ้นขนาด 4 กิโลเบสที่เกิดการกลายพันธุ์ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* MI113

โคลนชิ้นขนาด 4 กิโลเบสที่เกิดการกลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.15.7.3 เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pTB523 และตรวจสอบผลของชิ้นต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* MI113 ตามวิธีในข้อ 3.15.5



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

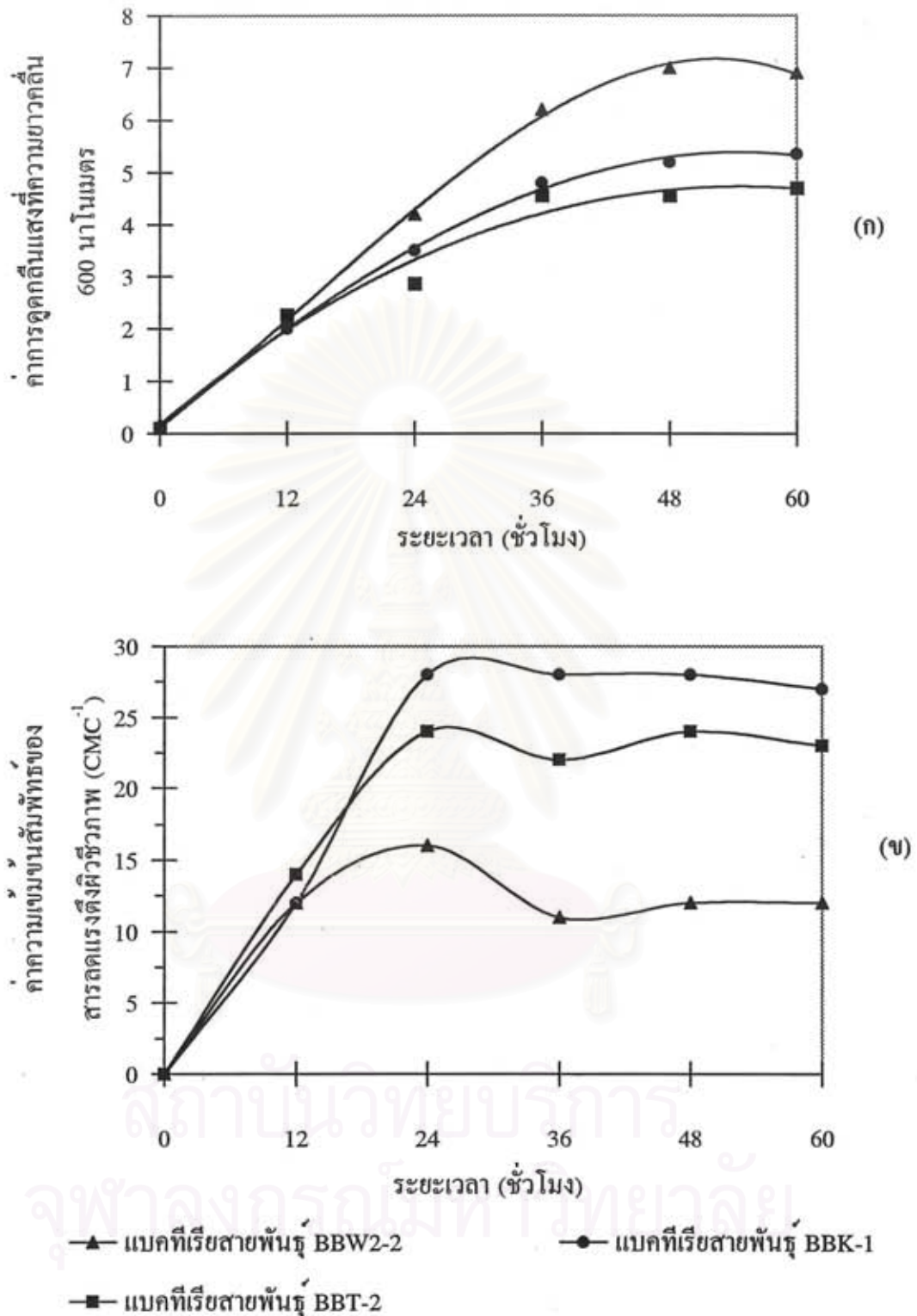
งานวิจัยขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยคัดแยกแบคทีเรียทนเค็มจากตัวอย่างดิน ทราบ น้ำ น้ำทะเล และอาหารหมักคอง จำนวน 65 ตัวอย่างที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง 14 จังหวัด บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ 165 สายพันธุ์ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการชีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % และวัดค่าด้วยน้ำมันดิบ พบแบคทีเรียจำนวน 23 สายพันธุ์ มีความสามารถในการกระจายน้ำมันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงถึงความสามารถเบื้องต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Morikawa และคณะ, 1992)

เมื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวของแบคทีเรียทนเค็ม 23 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวตามวิธีในข้อ 3.4 พบแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ ที่สามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำกว่า 35 mN/m แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวที่ดี (Cooper, 1986) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BBW2-2, BBK-1 และ BBT-2 มีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตั้งแต่ 16-28 ส่วนแบคทีเรียอีก 6 สายพันธุ์ มีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำกว่า ดังแสดงในตารางที่ 4.1

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBW2-2, BBK-1 และ BBT-2 ที่เวลาต่างๆ (รูปที่ 4.1) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BBW2-2 มีการเจริญสูงสุด ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 และ BBT-2 มีการเจริญที่ใกล้เคียงกัน โดยเริ่มเข้าสู่ระยะพัก (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เวลาต่างๆ มาวัดค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 มีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงกว่าสายพันธุ์ BBT-2 และ BBW2-2 และมีประสิทธิภาพการผลิตที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 มาศึกษารายละเอียดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียทนเค็มที่คัดเลือก
ได้ 9 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 %

สายพันธุ์	คัดแยก จาก	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ค่าแรงตึงผิว หลังการเลี้ยงเชื้อ (mN/m)	ความเข้มข้นสัมพัทธ์ ของสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ
BST1-2	เกลือ	จ.สมุทรสาคร	30.0	6
BBW1-2	น้ำ	เขตราชเทวี กรุงเทพฯ	30.7	7
BBW2-2	น้ำ	คลองแสนแสบ กรุงเทพฯ	31.2	16
BBK-1	กระเทียม	ตลาดสามย่าน กรุงเทพฯ	28.0	28
BBT-2	คอง เต้าเจี้ยว	ตลาดคลองเตย กรุงเทพฯ	28.0	24
BBS1-10	ดิน	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ	28.5	3
BCW3-2	น้ำทะเล	หาดจอมเทียน จ.ชลบุรี	33.5	2
BKS2-2	ดิน	อ. ทาม่วง จ. กาญจนบุรี	31.5	3
BBS-1	ดิน	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ	29.0	2



รูปที่ 4.1 การเจริญ (ก) และค่าความเข้มข้นสัมพันธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ข) ของแบคทีเรียทนเค็ม 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบีนที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

4.2 การจำแนกสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 ทางอนุกรมวิธาน

จากการตรวจสอบแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหารนิวเทรียนท์มีสีขาวนวล นูนตรงกลาง (umbonate) ผิวค้ำน และขอบโคโลนีเรียบ ดิสคีสน้ำเงินของแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนมีเอนโดสปอร์รูปไข่อยู่กึ่งกลางเซลล์ และเคลื่อนที่ได้ (ตารางที่ 4.2) ให้ผลบวกเมื่อทำการทดสอบแคตะเลส แต่ให้ผลลบเมื่อทำการทดสอบอินโดล วีพี และไม่ผลิตกาซจากกลูโคส ผลิตกรดได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลหลายชนิด มีคุณสมบัติในการย่อยเคซีน เจลาติน แป้ง และมีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนในอากาศ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2-16 % และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25-50 °ซ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งพิจารณาได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุลของ *Bacillus*

เมื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA พบว่าลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มีความยาว 1450 เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA ของ *Bacillus subtilis* ATCC21331 พบว่าจาก 1431 เบสจะมี 1421 เบส ที่มีความเหมือนกันคิดเป็น 99 % แสดงดังตารางที่ 4.4 จึงอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 เป็นจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* โดยจะเรียกว่า *Bacillus subtilis* BBK-1 ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1

ลักษณะที่ทดสอบ	รายละเอียด
โคโลนีบนอาหาร วุ้นนิวเทรียนท์	สีขาวนวล นูนตรงกลาง (umbonate) ผิวค้ำน ขอบเรียบ
เซลล์ : รูปร่าง	Ø 3-5 มม.
: สีแกรม	เป็นท่อน
: ขนาด	ดิสคีสน้ำเงิน
เอนโดสปอร์	1.2×3.8 ไมโครเมตร
: รูปร่าง	รูปไข่
: ตำแหน่ง	กึ่งกลางเซลล์
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1

ลักษณะที่ทดสอบ	ผลการศึกษา	ลักษณะที่ทดสอบ	ผลการศึกษา
แคะตะเลส	+	การเจริญในโซเดียมคลอไรด์	
การทดสอบ วี-พี	-	2 %	+
การผลิตกรด		5 %	+
ดี-กลูโคส	+	7 %	+
ดี-ฟรุกโตส	+	10 %	+
ดี-แมนนิทอล	+	12 %	+
ดี-ไซโลส	+	14 %	+
แอล-อะราบิโนส	+	16 %	+
การผลิตก๊าซจากกลูโคส	-	20 %	-
การเจริญในภาวะไร้อากาศ	-	เจริญที่อุณหภูมิ	
การสลาย		10 ⁰ ซ	ND
เคซีอิน	+	25 ⁰ ซ	+
เจลาติน	+	30 ⁰ ซ	+
แป้ง	+	40 ⁰ ซ	+
การใช้ไนเตรท	+	50 ⁰ ซ	+
การผลิตอินโดล	-	55 ⁰ ซ	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ให้ผลในการทดสอบ

+ หมายถึง ให้ผลในการทดสอบ

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

10 20 30 40 50 60 70
 GCGCGACGGC TCAGTAACAC GTGGGTAACC TGCCTGTAAG ACTGGGATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA
 80 90 100 110 120 130 140
 TACCGGATGG TTGTTTGAAC CGCATGGTTC AGACATAAAA GGTGGCTTCG GCTACCACTT ACAGATGGAC
 150 160 170 180 190 200 210
 CCGCGGCGCA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTCACCA AGGCAACGAT GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG
 220 230 240 250 260 270 280
 TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA
 290 300 310 320 330 340 350
 ATGGACGAAA GTCTGACGGA GC^ACGCCGC GTGAGTGATG AAGGTTTTTCG GATCGTAAAG CTCTGTTGTT
 360 370 380 390 400 410 420
 AGGGAAGAAC AAGTGCCGTT CAAATAGGGC GGCACCTTGA CCGTACCTAA CCAGAAAGCC ACGGCTAACT
 430 440 450 460 470 480 490
 ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGGGCTCGC
 500 510 520 530 540 550 560
 AGGCGGTTTC TTAAGTCTGA TGTGAAAGCC CCCGGCTCAA CCGGGGAGGG TCATTGGAAA CTGGGGAACT
 570 580 590 600 610 620 630
 TGAGTGCAGA AGAGGAGAGT GGAATTCCAC GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GAGATGTGGA GGAACACCAG
 640 650 660 670 680 690 700
 TGGCGAAGGC GACTCTCTGG TCTGTAAGTG ACGCTGAGGA GCGAAAGCGT GGGGAGCGAA CAGGATTAGA
 710 720 730 740 750 760 770
 TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGA GTGCTAAGTG TTAGGGGGTT TCCGCCCTT AGTGCTGCAG
 780 790 800 810 820 830 840
 CTAACGCATT AAGCACTCCG CCTGGGGAGT ACGGTCGCAA GACTGAAACT CAAAGGAATT GACGGGGGCC
 850 860 870 880 890 900 910
 CGCACAAAGC GTGGAGCATG TGGTTTAATT CGAAGCAACG CGAAGAACCT TACCAGGTCT TGACATCCTC
 920 930 940 950 960 970 980
 TGACAATCCT AGAGATAGGA CGTCCCCTTC GGGGGCAGAG TGACAGGTGG TGCATGGTTG TCGTCAGCTC
 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 GTGTGCTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTTGATCT TAAGTTGCCA GCATTCACTT
 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GGGCACTCTA AGGTGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA CGTCAAATCA TCATGCCCTT
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
 TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG GACAGAACAA AGGGCAGCGA AACCGCGAGG TTAAGCCAAT
 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CCCACAAATC TCGTTCTCAG TTCGGATCGC AGTCTGCAAC TCGACTGCGT GAAGCTGGAA TCGCTAGTAA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
 TCGCGGATCA GCATGCCGCG GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCGTACAC CACGAGAGTT
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TGTAACACCC GAAGTCGGTG AGGTAACCTT TATGGAGCCA GCCGCCGAAG GTGGGACAGA TGATTGGGGT
 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 GAAGTCGAAC AAGGTAGCCG TATCGGAAGC CTGCGGTTGG ATCACCTCCT

รูปที่ 4.2 ลำดับเบสของของยีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1

ตารางที่ 4.4 ความเหมือนของจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 เมื่อเปรียบเทียบกับจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

Bacteria	Strain	Accession number *	Identities (X/Y)
<i>B. subtilis</i>	ATCC21331	AB018487	1421/1431 (99%)
<i>B. licheniformis</i>	DSM13	X68416	1419/1453 (97%)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	ATCC23350	X60605	1313/1341 (97%)
<i>B. popilliae</i>	ATCC14706	X60633	1310/1341 (97%)
<i>B. lautus</i>	NCIMB12780	X60621	1297/1342 (97%)
<i>B. lentimorbus</i>	ATCC14707	X60622	1287/1341 (95%)
<i>B. methanolicus</i>	C1	X64465	1287/1346 (95%)
<i>B. thuringiensis</i>	WS2614	Z84593	1362/1452 (93%)
<i>B. marismortui</i>	123	AJ009793	1269/1327 (95%)
<i>B. sporothermodurans</i>	M215	U49078	1257/1313 (95%)
<i>B. cereus</i>	IAM12605	D16266	1324/1408 (94%)
<i>B. mycoides</i>	MWS5303-1-4	Z84591	1332/1423 (93%)
<i>B. pantothenicus</i>	IAM11061	D16275	1224/1283 (95%)
<i>B. pseudofirmus</i>	DSM8715	X76439	1245/1314 (94%)
<i>B. atrophaeus</i>	NCIMB12899	X60607	1242/1341 (92%)
<i>B. smithii</i>	DSM4216	Z26935	1234/1303 (94%)

X = จำนวนเบสที่มีความเหมือนกัน

Y = จำนวนเบสทั้งหมดที่ทำการเปรียบเทียบ

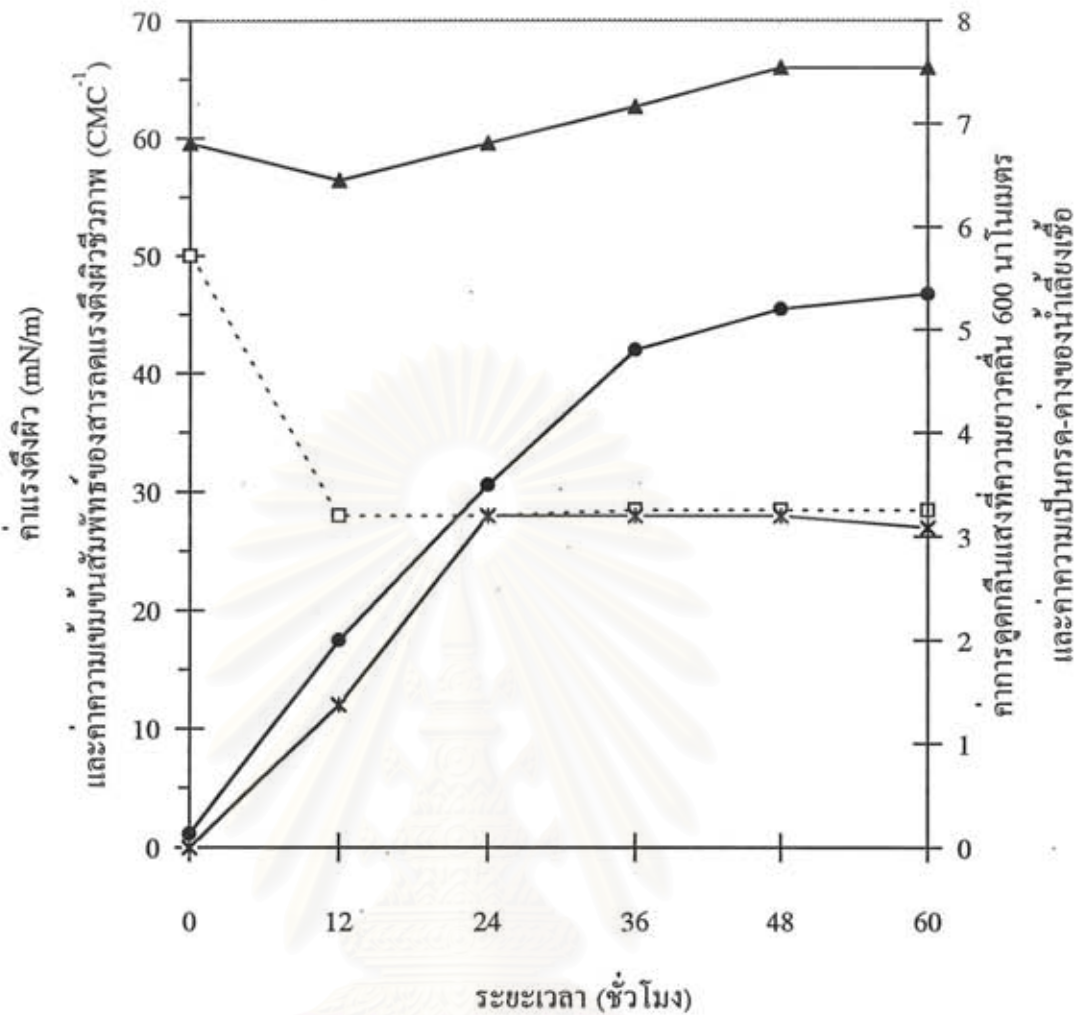
* ที่มา : GenBank

4.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารลดแรงดึงผิวชีวภาพของ *Bacillus subtilis* BBK-1

จากการติดตามรูปแบบการเจริญของ *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มสูงขึ้น และเข้าสู่ระยะพักเมื่อชั่วโมงที่ 36 สำหรับการติดตามความสามารถในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยการวัดค่าแรงดึงผิวที่ลดลงของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อและค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ พบว่าแบคทีเรียจะเริ่มผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ และปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเริ่มเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และจะให้ผลดีที่สุดเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 โดยสามารถลดแรงดึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 50 mN/m ลงเหลือ 28mN/m มีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเท่ากับ 28 โดยมีแนวโน้มที่จะคงที่ตลอดไป แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตนี้เป็นสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิซึ่งผลิตพร้อมกับการเจริญ สอดคล้องกับสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่รายงานในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เช่น สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. AB-2 (Banat, 1993) ; *Bacillus licheniformis* JF-2 (Lin และคณะ, 1994b) ; *Bacillus licheniformis* BAS50 (Yakimov และคณะ, 1995) ; *Bacillus subtilis* 3/38 (ชนขวัญ บุญบัน, 2539) และ *Bacillus licheniformis* F2.2 (บงกช สุทธิวานิชกุล, 2540) เป็นต้น สำหรับระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 24 ชม. จะให้ผลผลิตสูงสุดและมีแนวโน้มที่จะคงที่ตลอดไป เช่นเดียวกับที่รายงานไว้ของ *Bacillus subtilis* RB14 (Ohno และคณะ, 1992) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลังจากเวลา 24 ชม. เป็นต้นไปเป็นระยะที่แบคทีเรียจะเริ่มเข้าสู่ระยะพัก จึงไม่มีการผลิตสารออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักคือให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 6.2-7.5 ซึ่งอาจเนื่องมาจากอาหารเหลวแอลบีเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบสมบูรณ์ (complex medium) ประกอบด้วยสารอินทรีย์ เช่น ทริปโตเนนและสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งอาจสามารถช่วยพยุงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และสังเกตพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงแรกจะลดลงและค่อยๆ เพิ่มขึ้นในระยะหลังของการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่จะมีการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับที่รายงานไว้ของ *Bacillus subtilis* YB8 (Tsuge และคณะ, 1995)

4.4 สูตรอาหารที่เหมาะสม

การทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ในขวดเขย่าโดยใช้สูตรอาหาร 3 ชนิดที่เติมเพิ่มด้วยโซเดียมคลอไรด์ 5



--□-- ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—×— ค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

—▲— ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—●— รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

รูปที่ 4.3 รูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที

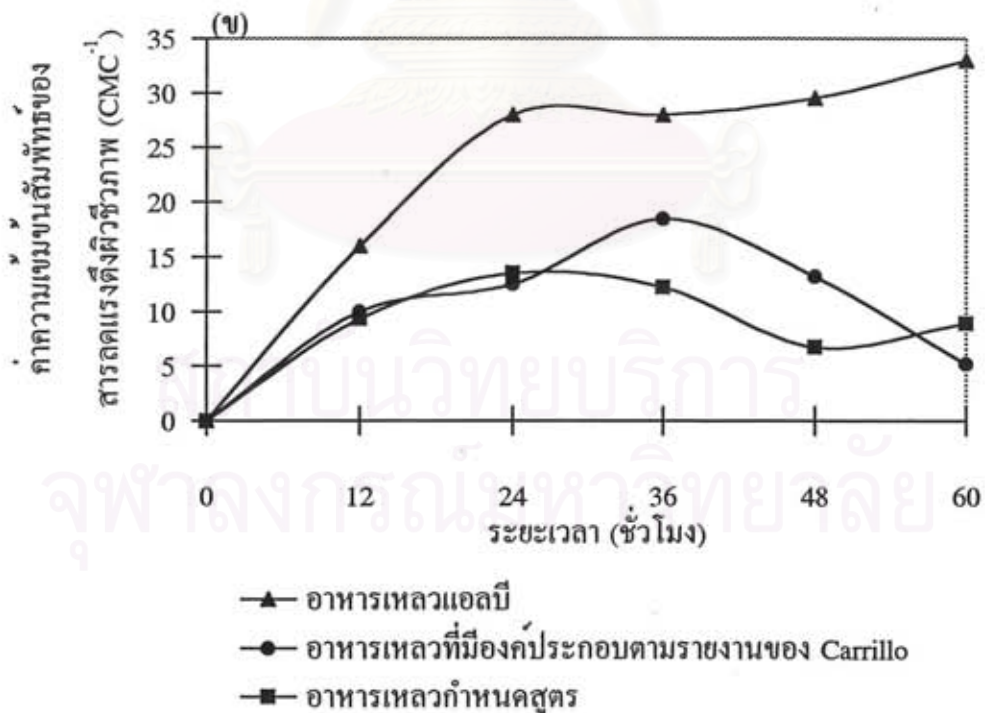
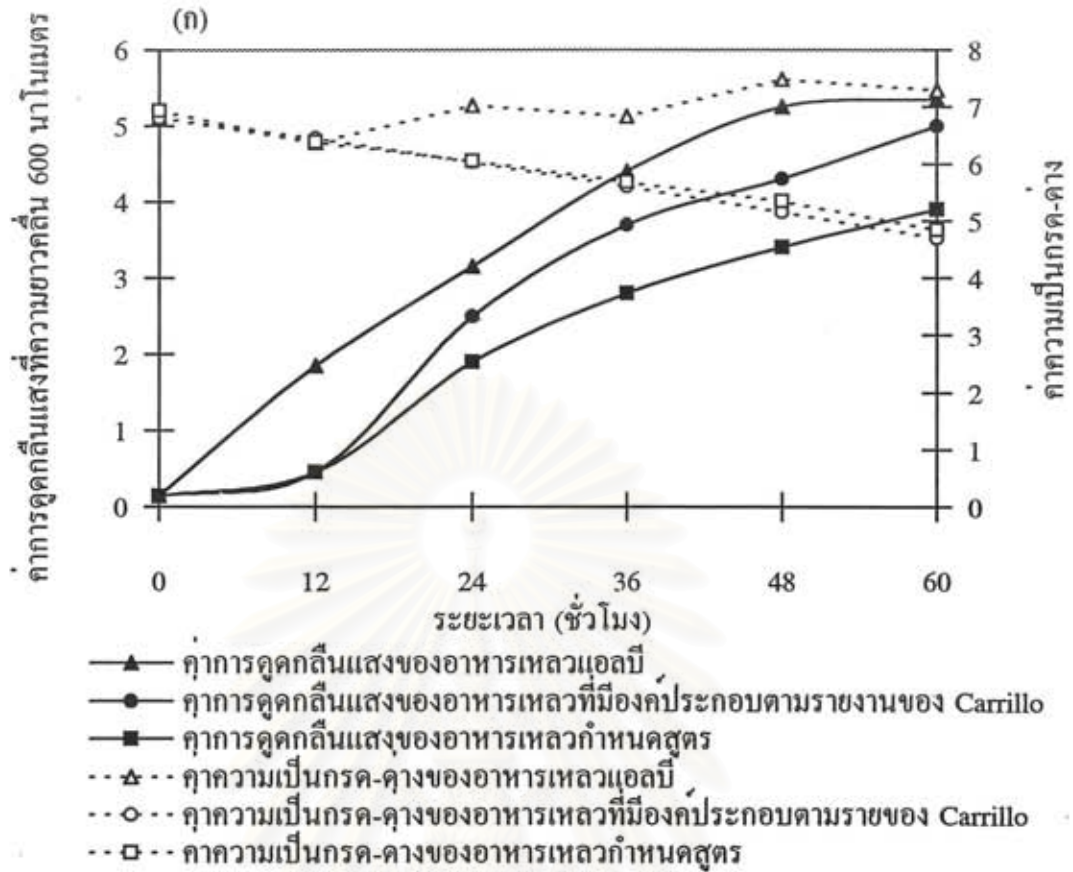
% ได้แก่ อาหารเหลวกำหนดสูตรซึ่งเป็น minimal medium ที่นิยมใช้สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* (Jenny และคณะ, 1993) อาหารที่มีองค์ประกอบตามรายงานของ Carrillo และคณะ (1996) และอาหารเหลวแอลบีซึ่งเป็นสูตรอาหารเริ่มต้นที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียพบว่า *Bacillus subtilis* BBK-1 จะมีการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดในอาหารแอลบี ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 28 ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. และมีการผลิตที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ เมื่อเทียบกับอาหารเหลวกำหนดสูตร และอาหารที่มีองค์ประกอบตามรายงานของ Carrillo และคณะ (1996) ซึ่งความเข้มข้นสัมพัทธ์จะลดลงภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. และ 36 ชม. ตามลำดับ ทั้งนี้สาเหตุที่อาหารเหลวกำหนดสูตร และอาหารที่มีองค์ประกอบตามรายงานของ Carrillo และคณะ (1996) มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำกว่าอาหารเหลวแอลบี อาจเนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิดลดลงตลอดช่วงเวลาของการเลี้ยงเชื้อซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นเดียวกับการทดลองของธนขวัญ บุญบัน (2539) ที่พบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38 จะลดลงภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเหลวแอลบีสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทดลองขั้นต่อไป

4.5 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1

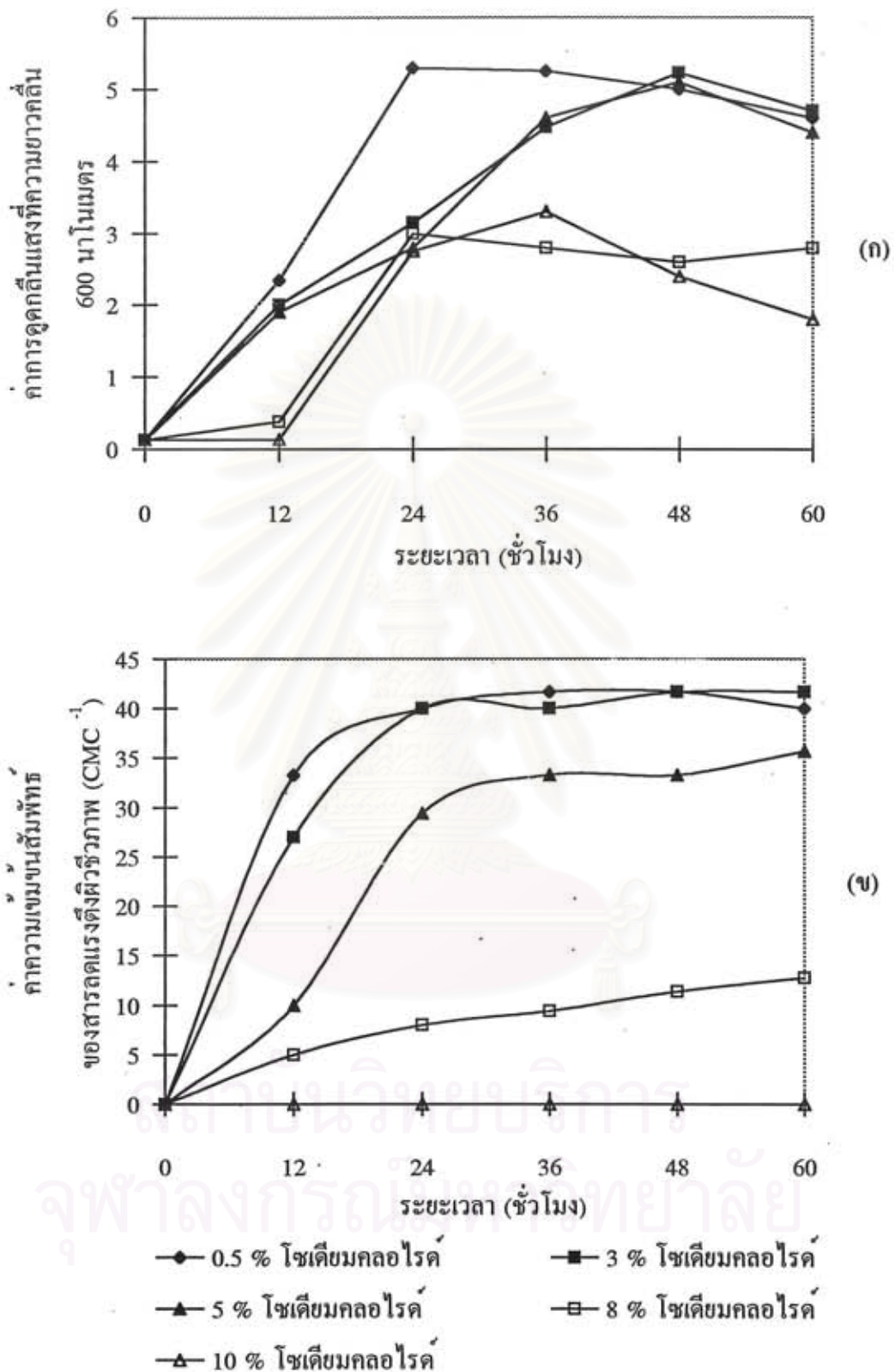
เพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.5.1 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ในอาหารเหลวแอลบี โดยแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 3, 5, 8 และ 10 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวัดค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่า *Bacillus subtilis* BBK-1 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 % และการเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น โดยเชื้อจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 และ 3 % โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเท่ากับ 40 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. และการผลิตจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lin และคณะ (1994b) ที่พบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* JF-2 จะเกิดขึ้นได้ดีใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 4.4 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (ก) และค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ (ข) ของ *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาว 3 ชนิด ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 5 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 บมบน เครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.5 การเจริญ (ก) และค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ข) ของ *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบีที่แปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที

0.5 และ 2 % และการผลิตสารจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงกว่านี้ โดยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 3 % อาจยับยั้งการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในช่วงที่ทดลองนั้นไม่มีผลต่อการลดค่าแรงดึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อมากนัก (ภาคผนวก จ) เมื่อทำการทดสอบผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการลดค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.5 และ 3 % พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ภาวะยังคงสามารถลดค่าแรงดึงผิวได้เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15 % เท่ากัน และประสิทธิภาพในการลดค่าแรงดึงผิวจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 3-10 % แต่ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีประสิทธิภาพในการลดแรงดึงผิวที่ดีกว่า ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5 อาจเนื่องจากสัดส่วนของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพทั้ง 3 ชนิดที่ผลิตขึ้นแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่นค่า CMC ของเซอร์แฟกดินลดลงจาก 250 mg/l เหลือ 130 mg/l เมื่อผสมอิทูลิน A ที่อัตราส่วน 1:1 โดยโมล (Thimon และคณะ, 1992a) ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % สำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในการทดลองขั้นต่อไป

4.5.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการศึกษาเพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ในขวดเขย่า เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % โดยแปรผันชนิดของสารคาร์บอนต่างๆ กันที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่า *Bacillus subtilis* BBK-1 จะผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ใกล้เคียงกันเมื่อใช้กลีเซอรอล กลูโคส ซูโครสเกรควิเคราะห์และเกรคูดสาหกรรมาอาหารเป็นสารคาร์บอน โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเท่ากับ 40 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6 สอดคล้องกับการทดลองของ Sandrin และคณะ (1990) ; Yakimov และคณะ (1995) ขณะที่พาราฟินให้ผลผลิตไม่คืนัก โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเท่ากับ 30 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ทั้งนี้เนื่องมาจากว่าพาราฟินเองเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ และอาจยับยั้งการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ อย่างเช่นที่รายงานไว้สำหรับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (Cooper และคณะ, 1981 ; Sandrin และคณะ, 1990 ; Kim และคณะ, 1997a) ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ซูโครสเกรคูดสาหกรรมาอาหาร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากเป็นสารคาร์บอนที่มีราคาไม่สูงนัก และหาง่ายในประเทศ

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแอลบีที่ผสม 0.5 และ 3 % โซเดียมคลอไรด์

ความเข้มข้นสุดท้ายของ โซเดียมคลอไรด์ในส่วนน้ำใส (%)	% การลดลงของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์	
	อาหารเหลวแอลบีที่ผสม 0.5 % โซเดียมคลอไรด์	อาหารเหลวแอลบีที่ผสม 3 % โซเดียมคลอไรด์
3	28	36
5	36	44
8	20	44
10	12	36
15	0	0
20	-20	-12
30	-40	-24

ทำการเจือจางส่วนน้ำใสภายหลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วจึงทำการวัดค่าแรงดึงผิว

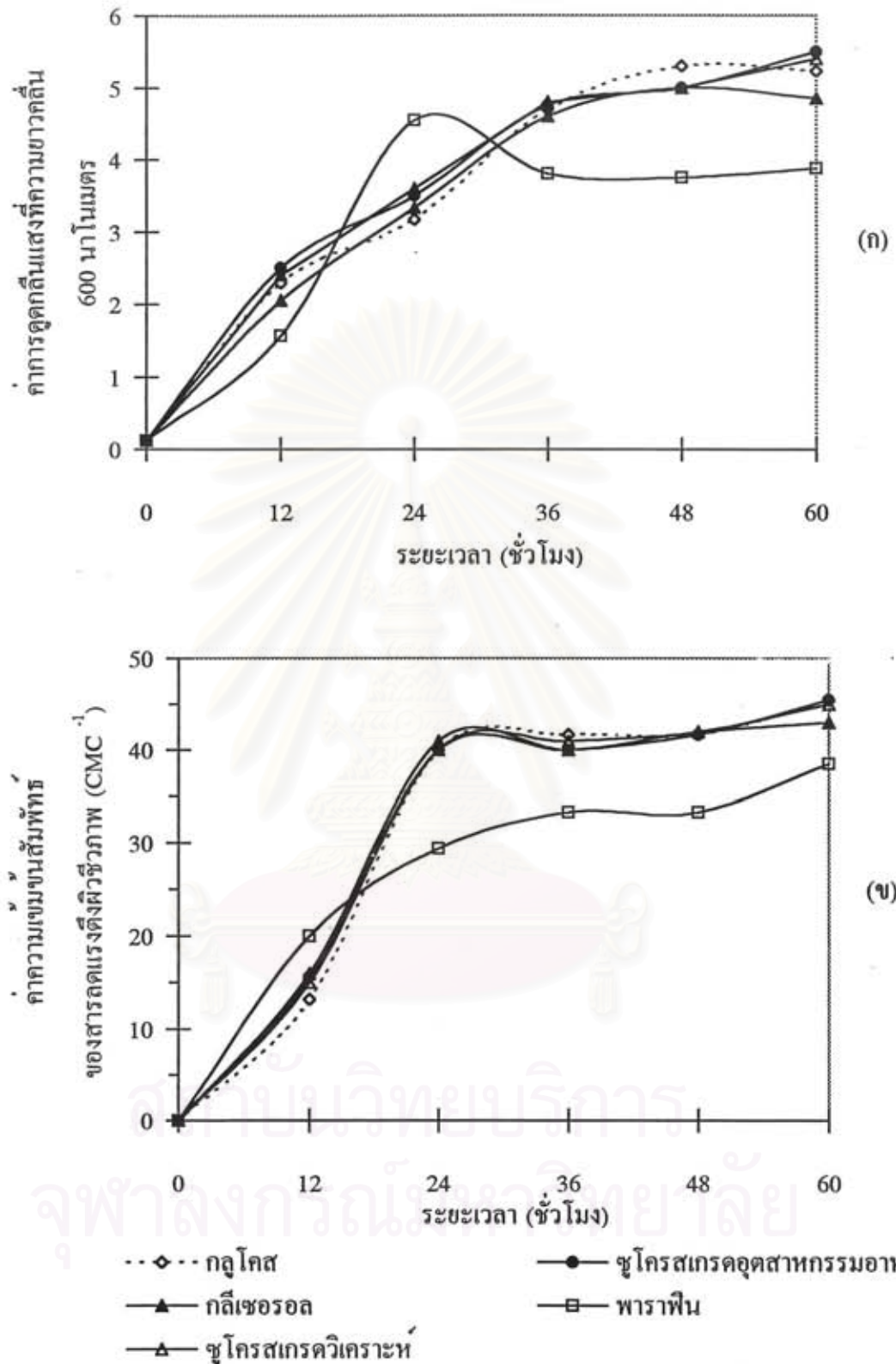
เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (CMC)

$$= \frac{[\text{ค่า CMC เริ่มต้น} - \text{ค่า CMC หลังการเพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์}]}{\text{ค่า CMC เริ่มต้น}} \times 100$$

ถ้ามีค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า CMC

ถ้ามีค่าติดลบแสดงว่าประสิทธิภาพในการลดแรงดึงผิวลดลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



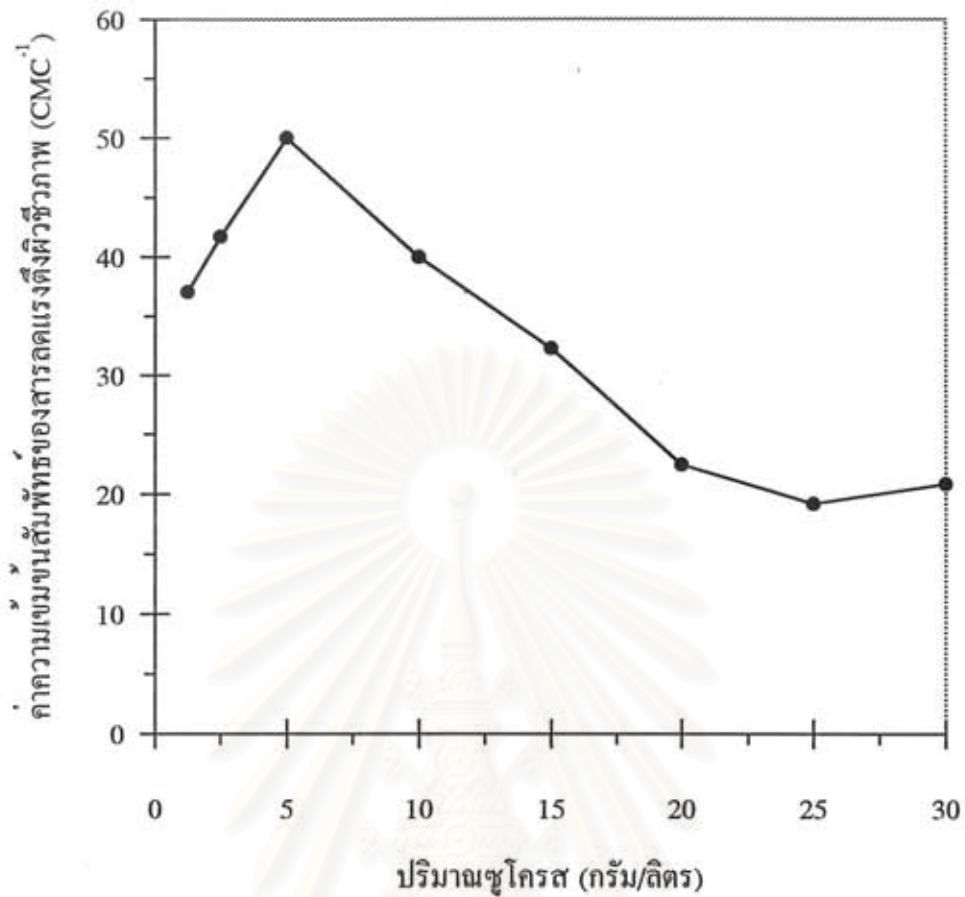
รูปที่ 4.6 การเจริญ (ก) และค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ (ข) ของ *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแอลบีที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) ด้วยอัตราการใช้ 200 รอบต่อนาที

4.5.3 ปริมาณของจุลินทรีย์ที่เหมาะสม

ทำการหาปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยทำการแปรผันปริมาณตั้งแต่ 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าจุลินทรีย์ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเท่ากับ 50 และการผลิตจะลดลงเมื่อปริมาณของจุลินทรีย์น้อยและมากกว่า 5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7 ลักษณะเช่นนี้พบได้เช่นกันในการผลิตแรมโนลิปิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 ที่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 20 กรัม/ลิตร การผลิตแรมโนลิปิดจะลดลงอย่างชัดเจนเนื่องจากความสามารถในการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียลดลง (Ramana และ Karanth, 1989) ดังนั้นจึงเลือกจุลินทรีย์ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในการทดลองขั้นต่อไป

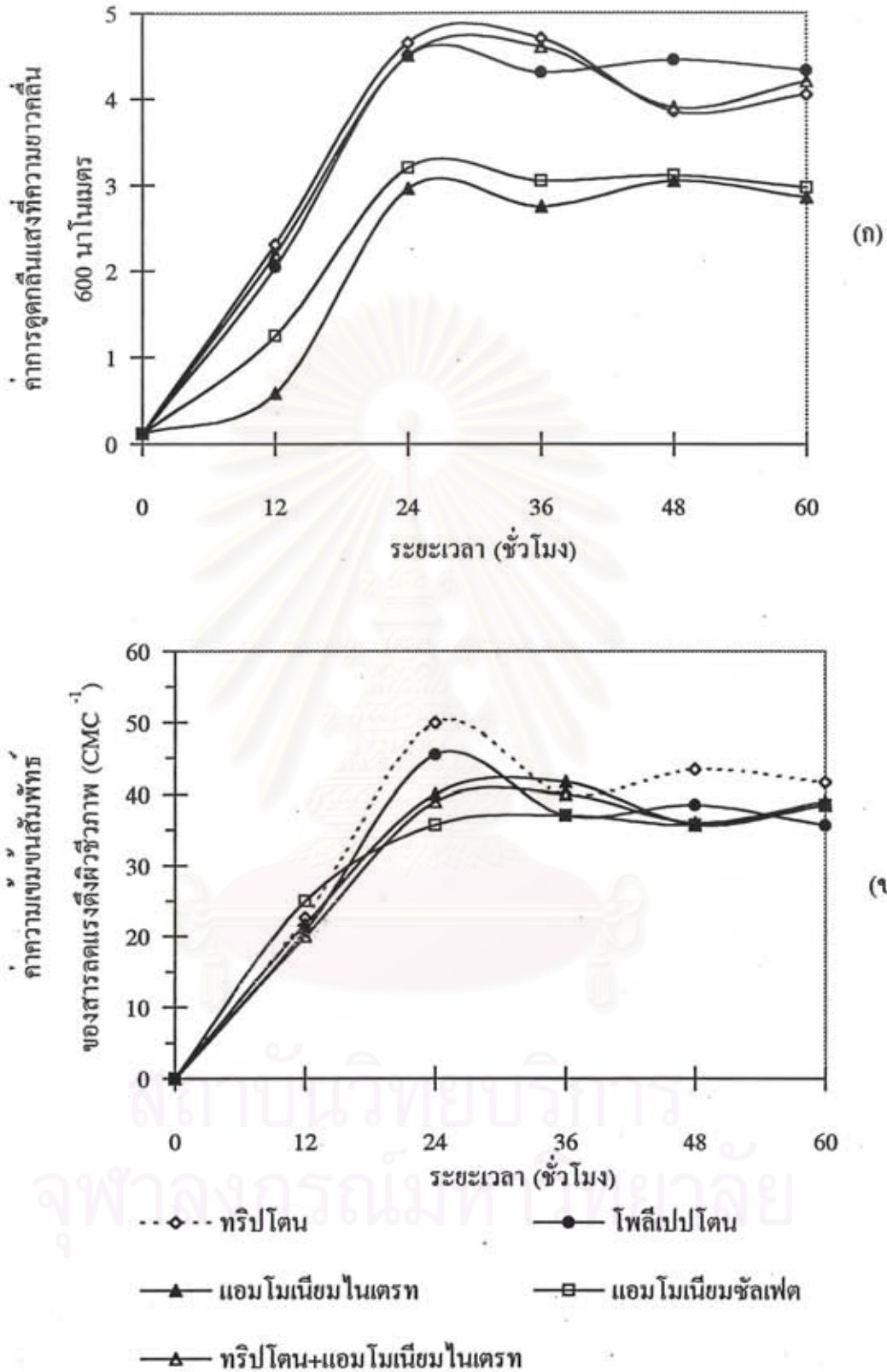
4.5.4 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการศึกษาเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ในขวดเขย่า เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % และมีจุลินทรีย์ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ ทรีปโตน โพลีเปปโตน และสารไนโตรเจนอนินทรีย์ได้แก่ แอมโมเนียไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต โดยเทียบให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากันในแหล่งไนโตรเจนทุกชนิด เท่ากับปริมาณไนโตรเจนในทรีปโตน 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 1.37 กรัมต่อลิตร และการใช้ทรีปโตนร่วมกับแอมโมเนียไนเตรทซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนอย่างละ 0.69 กรัมต่อลิตร พบว่า *Bacillus subtilis* BBK-1 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลวที่มีสารไนโตรเจนชนิดอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยทรีปโตนเป็นสารไนโตรเจนที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้สูงสุด ซึ่งมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเท่ากับ 50 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8 รองลงมาคือโพลีเปปโตน ติดตามด้วยแอมโมเนียไนเตรท ทรีปโตนร่วมกับแอมโมเนียไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ดังนั้นจึงเลือกแอมโมเนียไนเตรทซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ดี และมีค่าใกล้เคียงกับการใช้ทรีปโตนร่วมกับแอมโมเนียไนเตรท โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเท่ากับ 40 มาศึกษาเกี่ยวกับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากมีราคาที่ถูกกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์



รูปที่ 4.7 ผลของปริมาณซูโครสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรปริมาณซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ บนบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



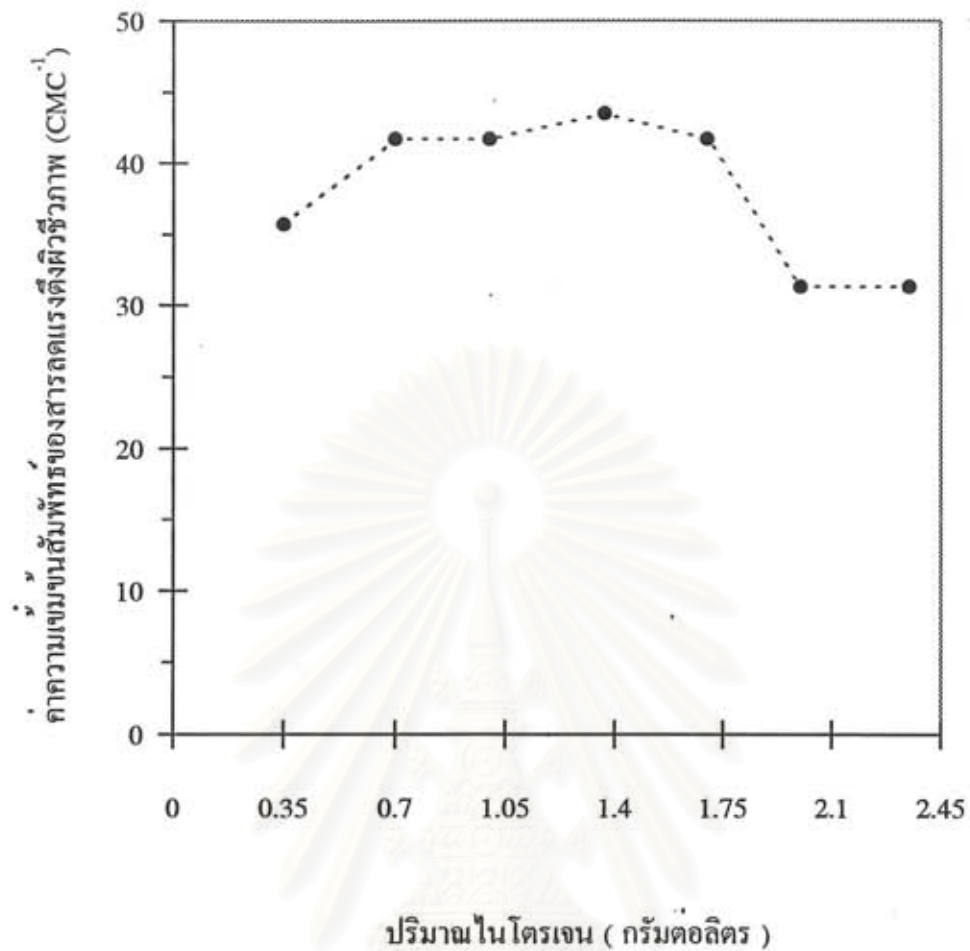
รูปที่ 4.8 การเจริญ (ก) และค่าความเข้มขั้นสัมพันธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ (ข) ของ *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเริ่มต้น 1.37 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) ด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที

4.5.5 ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรทที่เหมาะสม

ทำการหาปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยทำการแปรผันปริมาณตั้งแต่ 0.35, 0.70, 1.0, 1.37, 1.70, 2.0, และ 2.35 กรัมต่อลิตร พบว่าแอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.7 ถึง 1.70 กรัมต่อลิตรให้การผลิตที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพันธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประมาณ 40 และการผลิตจะลดลงเมื่อปริมาณของไนโตรเจนน้อยกว่า 0.7 กรัมต่อลิตร และมากกว่า 1.70 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงคังรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียต้องการแอมโมเนียมไนเตรทสำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ซึ่งมีรายงานว่าแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* (Cooper และคณะ, 1981 ; Roubin และคณะ, 1989) พร้อมรายงานว่าแบคทีเรียจะใช้ไนโตรเจนทั้งในรูปของแอมโมเนียมและไนเตรทสำหรับการผลิตเซอร์แฟคติน โดยในช่วงแรกแบคทีเรียจะใช้ไนโตรเจนในรูปของไนเตรทสำหรับการเจริญ ในช่วงนี้ปริมาณของเซอร์แฟคตินจะยังอยู่ในระดับต่ำ เมื่อขาดไนเตรทแบคทีเรียจะใช้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมสำหรับการผลิตเซอร์แฟคตินต่อไป (Roubin และคณะ, 1989) ดังนั้นจึงเลือกแอมโมเนียมไนเตรทที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในการทดลองขั้นต่อไป

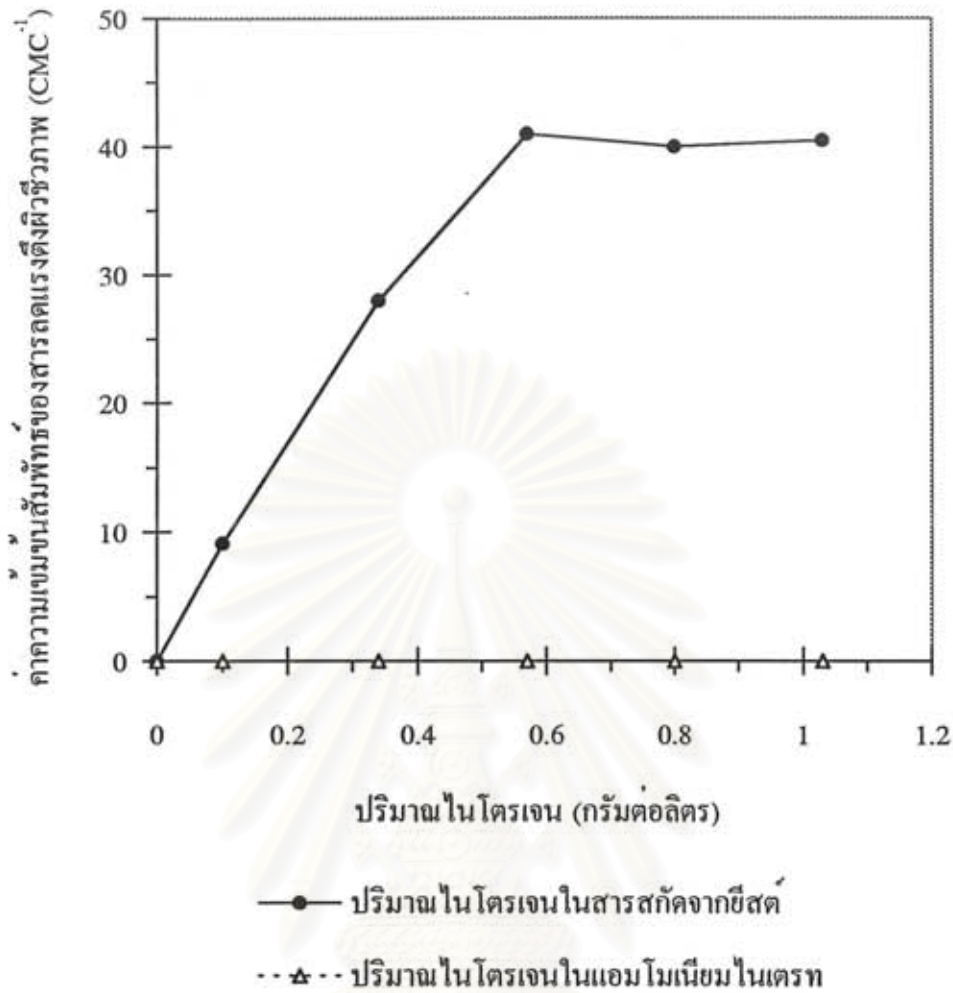
4.5.6 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม

เนื่องจากในสูตรอาหารที่ใช้ยังประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 11.42 % (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียอาจใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมด้วย จึงทำการหาปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยทำการแปรผันปริมาณตั้งแต่ 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, และ 9.0 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.10, 0.34, 0.57, 0.80 และ 1.03 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เปรียบเทียบกับเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนของแอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้นดังกล่าวแทนการเพิ่มไนโตรเจนจากสารสกัดจากยีสต์ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทโดยไม่มีสารสกัดจากยีสต์ แบคทีเรียจะไม่ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเนื่องจากไม่มีการเจริญของเชื้อ และแบคทีเรียจะผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารสกัดจากยีสต์ และพบว่าสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.57 ถึง 1.03 กรัมต่อลิตรให้การผลิตที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพันธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประมาณ 40 ผลการทดลองแสดงคังรูปที่ 4.10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากยีสต์จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 สอดคล้องกับการทดลองของ Kim และคณะ (1997a) ; Hommel และคณะ (1987) ที่รายงานว่าสาร



รูปที่ 4.9 ผลของปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรทต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปร ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรท บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ผลของการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในรูปสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมไนเตรทต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เริ่มต้น ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรปริมาณไนโตรเจนในรูปสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมไนเตรท บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สกัดจากยีสต์จะช่วยเสริมการผลิตเซอร์แฟคติน C9-BS และชอบพอโรสลิปีดจาก *Bacillus subtilis* C9 และ *Torulopsis apicola* IMET 43747 ตามลำดับ

4.6 ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* BBK-1 เพื่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

4.6.1 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

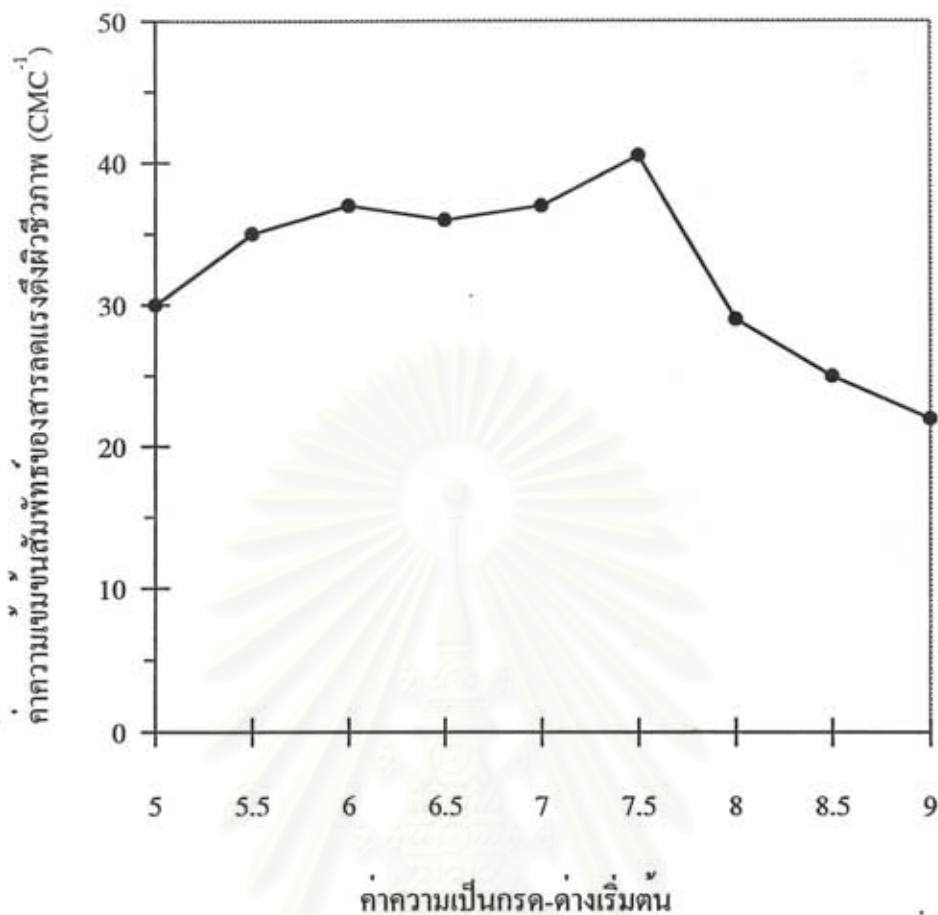
จากการศึกษาเพื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ในขวดเขย่า โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 5.0-9.0 เก็บตัวอย่างพร้อมกันเมื่อครบ 24 ชม. พบว่า *Bacillus subtilis* BBK-1 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 40 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11 อาจเนื่องมาจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างดังกล่าวเป็นค่าที่เหมาะสมเมตาบอลิซึมของเซลล์ ตัวอย่างเช่นการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* จะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 หรือต่ำกว่า แต่การผลิตเซอร์แฟคตินจะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างให้ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง เนื่องจากการแสดงออกของ *srfA* operon ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เซอร์แฟคตินเพิ่มสูงขึ้น (Cosby และคณะ, 1998)

4.6.2 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

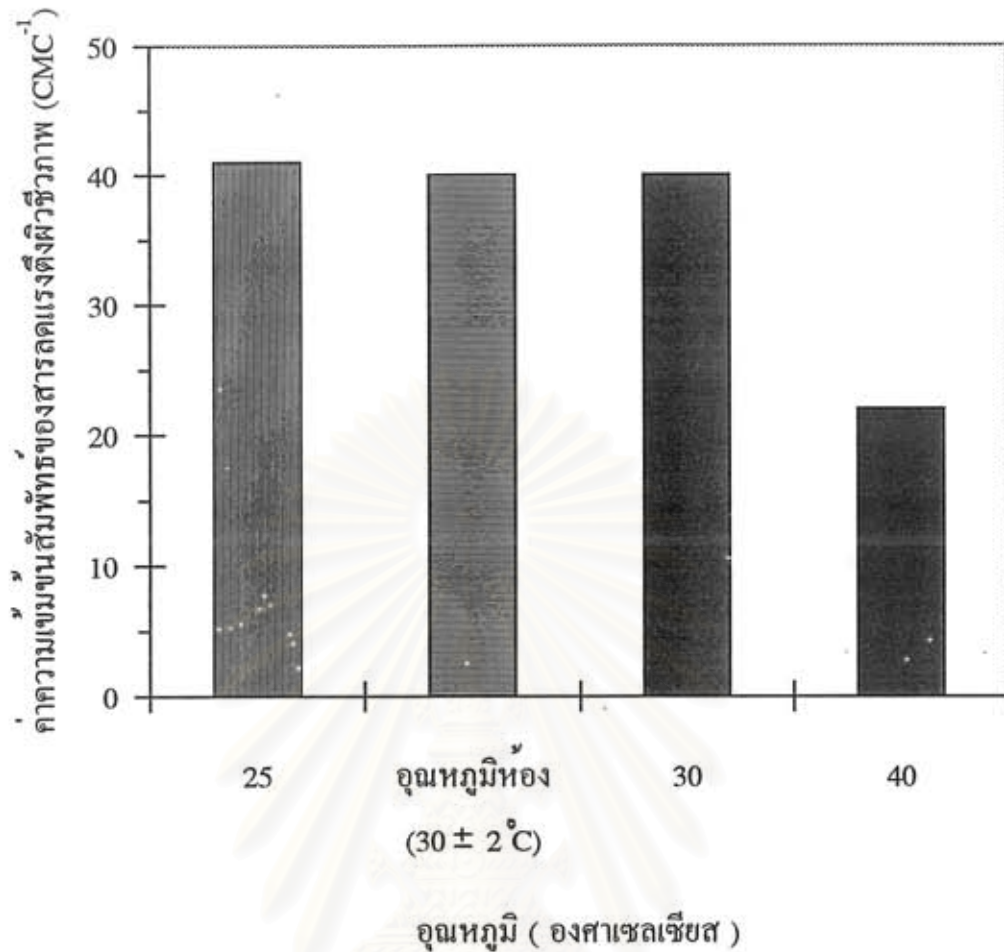
จากการศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ในขวดเขย่า โดยแปรผันอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อในช่วง 25-40 °C เก็บตัวอย่างพร้อมกันเมื่อครบ 24 ชม. พบว่า *Bacillus subtilis* BBK-1 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ดีใกล้เคียงกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C 30 °C และอุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °C) โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเท่ากับ 40 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12 ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* (Kim และคณะ, 1997a ; Sen และ Swaminathan, 1997)

4.6.3 ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสม

จากการศึกษาเพื่อหาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* ในขวดเขย่า โดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าที่ 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างพร้อมกันเมื่อครบ 24 ชม. พบว่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที *Bacillus subtilis* BBK-1 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 โดยมีค่าความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเท่ากับ 40

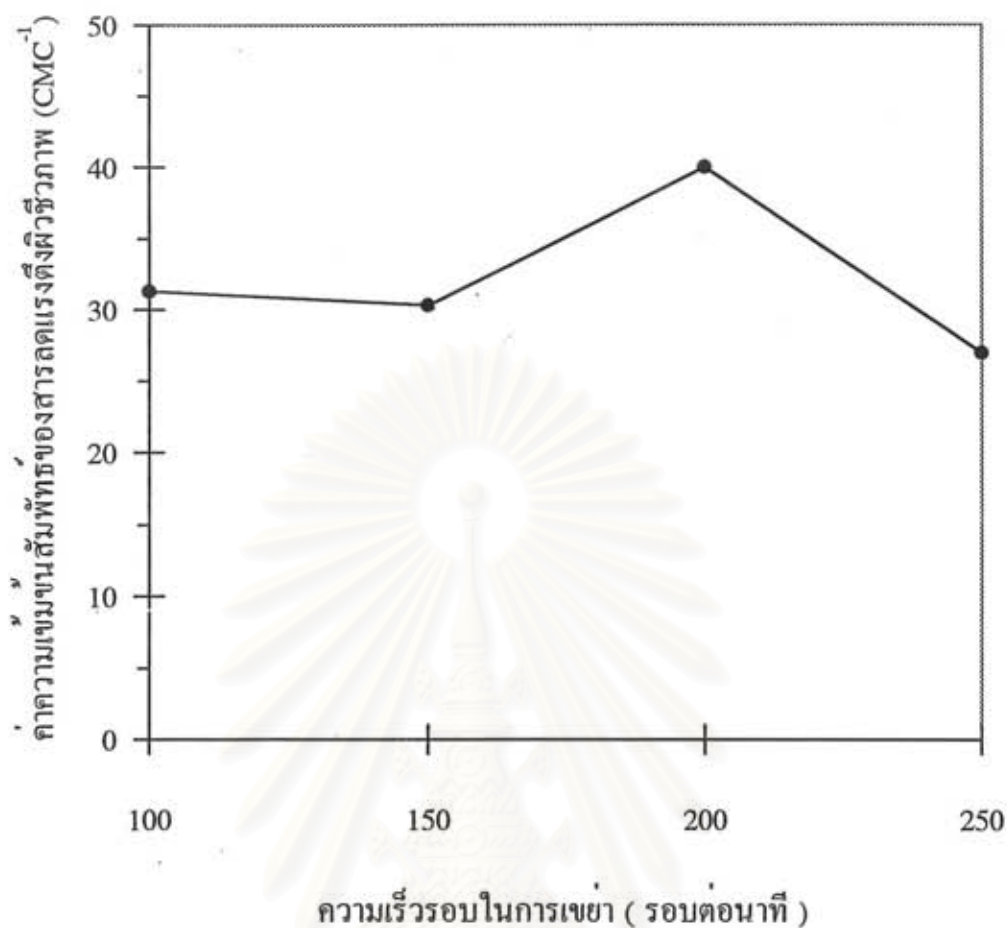


รูปที่ 4.11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ มีสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน เกลือแร่และวิตามิน แปรรค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.12 ผลของอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีชูโครส 5 กรัม ต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน อนินทรีย์ มีสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน กลีเซอรอลและวิตามิน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 แปรอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 ผลของความถี่รอบในการเขย่าต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 3 % มีซูโครส 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ มีสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน กลีเซอรอลและวิตามิน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) แปลความถี่รอบในการเขย่า เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และการผลิตจะลดลงเมื่อความเร็วรอบในการเขย่าต่ำและสูงกว่านี้ซึ่งมีรายงานว่าทำให้อากาศเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (Sheppard และ Cooper, 1990) และการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* DSM 3256 จะเพิ่มสูงขึ้นถ้ามีอัตราการกวนที่ต่ำและเพิ่มอัตราการให้อากาศที่สูงขึ้น (Sen และ Swaminathan, 1997) ในทางตรงกันข้ามการจำกัดปริมาณออกซิเจนจะทำให้การผลิตไลเคนนิซิน บี และเซอร์แฟคติน C9-BS เพิ่มสูงขึ้น (Lin และคณะ, 1994b ; Kim และคณะ 1997a)

จากการศึกษาสูตรอาหารและปัจจัยบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 พบว่าอาหารที่ทำการปรับสูตรแล้วประกอบด้วยซูโครส 5 กรัมต่อลิตร, แอมโมเนียไนเตรท 2 กรัมต่อลิตร, สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่า CMC^{-1} เท่ากับ 40 นับว่าอยู่ในระดับที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

แบคทีเรีย	อาหารเลี้ยงเชื้อ	CMC^{-1}	เอกสารอ้างอิง
<i>B. subtilis</i> BBK-1	semisynthetic	40	งานวิจัยนี้
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	synthetic	40	Cooper และคณะ (1981)
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	peat hydrolysate	70	Sheppard และ Mulligan (1987)
<i>B. subtilis</i> DSM 3256	synthetic	45	Sen (1997)
<i>B. subtilis</i> DSM 3256	synthetic	53	Sen และ Swaminathan (1997)
<i>B. licheniformis</i> 86	synthetic	32	Horowitz และคณะ (1991)
<i>P. aeruginosa</i> DSM 2659	synthetic	60	Guerra-Santos และคณะ (1984)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	semisynthetic	25	Mulligan และ Gibbs (1989)
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	semisynthetic	20	Robert และคณะ (1989)

4.7 สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1

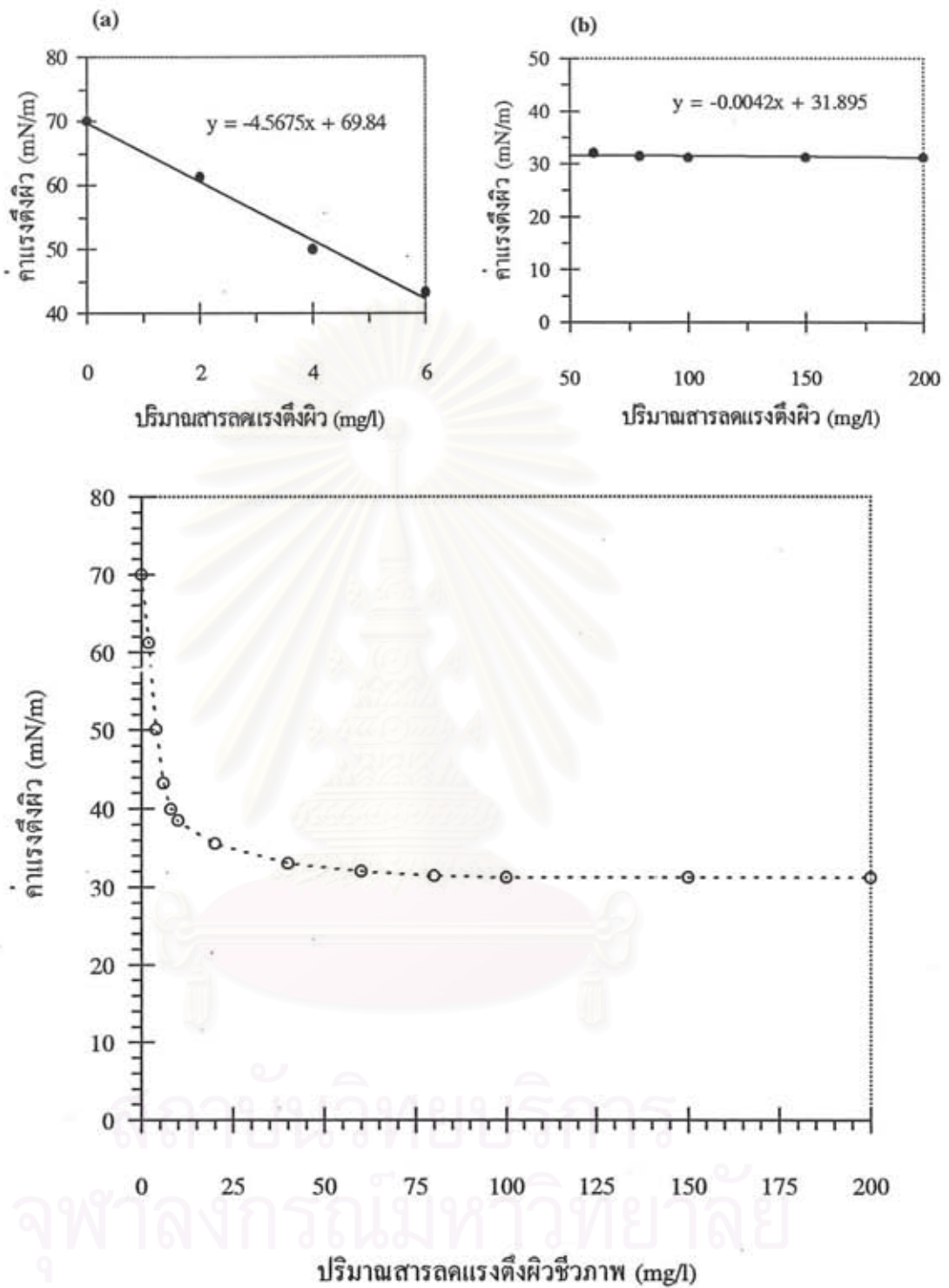
4.7.1. ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิว

จากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยเมทานอลด้วยวิธี LC-MS (รูปที่ 4.22) พบว่าสารที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง เมื่อทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ พบว่าค่าแรงตึงผิวจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 70 mN/m ถึง 33 mN/m เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวเพียง 40 mg/l แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงขึ้นมากกว่านี้ค่าแรงตึงผิวจะไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.14 และจะเห็นได้ว่าเมื่อคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในช่วงที่น้อยกว่า 6 mg/l และมากกว่า 50 mg/l โดยอาศัยสมการ $y = ax + b$ พบว่าเมื่อความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-6 mg/l ค่า $a = -4.57$ mN/m/mg/l และค่า $b = 69.8$ mN/m (รูปที่ 4.14a) เมื่อความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-200 mg/l ค่า $a = -0.004$ mN/m/mg/l และค่า $b = 31.9$ mN/m (รูปที่ 4.14b) ซึ่งจะเห็นถึงความแตกต่างของความสัมพันธ์เชิงเส้นในช่วงดังกล่าว ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสารลดแรงตึงผิวในช่วงดังกล่าวมีบทบาทที่แตกต่างกัน กล่าวคือที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้อยกว่า 6 mg/l จะมีอิทธิพลต่อค่าแรงตึงผิวเป็นอย่างมาก แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 50 mg/l จะมีอิทธิพลน้อยมาก

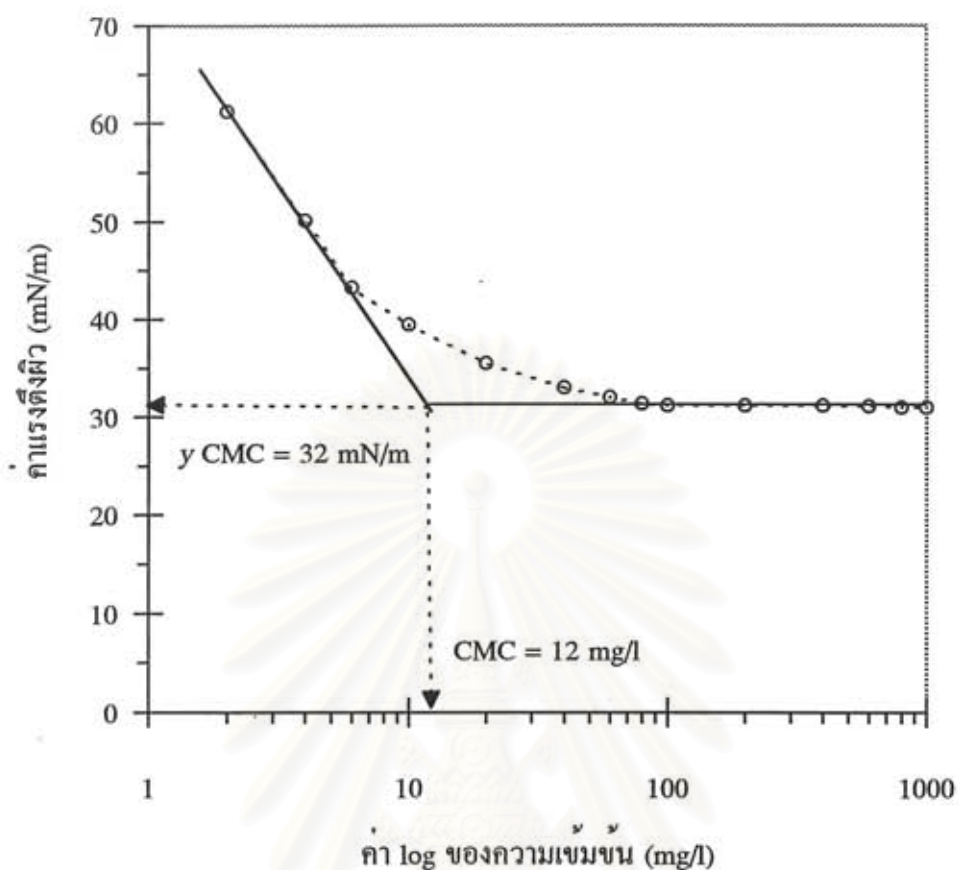
4.7.2. เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิด

สมบัติที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะต้องสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ใกล้เคียง 30 mN/m และมีค่า CMC ต่ำ กล่าวคือใช้สารในปริมาณน้อยก็เพียงพอที่จะลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุด จากการเปรียบเทียบค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BBK-1 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์โดยสร้างกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่า \log ของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวแสดงดังรูปที่ 4.15 และ 4.16 ค่า CMC คือจุดที่เส้นสัมผัสกราฟ 2 เส้นมาตัดกัน ถ้าพิจารณาจากกราฟจะเห็นได้ว่าในช่วงแรกค่าแรงตึงผิวจะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเลยบริเวณค่า CMC ไปแล้ว ค่าแรงตึงผิวจะเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก แต่จุดต่างๆบริเวณใกล้ค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์อาจเบี่ยงเบนไปจากแนวเส้นสัมผัสได้ เนื่องจากการมีสารปนเปื้อนที่อยู่ในสารลดแรงตึงผิวนั้นๆ (Clint, 1992)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่า CMC เท่ากับ 12 mg/l และมีค่า γ_{CMC} เท่ากับ 32 mN/m ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.15 ค่าแรงตึงผิวบริเวณใกล้ค่า CMC เบี่ยงเบนไปจากแนวเส้นสัมผัสอันเป็นผลมาจากการปนเปื้อนของสารลดแรงตึงผิวชนิดอื่นที่มีประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวที่ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวหลัก (Clint, 1992) โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นสารผสม

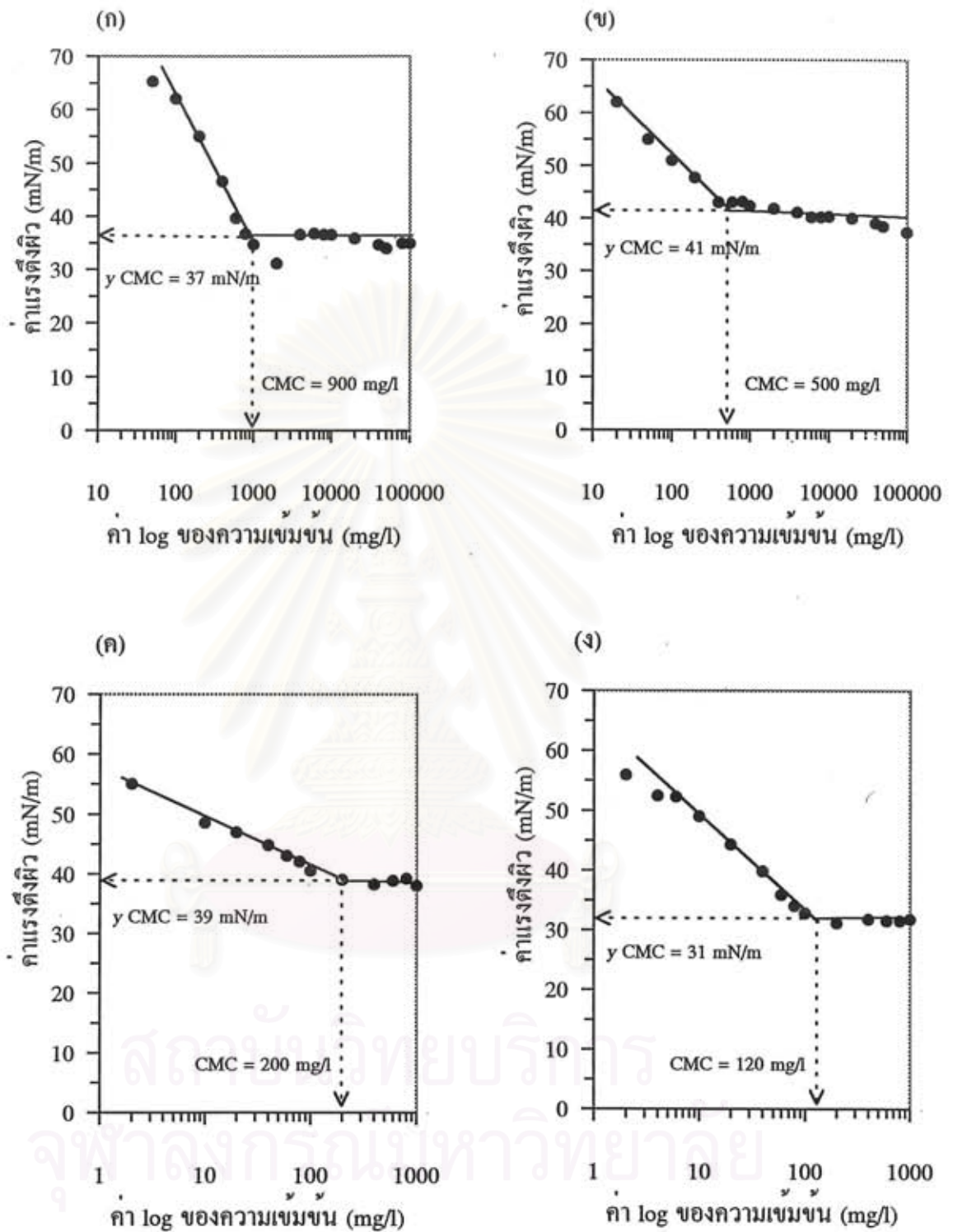


รูปที่ 4.14 ผลของการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BBK-1 ต่อค่าแรงตึงผิว เมื่อละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 20 mM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0



รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BBK-1 กับค่าแรงตึงผิว เมื่อละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 20 mM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์กับค่าแรงตึงผิว

Sodium dodecyl sulfate (ก) Cetylpyridinium chloride (ข) Tween 80 (ค) และ Triton

X-100 (ง)

ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 3 ชนิด ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้มีค่าที่ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์หลายชนิด ได้แก่ Sodium dodecyl sulfate, Cetylpyridinium chloride, Tween 80 และ Triton X-100 ซึ่งมีค่า CMC เท่ากับ 900, 500, 200 และ 120 mg/l ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.16 และตารางที่ 4.7

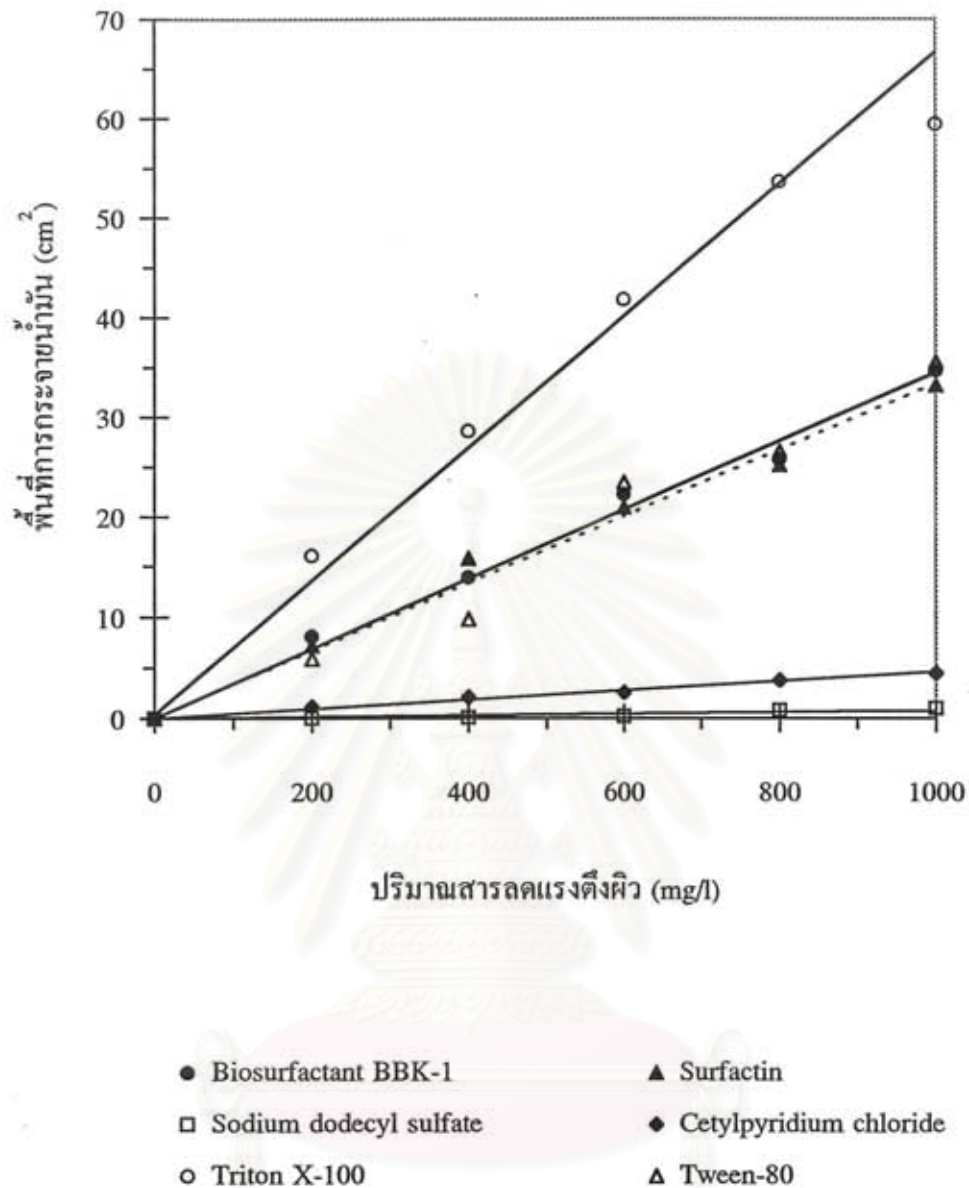
4.7.3 เปรียบเทียบค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับเซอร์แฟคตินและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิด

จากการเปรียบเทียบค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BBK-1 ที่ผลิตได้กับเซอร์แฟคติน และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์พบว่าพื้นที่การกระจายน้ำมันจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าความเข้มข้นโดยน้ำหนักของสารลดแรงตึงผิว โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BBK-1 มีประสิทธิภาพในการกระจายน้ำมันได้ดีเท่าเทียมกับเซอร์แฟคตินและ Tween 80 โดยดีกว่า Cetylpyridinium chloride และ Sodium dodecyl sulfate ประมาณ 8.4 และ 34 เท่าตามลำดับ ขณะที่ Triton X-100 มีประสิทธิภาพในการกระจายน้ำมันดีกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BBK-1 ประมาณ 1.9 เท่า ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.17

Tween 80 และ Triton X-100 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไร้ประจุมีค่า CMC ต่ำกว่าและมีค่าการกระจายน้ำมันที่สูงกว่า Sodium dodecyl sulfate และ Cetylpyridinium chloride ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุเป็นลบและบวกตามลำดับ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่ไร้ประจุจะไม่มีแรงผลักกันระหว่างโมเลกุล ทำให้การรวมตัวเป็นไมเซลล์เกิดได้ง่าย (Clint, 1992)

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* BBK-1 กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์บางชนิด

สารลดแรงตึงผิว	ค่าความเข้มข้นของการเกิดไมเซลล์ (mg/l)	ค่าแรงตึงผิว ณ จุดของการเกิดไมเซลล์ (mN/m)
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BBK-1	12	32
Cetylpyridinium chloride	500	41
Sodium dodecyl sulfate	900	37
Tween 80	200	39
Triton X-100	120	31

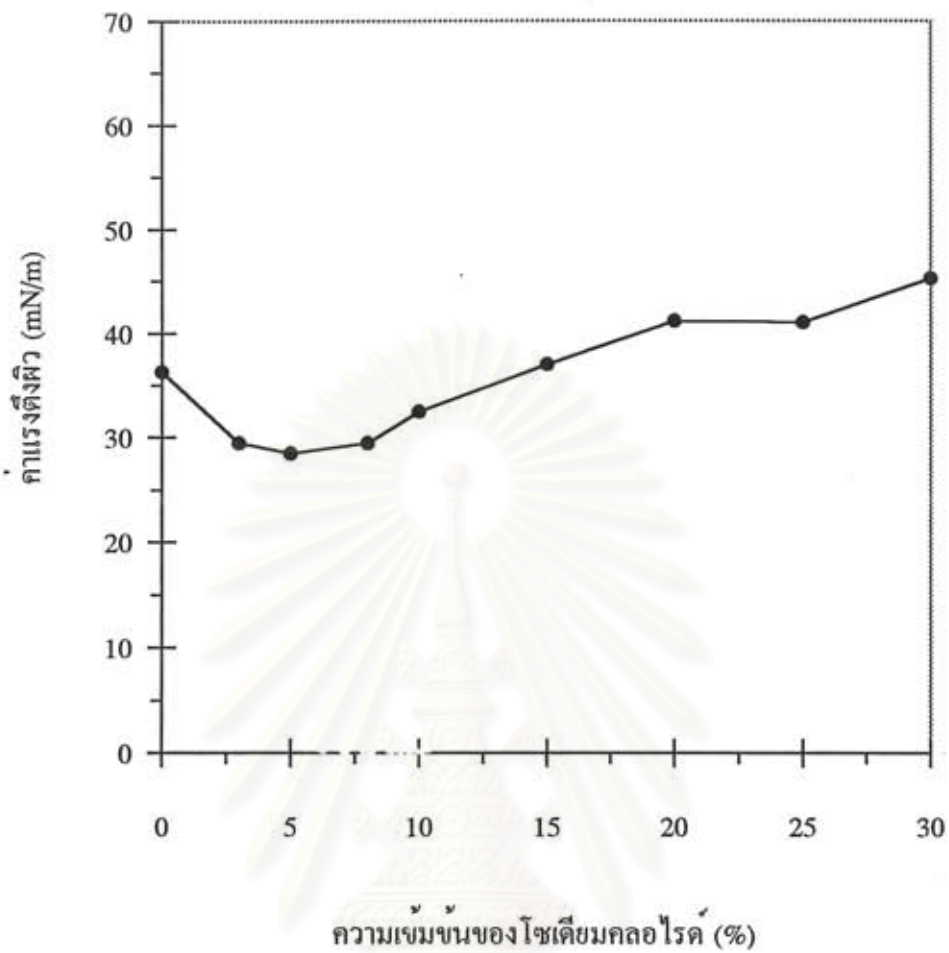


รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารลดแรงตึงผิวกับพื้นที่การกระจายน้ำมัน ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 20 mM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.0 และน้ำกลั่น ตามลำดับ แล้วทำการวัดค่าการกระจายน้ำมันโดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร

4.7.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่าง ต่อความสามารถในการลดแรงตึงผิว และผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

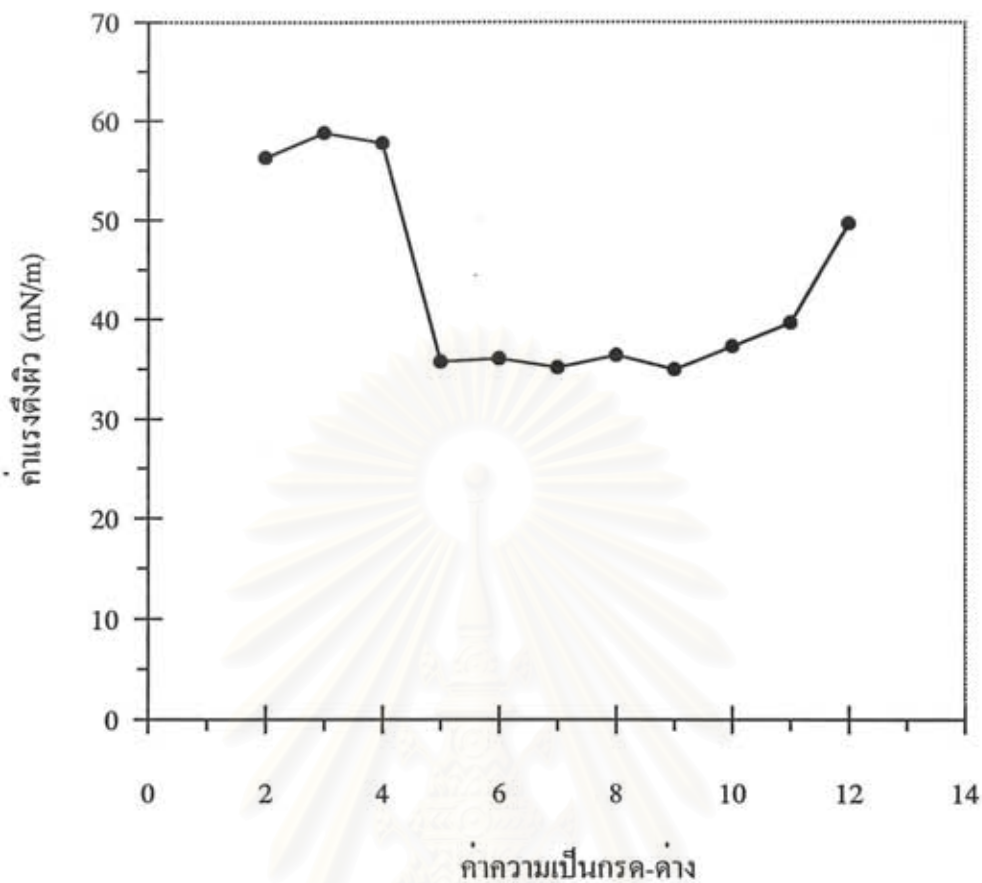
ผลการศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ยังคงมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15 % โดยความสามารถในการลดแรงตึงผิวจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 3-10 % โดยมีค่าแรงตึงผิวลดต่ำลง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.18 ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ McInemey และคณะ (1985) ; Horowitz และคณะ (1990) ; Lin และคณะ (1994a) ที่พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นเมื่อผสมโซเดียมคลอไรด์ 4 - 5 % นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การผสมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 100 mM ในสารละลายของเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* S499 จะทำให้ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวเพิ่มสูงขึ้น โดยจะทำให้ค่า CMC ลดลงจาก 240 mg/l เหลือเพียง 8 mg/l (Thimon และคณะ, 1992b) การเพิ่มขึ้นของค่า ionic strength ที่เหมาะสมในสารละลายอันเป็นผลมาจากการเติมโซเดียมคลอไรด์ซึ่งเป็นสารอิเล็กโทรไลต์ จะทำให้แรงผลักระหว่างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวลดลง ส่งผลให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นไมเซลล์ได้ง่ายขึ้น (Clint, 1992) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5-10 และประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวจะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำหรือสูงกว่านี้ โดยค่าแรงตึงผิวจะเพิ่มสูงขึ้น ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.19 การสูญเสียความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5.0 เนื่องจากการตกตะกอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงในช่วง 50-100 °C เป็นเวลา 5 ชม. และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยความสามารถในการลดแรงตึงผิวยังไม่เปลี่ยนแปลง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.20

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง และเมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง ตลอดจนมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นสมบัติที่ดีที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Horowitz และคณะ, 1990) ตัวอย่างเช่นในการผลิตผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดร่างกายบางชนิดนิยมผสมโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 3 % เพื่อใช้เป็น thickening agent และการผสมสารจะมีการให้ความร้อนในช่วง 40-80 °C ขึ้นกับขั้นตอนการผลิต (พิมลวรรณ พิทยานุกุล, 2533 ; Fiedler และ Umbach, 1987) สำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงในช่วง 100-121 °C จะมีประโยชน์ในการทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ปราศจากเชื้อ (Navon-Venezia และคณะ, 1995)



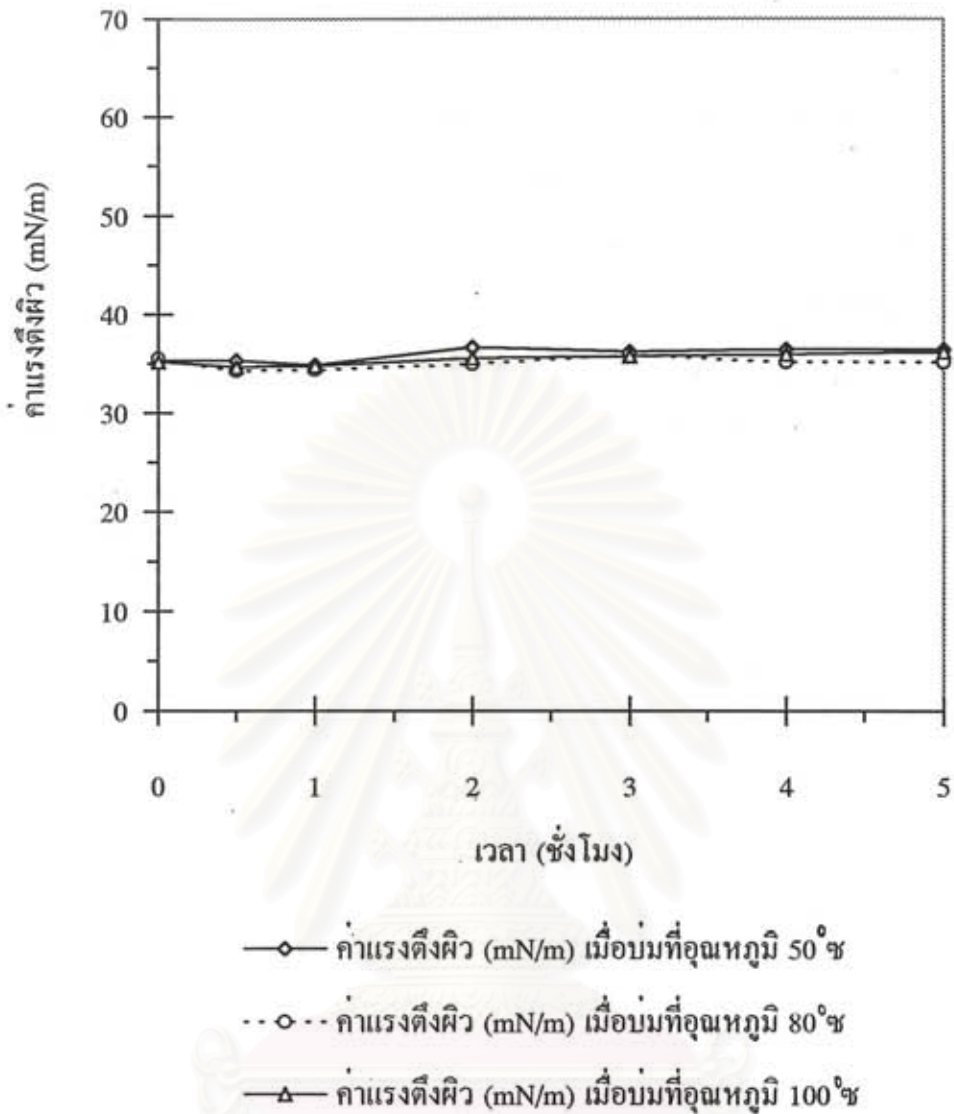
รูปที่ 4.18 ผลของความเข้มข้นของโชนีเดียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการลดแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 60 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความสามารถในการลดแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย 1 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.20 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 เมื่อบ่มสารละลายของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 50, 80 และ 100^oซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากสมบัติเบื้องต้นเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 มีสมบัติที่ดีกว่าสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ และมีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์หลายชนิดแสดงดังตารางที่ 4.8

4.8 องค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

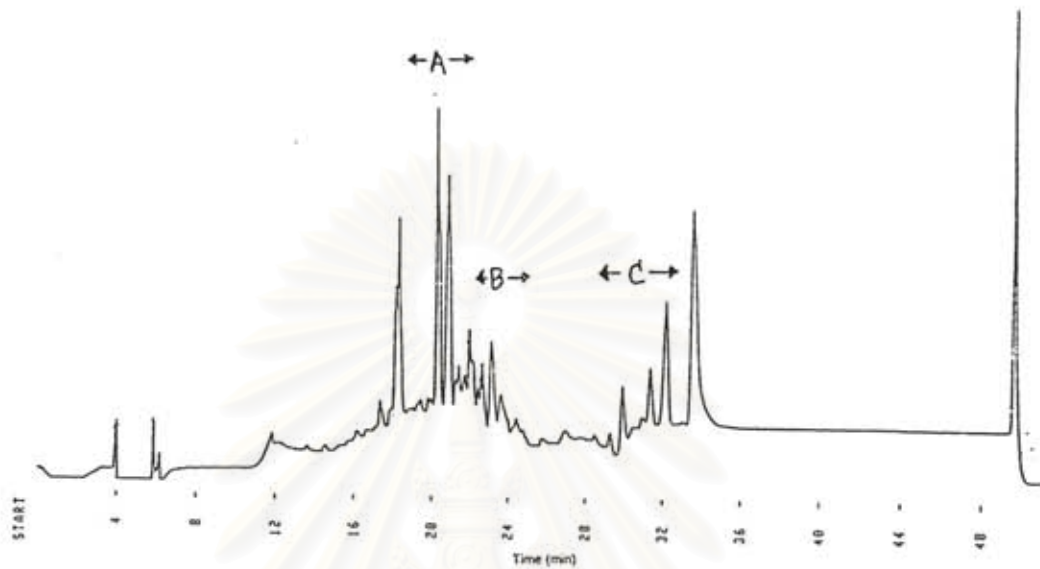
แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีรายงานว่าส่วนมากจะผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ขั้นตอนแรกทำการแยกสาร โดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้และมีประสิทธิภาพที่ดีในการแยกสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ออกจากน้ำเลี้ยง (McInemey และคณะ, 1990) แล้วทำการสกัดด้วยเมทานอล ผลการวิเคราะห์สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดด้วยเมทานอลด้วยเครื่องไฮเพอร์มานซ์ลิกวิดโครมาโตกราฟี พบลำดับส่วนในช่วงเวลา (RT) 18.5-22.5 นาที 23-24 นาที และ 29-32 นาที มีความสามารถในการกระจายน้ำมัน จึงเรียกว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ A, B และ C ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.21 (ก) เมื่อทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ค่า RT ต่างๆ ด้วยวิธีแมสเปคโตรเมตรีแสดงดังรูปที่ 4.22 พบว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ A มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ในรูปของ $[M+H]^+$ เท่ากับ 993, 1007, 1021, 1035, 1049 และ 1063 (รูปที่ 4.23) สารลดแรงดึงผิวชีวภาพ B มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ในรูปของ $[M+H]^+$ เท่ากับ 1463, 1477 และ 1505 (รูปที่ 4.24) โดยไม่พบค่ามวลต่อประจุที่ 1491 และสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ C มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) ในรูปของ $[M+H]^+$ เท่ากับ 994, 1008, 1022 และ 1036 (รูปที่ 4.25)

การวิเคราะห์หากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดพบว่า สารลดแรงดึงผิวชีวภาพ A มีส่วนประกอบของ ธรีโอนีน (Thr) ไทโรซีน (Tyr) กรดกลูตามิก (Glu) กรดแอสปาร์ติก (Asp) และเซรีน (Ser) ในอัตราส่วน 1:1:1:2:2 ตามลำดับ สารลดแรงดึงผิวชีวภาพ B มีส่วนประกอบของ ออร์นิติน (Om) ธรีโอนีน (Thr) อะลานีน (Ala) โพรลีน (Pro) ไอโซลิวซีน (Ile) ไทโรซีน (Tyr) และกรดกลูตามิก (Glu) ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1:2:3 ตามลำดับ สารลดแรงดึงผิวชีวภาพ C มีส่วนประกอบของ กรดกลูตามิก (Glu) กรดแอสปาร์ติก (Asp) วาลีน (Val) และลิวซีน (Leu) ในอัตราส่วน 1:1:1:4 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.9 โดยกลูตามีน (Gln) และแอสปาร์จिन (Asn) จะตรวจพบในรูปของกรดกลูตามิก (Glu) และกรดแอสปาร์ติก (Asp) ตามลำดับ เนื่องจากภาวะในการย่อยสลายจะทำให้เกิดการ deamination ของกรดอะมิโน 2 ชนิดนี้ (Yakimov และคณะ, 1995)

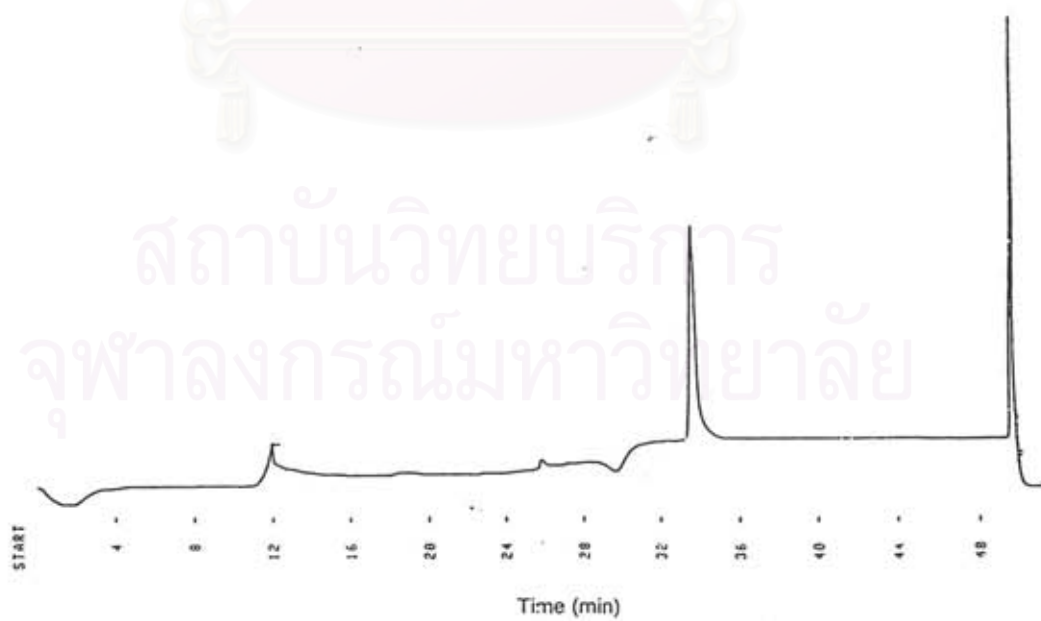
ตารางที่ 4.8 สมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

สารลดแรงตึงผิว ประเภทไลโปเพปไทด์	แบคทีเรีย	CMC (mg/l)	γ CMC (mN/m)	ความสามารถใน การลดแรงตึงผิวที่		ความ เสถียรต่อ อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	เอกสารอ้างอิง
				pH	โซเดียม คลอไรด์ (%)		
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BBK-1	<i>B. subtilis</i> BBK-1	12	32	5.0-10.0	0-15	50-121	งานวิจัยนี้
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ KP-2	<i>Bacillus</i> sp. KP-2	35	35	6.0-10.0	0-10	25-121	Roongsawang และคณะ (1999)
เซอร์แฟคติน	<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	25	27	6.0-12.0	ND	25-120	Arima และคณะ (1972)
เซอร์แฟคติน C9-BS	<i>B. subtilis</i> C9	40	28.5	5.0-9.5	0-6.0	20-100	Kim และคณะ (1997a)
ไลเคนนิซิน A	<i>B. licheniformis</i> BAS50	12	28	ND	0-10	ND	Yakimov และคณะ (1995)
ไลเคนนิซิน B	<i>B. licheniformis</i> JF-2	20	28	6.2-10.0	0-15	25-120	McInerney และคณะ (1985)
ไลเคนนิซิน C	<i>B. licheniformis</i> PG204	15	27	5.0-9.0	ND	20-60	Jenny และคณะ (1991)
เซอร์แฟคแตนท์ BL 86	<i>B. licheniformis</i> 86	10	27	4.0-13.0	0-30	25-120	Horowitz และคณะ (1990)
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ BS1	<i>B. licheniformis</i> BS1	67	34	5.0-10.0	ND	20-80	Babu และคณะ (1994)

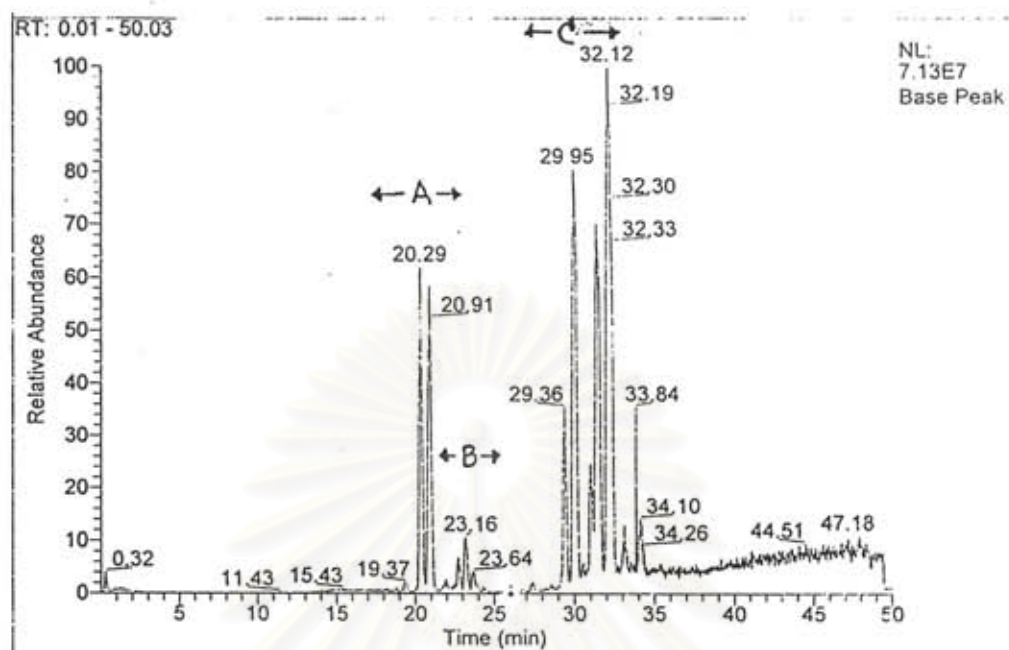
(ก)



(ข)



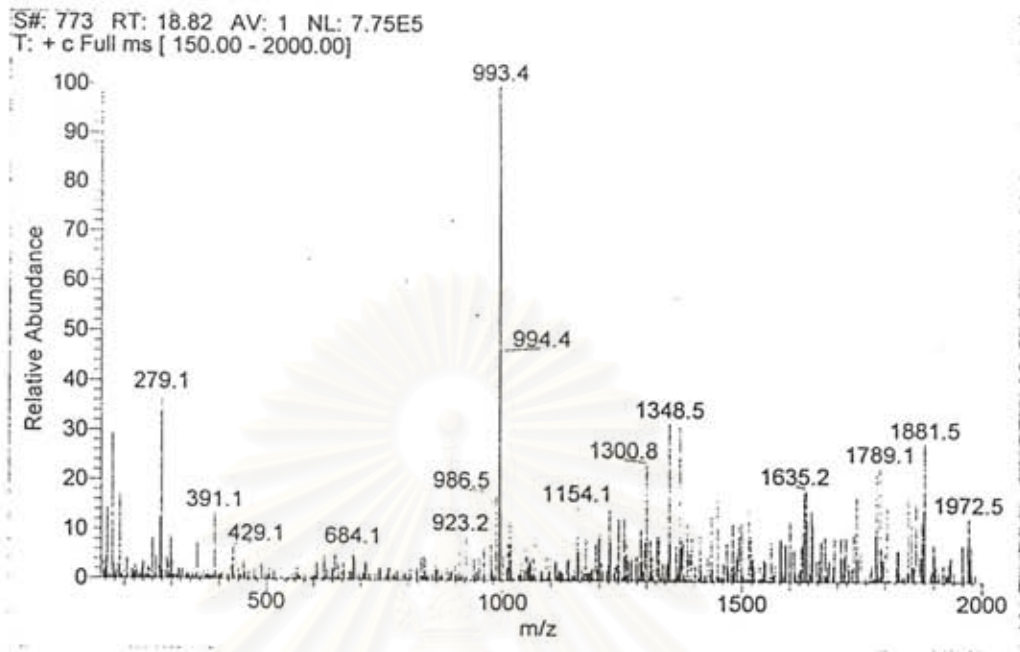
รูปที่ 4.21 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1
เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์มานซ์ลิวิดโครมาโตกราฟี (ก) Blank (ข)



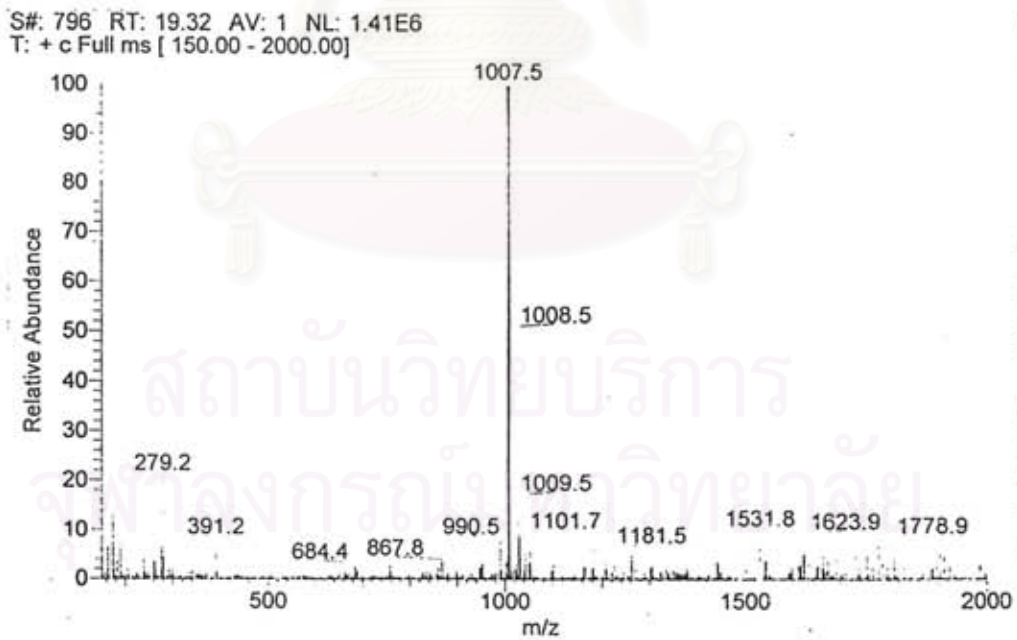
รูปที่ 4.22 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1
เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)

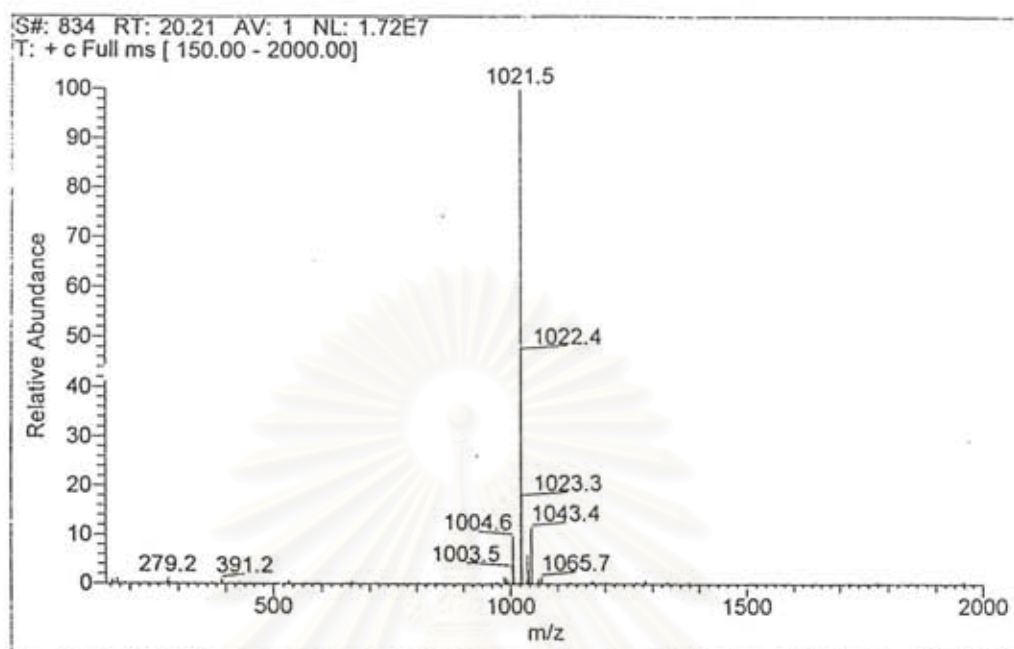


(ข)

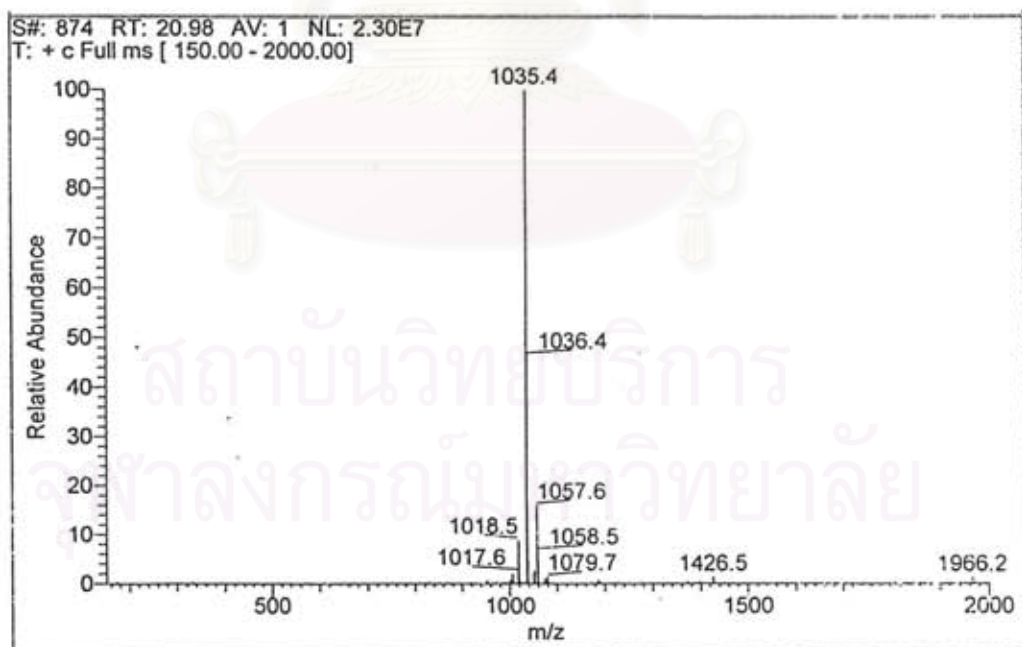


รูปที่ 4.23 Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ A ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 18.82 (ก) และ 19.32 (ข)

(ก)

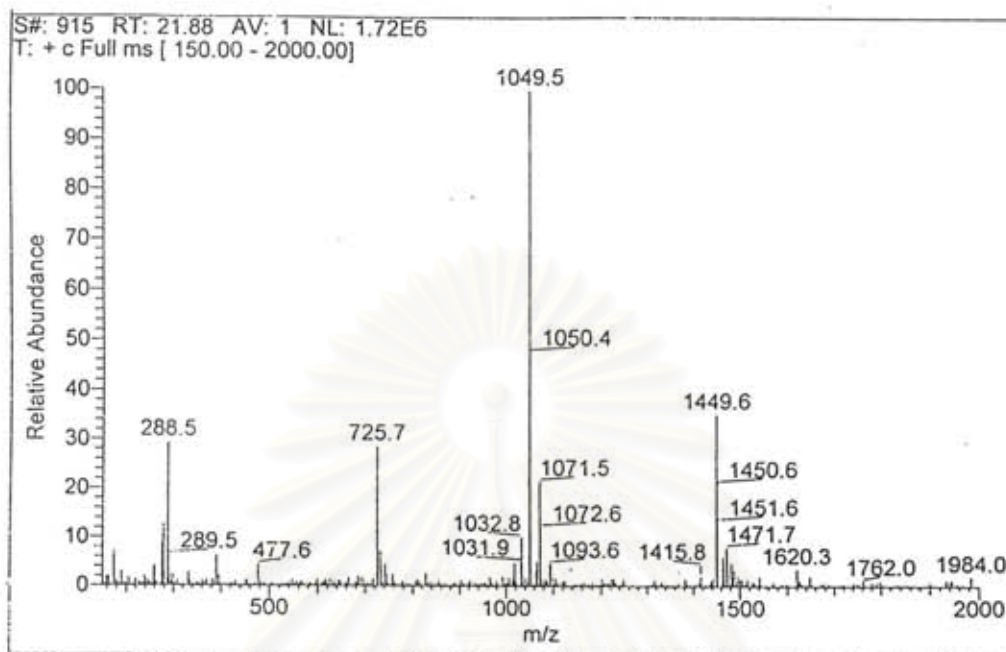


(ง)

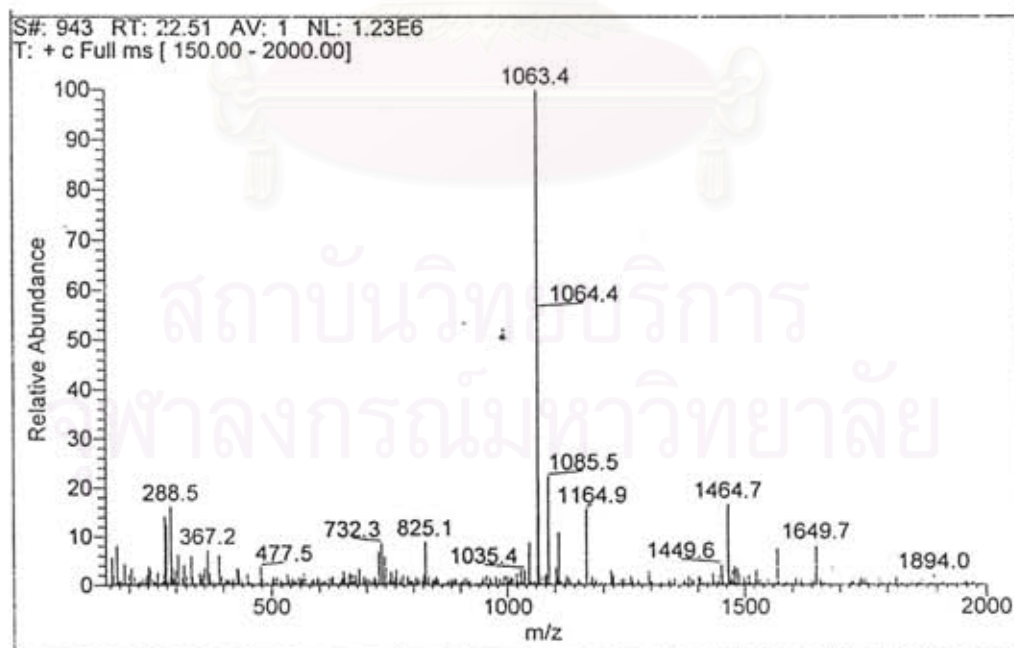


รูปที่ 4.23 Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ A ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 20.21 (ก) และ 20.98 (ง)

(จ)

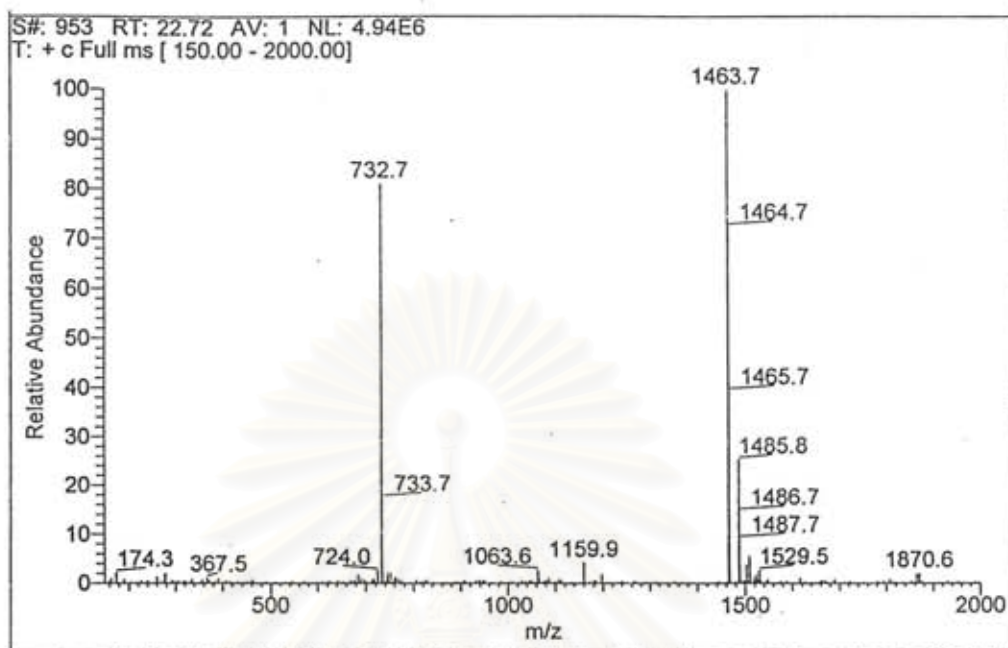


(ฉ)

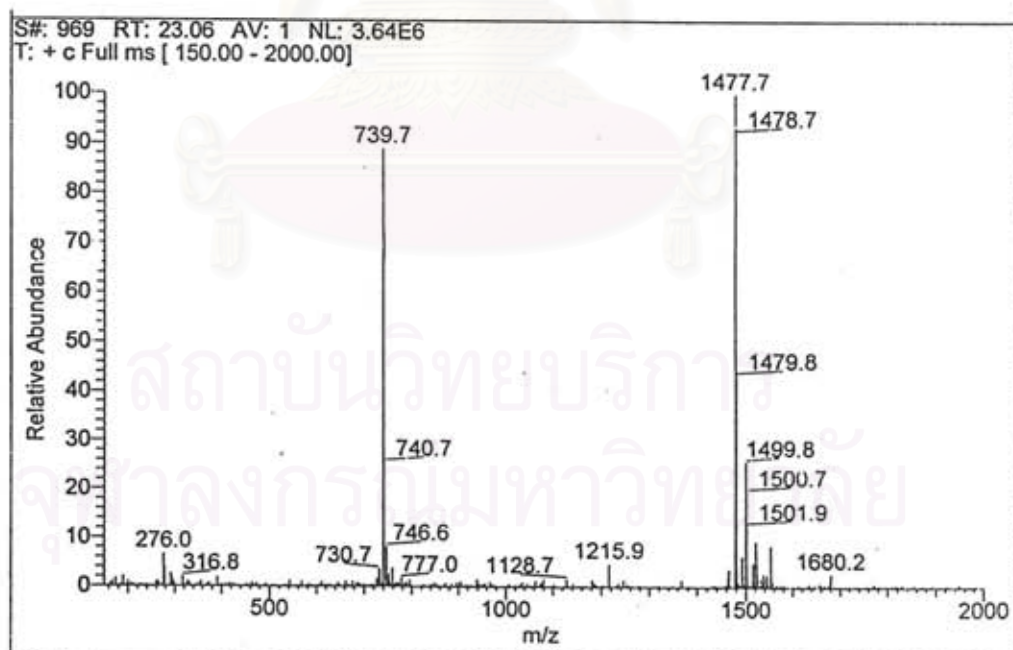


รูปที่ 4.23 Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ A ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 21.88 (จ) และ 22.51 (ฉ)

(ก)

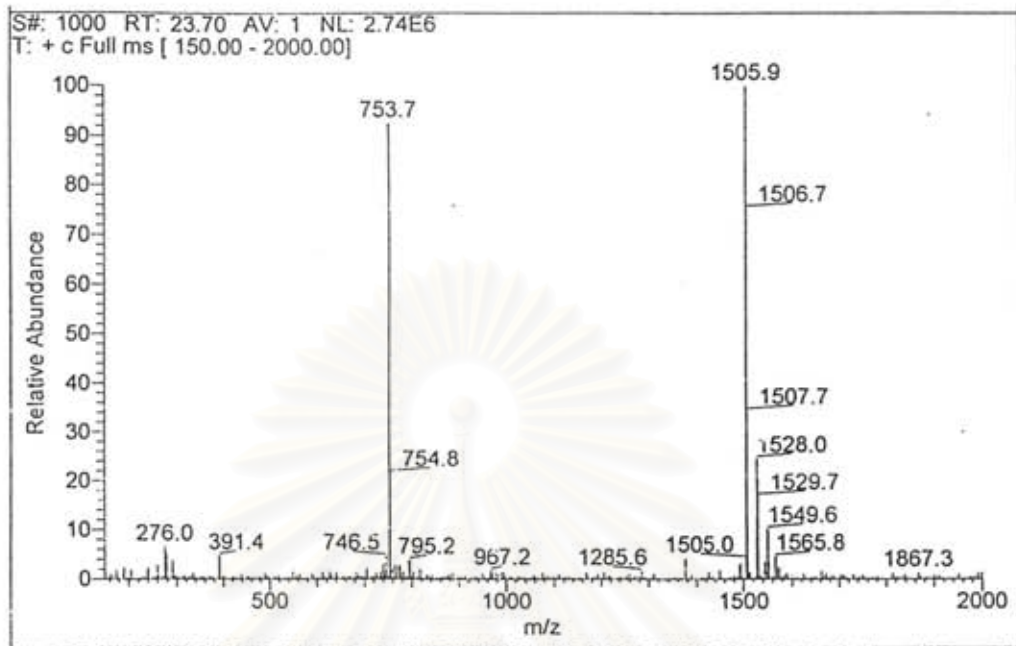


(ข)



รูปที่ 4.24 Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ B ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 22.72 (ก) และ 23.06 (ข)

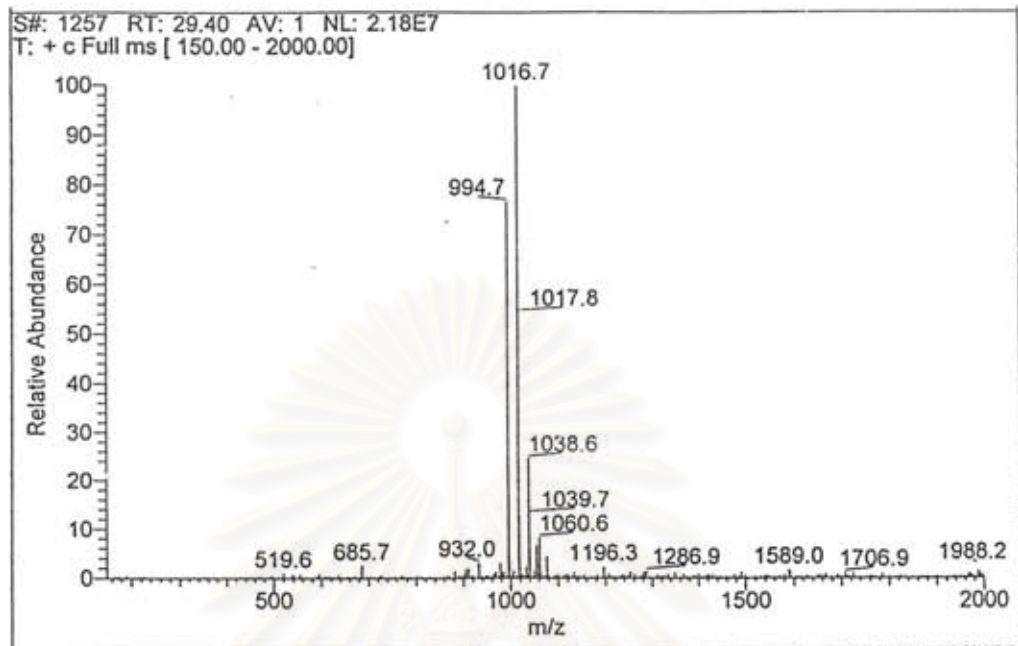
(ก)



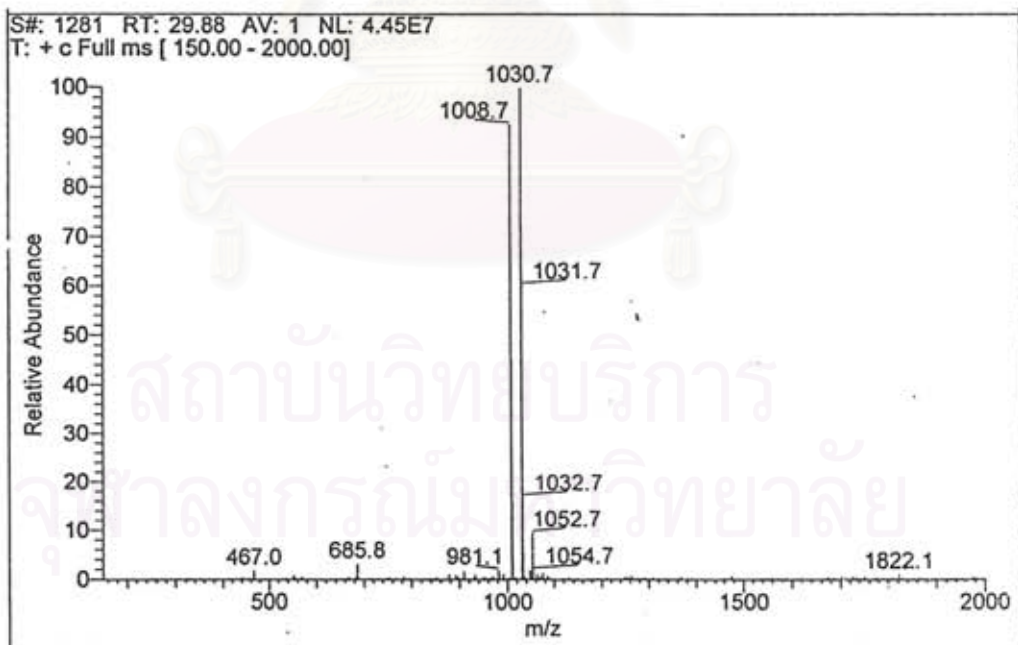
รูปที่ 4.24 Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ B ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 23.70 (ก)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)

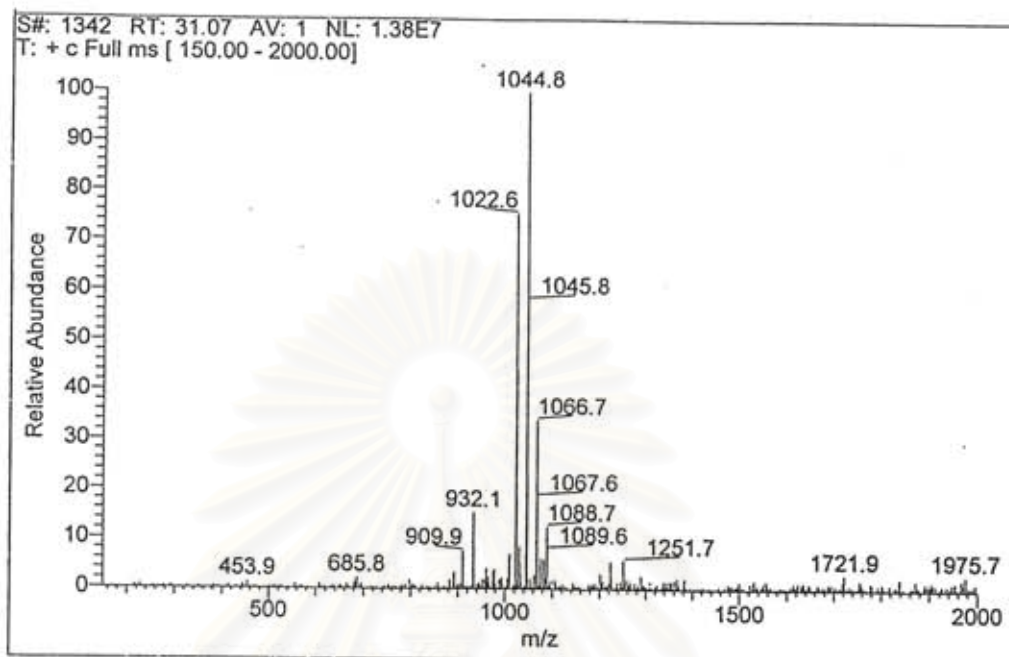


(ข)

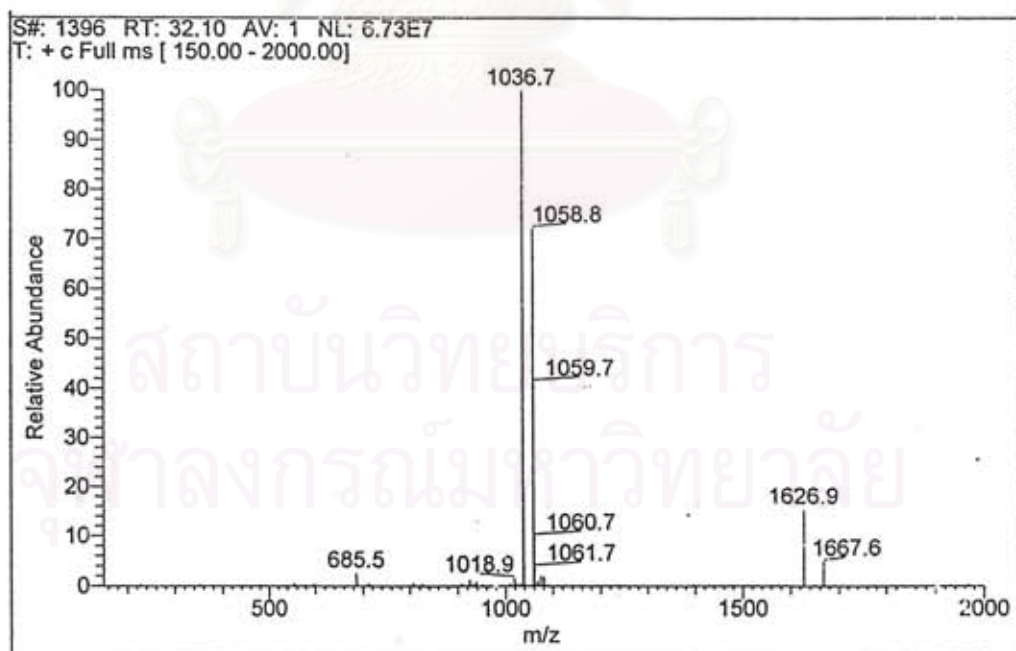


รูปที่ 4.25 Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ C ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 29.40 (ก) และ 29.88 (ข)

(ก)



(ง)



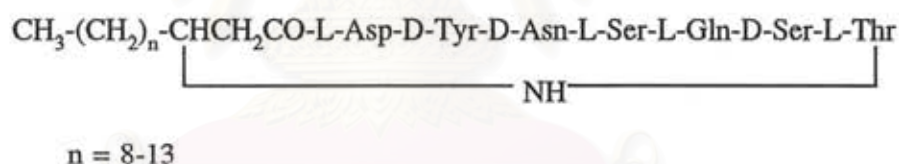
รูปที่ 4.25 Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ C ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 31.07 (ก) และ 32.10 (ง)

ตารางที่ 4.9 น้ำหนักโมเลกุลและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 กรดอะมิโนแสดงด้วยสัญลักษณ์แบบ 3 ตัวอักษร (ภาคผนวก ง)

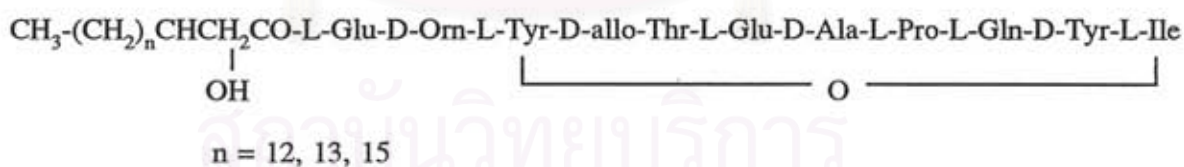
สารลดแรงดึงผิวชีวภาพ	ค่ามวลต่อประจุ		น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	กรดอะมิโน		
	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺		กรดอะมิโน	ปริมาณที่ตรวจพบ (nmol)	อัตราส่วน
A (เบซิลิลไมซิน L)	993	1015	992	Thr	0.400	1
	1007	1029	1006	Tyr	0.483	1
	1021	1043	1020	Glu	0.602	1
	1035	1057	1034	Asp	0.847	2
	1049	1071	1048	Ser	0.928	2
	1063	1085	1062			
B (ไพลพาสดาติน)	1463	1485	1462	Orn	0.247	1
	1477	1499	1476	Thr	0.160	1
	1505	1527	1504	Ala	0.123	1
				Pro	0.127	1
				Ile	0.159	1
				Tyr	0.337	2
				Glu	0.571	3
C (เซอร์แฟกติน)	994	1016	993	Glu	1.207	1
	1008	1030	1007	Asp	1.141	1
	1022	1044	1021	Val	1.198	1
	1036	1058	1035	Leu	4.596	4

จากผลการทดลองสรุปดังตารางที่ 4.9 เมื่อตรวจสอบสมบัติกับสารที่รู้จักพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ A, B และ C มีองค์ประกอบที่เหมือนกับเบซิลโลไมซิน L, ไพลาสตาติน กลุ่ม A และเซอร์แฟคตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* NCIB8872 (Peypoux และคณะ, 1986) ; *Bacillus cereus* BMG 302-fF67 (Nishikiori และคณะ, 1986) และ *Bacillus subtilis* ATCC21332 (Kakinuma และคณะ, 1969a,b,c,d) ตามลำดับ ความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดในช่วง 14 คาลตัน เนื่องจากความแตกต่างของจำนวนหมู่เมธิลีนที่เป็นองค์ประกอบของส่วนลิปิด ซึ่งเป็นลักษณะที่พบโดยทั่วไปในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ ตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis* ATCC 21332 ผลิตสารผสมของเซอร์แฟคตินที่มีส่วนของลิปิดแตกต่างกัน 5 ชนิด ที่มีคาร์บอนจำนวน 13, 14 และ 15 อะตอม มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1007, 1021 และ 1035 คาลตันตามลำดับ (Kakinuma และคณะ, 1969 a,b,c,d ; Fiechter, 1992) ดังนั้นอาจสันนิษฐานได้ว่าส่วนลิปิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ A, B และ C ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 12-17, 16-19 และ 12-15 อะตอมตามลำดับ โครงสร้างตามความคาดหมายแสดงรูปที่ 4. 26

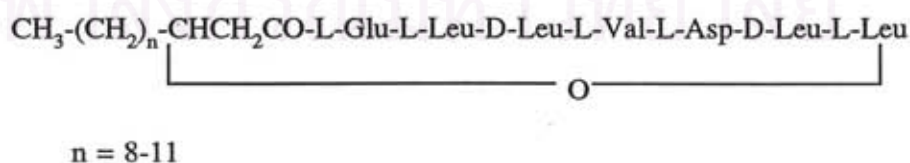
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 4.26 โครงสร้างตามความคาดหมายของเบซิลโลไมซิน L (ก), ไพลาสตาติน (ข) และ เซอร์แฟคติน (ค) ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 อ้างอิงจาก Peypoux และคณะ (1986) ; Nishikiori และคณะ (1986) ; Kakinuma และคณะ (1969a,b,c,d)

Bacillus subtilis BBK-1 นับว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แรกที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ได้ 3 ชนิด แตกต่างจาก *Bacillus subtilis* RB14 ซึ่งมีรายงานว่าผลิตอิทูลิน A และเซอร์แฟคติน (Huang และคณะ, 1993) ในขณะที่ *Bacillus subtilis* YB8 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตโฟลพาสตาติน B1 และเซอร์แฟคติน (Tsuge และคณะ, 1996) จึงน่าสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับจีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 ชนิดว่าเป็นจีนเดียวกันหรือไม่ โดยเลือกที่จะศึกษาจีนที่มีหน้าที่เหมือนกับจีน *sfp* ของ *Bacillus subtilis* OKB105 (Nakano และคณะ, 1992) กล่าวคือสามารถชักนำให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน *Bacillus subtilis* MI113 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากความบกพร่องในส่วนของจีน *sfp* (sfp^0)

4.9 การโคลนจีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.9.1 การโคลนจีน sfp^0 จาก *Bacillus subtilis* MI113 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจจับ

ผลการโคลนจีน sfp^0 บางส่วนจาก *Bacillus subtilis* MI113 ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อด้านซ้ายมือและด้านขวามือของ open reading frame ของจีน *sfp* จาก *Bacillus subtilis* OKB105 จีน sfp^0 ที่โคลนได้มีขนาด 642 เบส แสดงดังรูปที่ 4.27 ซึ่งมีความเหมือนกับจีน *sfp* จาก *Bacillus subtilis* OKB105 98 % เมื่อทำการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม BLAST

4.9.2 การโคลนจีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1

ผลการทดลองพบว่าโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *Bacillus subtilis* BBK-1 ที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ซึ่งมีขนาด 4 กิโลเบส สามารถเกิดการไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอตรวจจับ sfp^0 ได้ เมื่อทำการโคลนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pUC19 และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมที่ต้องการด้วยวิธี colony hybridization พบทรานสฟอร์มแมนท์ 1 โคลนีนีในจำนวนทั้งหมด 300 โคลนีนี ซึ่งดีเอ็นเอลูกผสมประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4 กิโลเบสที่สามารถเกิดการไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอตรวจจับ sfp^0 ได้ เมื่อทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pTB523 และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Bacillus subtilis* MI113 พบว่า *Bacillus subtilis* MI113 ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมที่เรียกว่า pTB523-4kb แสดงบริเวณไฮบริดโคโลนีนีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่รดทับด้วยน้ำมันดิบ และส่วนไฮบริดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีความสามารถในการกระจายน้ำมัน แสดงว่า *Bacillus subtilis* MI113 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เมื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตรงตำแหน่งเอนไซม์ตัดเจาะ *SacI* พบว่ามีผลทำให้เชื้อดังกล่าวไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการทดลองของ Morikawa และคณะ (1992) ; Huang

และคณะ (1993) ; Tsuge และคณะ (1996) พบว่า *Bacillus subtilis* MI113 ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมของจีน *psf-1* (จีนที่ควบคุมการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus pumilus* A1), *lpa-14* (จีนที่ควบคุมการผลิตอิทูลิน A และเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* RB14) และ *lpa-8* (จีนที่ควบคุมการผลิตไฟลพาสตาติน B1 และเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* YB8) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เพียงชนิดเดียวคือเซอร์แฟคติน แนะนำให้เห็นว่า *Bacillus subtilis* MI113 ไม่มี operon สำหรับการผลิตอิทูลิน A และไฟลพาสตาติน ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* MI113 ที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมของจีน *sfp-B* น่าจะเป็นเซอร์แฟคตินเท่านั้น

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาด 4 กิโลเบสบริเวณตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และนำมาแปลเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่าประกอบด้วย open reading frame ซึ่งมีขนาด 672 เบส แปลรหัสให้กรดอะมิโน 224 ตัวโดยมีรหัสเริ่ม ATG อยู่ที่ตำแหน่ง 723 รหัสหยุด TAA อยู่ที่ตำแหน่ง 1395 และบริเวณที่คาดว่าเป็นตำแหน่งของ ribosome binding site ที่ 708 ถึง 717 แสดงคังรูปที่ 4.28 เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโนที่แปลรหัสจาก open reading frame นี้ โดยจะเรียกว่า โปรตีน SFP-B กับโปรตีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าโปรตีน SFP-B มีความเหมือนกับโปรตีน LPA-14 ที่ควบคุมการผลิตอิทูลิน A และเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* RB14 98 % (Huang และคณะ, 1993) เหมือนกับโปรตีน LPA-8 ที่ควบคุมการผลิตไฟลพาสตาติน B1 และเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* YB8 66 % (Tsuge และคณะ, 1996) และเหมือนกับโปรตีน SFP ที่ควบคุมการผลิตที่เซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* OKB105 66 % (Nakano และคณะ, 1992) กรดอะมิโนของโปรตีน SFP-B ต่างจากโปรตีน LPA-14 เพียง 4 ตัว กล่าวคือ อะลานีน-22, ไกลซีน-65, ไกลซีน-69 และกรดกลูตามิก-216 ของโปรตีน LPA-14 จะเปลี่ยนเป็นธรีโอนีน, อะลานีน, เซรีน และอะลานีนตามลำดับในโปรตีน SFP-B แสดงคังรูปที่ 4.29

โปรตีน SFP-B มีความเหมือนกับโปรตีน SFP ที่ควบคุมการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* OKB105 66 % (Nakano และคณะ, 1992) โปรตีน SFP หรือเอนไซม์ phosphopantetheinyltransferase มีหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายหมู่ phosphopantethein จาก Coenzyme A ไปสู่เซรีนแต่ละตัวของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์สายเพพไทด์ของเซอร์แฟคติน (Quadri และคณะ, 1998) ดังนั้นอาจสันนิษฐานได้ว่าโปรตีน SFP-B น่าจะมีหน้าที่ที่เหมือนกับโปรตีน SFP ในการเคลื่อนย้ายหมู่ phosphopantethein ไปสู่เซรีนแต่ละตัวของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์สายเพพไทด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน *Bacillus subtilis* BBK-1 อย่างน้อยที่สุดคือเซอร์แฟคติน

```

10      20      30      40      50      60
CTAGAATTCA GATTTACGGA ATTTATATGG ACCGCCCGCT TTCACAGGAA GAAAATGAAC

70      80      90      100     110     120
GGTTCATGTC TTTTCATATCA CCTGAAAAAC GGGAGAAATG CCGGAGATTT TATCATAAAG

130     140     150     160     170     180
AAGATGCTCA CCGCACCTG CTGGGAGATG TGCTCGTTCT CTCAGTCATA AGCAGGCAGT

190     200     210     220     230     240
ATCAGTTGGA CAAATCCGAT ATCCGCTTTA GCACGCAGGA ATACGGGAAG CCGTGCATCC

250     260     270     280     290     300
CTGATCTTCC CGACGCTCAT TTCAACATTT CTCACTCCGG ACGCTGGGTC ATTTGCGCGT

310     320     330     340     350     360
TTGATTCACA GCCGATCGGC ATAGATATCG AAAAAACGAA ACCGATCAGC CTTGAGATCG

370     380     390     400     410     420
CCAAGCGCTT CTTTTCAAAA ACAGAGTACA GCGACCTTTT AGCAAAAGAC AAGGACGAGC

430     440     450     460     470     480
AGACAGACTA TTTTATCAT CTATGGTCAA TGAAAGAAAAG CTTTATCAAA CAAGGAAGGC

490     500     510     520     530     540
AAAGGCTTAT CGCTTCCGCT TGATTCCTTT CTAGTGCGCC TGCACCAGGA CGGACAAGTA

550     560     570     580     590     600
TCCATTGAGC TTCCGGACAG CCATTCCCCA TGCTATATCA AAACGTATGA GGTTCGATCCC

610     620     630     640     650     660
GGCTACAAAA TGGCTGTATG CGCCGCACAC CCTGAATTCC CC.....

```

รูปที่ 4.27 ลำดับเบสของจีน *sfp*⁰ ที่โคลนจาก *Bacillus subtilis* MI113

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<i>EcoRI</i>	
GAATTC	92
93 CAGCCCTTGGGATGCCTTTTCATTATGGGCTTTTTTCAGCATTTCGGGCTATCTGTGCGGCAATGGTCCATCTTGGTCGGCGCGGTCAATCGT	182
183 GGCTTTAACCTGCCTGTYCACGAGGACACTCCCGAAAAATCAGGCGCTATCTTAAACATGGTGTGATGGGAATGTTTATTGATTTCCTCT	272
273 CGTTTCTGCTTTCCTGAGGCGCACGCTTTTTCTTAGCGGGCGGTGTTTTTTCTATCGGATTGCTGCTGATCGGCTGCGGGCGTGGTATTT	362
363 ACGTATCGGCTGGGCTCGGCGCGGGCCCCGGGACTCTCTGATGATGCTGATATCTGAAAAAACGGGCTTGGAACGTGCAATGGGTGCGG	452
453 AACGGCATTGAGCTGACGATTCTTGCCGACGCTGGGTGATGGGCGGACCGATCGGCGCCGGAACCATTATTACGGCTGTTTTGACGGGG	542
543 CTTGATTCTGCGTTTTTCTTTGCCGAGTCTCTAAACTGTTAACATACCGGATCTCCGGGCGGCAACGTCCTGTCATTAATAAAACAAG	632
633 CCGAAACGGTTTTGTTTTTTTTTTTCGGACAGCTTTCGTTTGATATGATAGGATGGTTTTGACAATATTTTCAGACGGAGGATCTGGAC	722
723 ATGAAGATTACGGAGTATATATGGACCGCCGCTTTCTGCAGGGGAAGAGGAYCGGATGATGACGGCCGTGTCGGCTGAAAAAGCGGGAA	812
1 M K I Y G V Y M D R P L S A G E E D R M M T A V S A E K R E	30
813 AAATGCCGGCGCTTTTACCATAAGGAGGATGCTCACCGCACCTTGATCGGCGACATGCTGATCCGACCCGCTGCGGGCAAAGCTTACGGA	902
30 K C R R F Y H K E D A H R T L I G D M L I R T A A A K A Y G	60
903 CTTGATCCGGCCGCGATTTTCATTACGCTCCAGGAATACGGAAGCCGTACATCCCGCGCTTCCGGACATGCACCTTAATATTTCCAC	992
60 L D P A A I S F S V Q E Y G K P Y I P A L P D M H F N I S H	90
993 TCCGGGCGCTGGATCGTGTGTGCCGTTGATTCAAAACCGATCGGCATTGATATTGAAAAATGAAGCCCGCACGATTGATATCGCCAAA	1082
90 S G R W I V C A V D S K P I G I D I E K M K P G T I D I A K	120
1083 CGTTTTTTTCGCGCAGGAATACAGTATGCTGCAAGCGAAACACCCCGATCAGCAGACCGATTATTTTACCACCTGTGGTCGATGAAA	1172
120 R F F S P T E Y S D L Q A K H P D Q Q T D Y F Y H L W S H K	150
1173 GAAAGCTTTTCAAGCAGGCGGAAAAAGGGCTTCCCTGCCGCTTGATTTCATTACGCGTCCGCCCTCAAAGACGACGGCCATGTGTCCATT	1262
150 E S F I K Q A G K G L S L P L D S F S V R L K D D G H V S I	180
<i>SacI</i>	
1263 GAGCTCCGGACGGACATGAACCATGTTTCATCCGCACATATGATGCGGACGAGGAATATAAGCTGGCCGTTTTGTGCGCGCATCCCGAT	1352
180 E L P D G H E P C F I R T Y D A D E E Y K L A V C A A H P D	210
1353 TTTTGTGACGGGATTGCGATGAAAAAGTATGAAGAGCTGCTGTAAGCATAGAAAAAGGAGGGTCTCCCCCTCCTTTTTGTGACGCTTGAT	1442
210 F C D G I A M K T Y E E L L *	225
1443 ATTTCCGCCTGTTTCTGCAGCTGCTTTTGCTTCTTGATAAAATTTCTTGAACAGATCCGCGATGTGTTCTTCAACACATGAAAAATGCG	1532
1533 ATTCGCAAAATCGGTTTCATTAATGGATATCGTCCCGATTCCCTCTCTTTTCAAGCAACGACACTCTCAATTCGCGGGCGTTTATGCTTTTC	1622
1623 AGCCGGACACACATGAAATAACCCGAGTTAAACGGATAAGGTGTCATACGCTTCTCATAGTGTGTTTTTCTGCAAGAACGGC	1705

รูปที่ 4.28 ลำดับเบสและลำดับของกรดอะมิโนของจีนขนาด 4 กิโลเบส บริเวณตำแหน่งของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* ที่โคลนจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 กรดอะมิโนแสดงด้วย สัญลักษณ์แบบ 1 ตัวอักษร (ภาคผนวก ง)

SFP-B	10	20	30	40	50	
LPA-14	1 MKIYGVYMDR	PLSAGEEDRM	MTAVSAEKRE	KCRRFYHKED	AHRTLIGDML	50
LPA-8	1 MKIYGVYMDR	PLSAGEEDRM	MAAVSAEKRE	KCRRFYHKED	AHRTLIGDML	50
SFP	1 MKIYGIYMDR	PLSQEENERF	MSFISPEKRE	KCRRFYHKED	AHRTLLGDVL	50
	60	70	80	90	100	
	51 IRTAAAKAYG	LDPAAISFSV	QEYGKPYIPA	LPDMHFNISH	SGRWIVCAVD	100
	51 IRTAAAKAYG	LDPAGISFGV	QEYGKPYIPA	LPDMHFNISH	SGRWIVCAVD	100
	51 VRSVISRQYQ	LDKSDIRFST	QEYGKPCIPD	LPDAHFNISH	SGRWICAFD	100
	51 VRSVISRQYQ	LDKSDIRFST	QEYGKPCIPD	LPDAHFNISH	SGRWIGAFD	100
	110	120	130	140	150	
	101 SKPIGIDIEK	MKPGTIDIAK	RFFSPTEYSD	LQAKHPDQQT	DYFYHLWSMK	150
	101 SKPIGIDIEK	MKPGTIDIAK	RFFSPTEYSD	LQAKHPDQQT	DYFYHLWSMK	150
	101 SQPIGIDIEK	TKPISLEIAK	RFFSKTEYSD	LLAKDXDEQT	DYFYHLWSMK	150
	101 SQPIGIDIEK	TKPISLEIAK	RFFSKTEYSD	LLAKDXDEQT	DYFYHLWSMK	150
	160	170	180	190	200	
	151 ESFIKQAGKG	LSLPLDSFSV	RLKDDGHVSI	ELPDGHEPCF	IRTYDADEEY	200
	151 ESFIKQAGKG	LSLPLDSFSV	RLKDDGHVSI	ELPDGHEPCF	IRTYDADEEY	200
	151 ESFIKQEGKG	LSLPLDSFSV	RLHQDQGVSI	ELPDSHSPCY	IKTYEVDPGY	200
	151 ESFIKQEGKG	LSLPLDSFSV	RLHQDQGVSI	ELPDSHSPCY	IKTYEVDPGY	200
	210	220	230	240	250	
	201 KLAVCAHPD	FCDGIEMKTY	EELL.....	250
	201 KLAVCAHPD	FCDGIEMKTY	EELL.....	250
	201 KMAVCAHPD	FPEDITWVSY	EELL.....	250
	201 KMAVCAHPD	FPEDITWVSY	EELL.....	250

รูปที่ 4.29 ความเหมือนของโปรตีน SFP-B กับโปรตีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ; โปรตีน LPA-14 ควบคุมการผลิตอิทูลิน A และเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* RB14 ; โปรตีน LPA-8 ควบคุมการผลิตไพลพาสตาติน B1 และเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* YB8 ; โปรตีน SFP ควบคุมการผลิตเซอร์แฟคตินจาก *Bacillus subtilis* OKB105 กรดอะมิโนแสดงด้วยสัญลักษณ์แบบ I ตัวอักษร (ภาคผนวก ง)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถแยกแบคทีเรียที่เรียกเต็มที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารแข็งได้จำนวน 23 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้พบแบคทีเรียที่เรียกเต็มจำนวน 9 สายพันธุ์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในอาหารเหลว โดยแบคทีเรียที่เรียกเต็มสายพันธุ์ BBK-1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
2. เมื่อจำแนกสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ BBK-1 ทางอนุกรมวิธานตามเกณฑ์การจัดจำแนกแบคทีเรียใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology และวิเคราะห์ลำดับเบสของจีนที่สังเคราะห์ 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* โดยมีความเหมือนกับ *Bacillus subtilis* ATCC 21331 สูงสุด
3. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเข้าสู่การเจริญแบบลอกการิซึม และจะมีการสร้างมากขึ้นเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะกลางของลอกการิซึม แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตนี้เป็นสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิซึ่งผลิตพร้อมกับการเจริญ
4. สูตรอาหารและปัจจัยบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ประกอบด้วยซูโครส 5 กรัมต่อลิตร, แอมโมเนียในเตรท 2 กรัมต่อลิตร, สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่า CMC⁻¹ เท่ากับ 40 นับว่าอยู่ในระดับที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ
5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* BBK-1 มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15 % และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5-10 นอกจากนี้ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงในช่วง 50-100 °ซ เป็นเวลา 5 ชม. และที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 30 นาที สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่า CMC เท่ากับ 12 mg/l ซึ่งต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์หลายชนิด ได้แก่ Sodium dodecyl sulfate, Cetylpyridinium chloride, Tween 80 และ Triton X-100 ขณะเดียวกันมีประสิทธิภาพในการกระจายน้ำมันได้ดีเท่ากับเซอร์แฟคตินและ Tween 80 โดยดีกว่า Sodium dodecyl sulfate และ Cetylpyridinium chloride นับได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 มีสมบัติที่ดีในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม และมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์หลายชนิด

6. *Bacillus subtilis* BBK-1 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์แรกที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์ได้ 3 ชนิด มีองค์ประกอบที่เหมือนกับเบซิลโลไมซิน L, ไพลพาสตาติน และเซอร์แฟคติน

7. จีนที่คาดว่าเป็นจีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 มีขนาด 672 เบส แพลรหัสให้กรดอะมิโน 224 ตัว มีความเหมือนกับโปรตีน LPA-14, LPA-8 และ SFP ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปเพปไทด์จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 3 ชนิด ดังนั้นควรแยกวิเคราะห์ปริมาณสารแต่ละชนิดที่ผลิตขึ้นในแต่ละภาวะของการเลี้ยงเชื้อ เช่นการวิเคราะห์ด้วยวิธีไฮเพอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีแบบ reversed phase โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดที่แบคทีเรียผลิตขึ้นเป็นสารมาตรฐาน

2. จากการวิเคราะห์หน้าหน้าโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 ชนิด พบว่าไพลพาสตาตินแสดงค่ามวลต่อประจุในรูปของ $[M + 2H^+]$ เท่ากับ 732, 739 และ 753 อย่างชัดเจน แสดงว่าไพลพาสตาตินเกิดการ protonate ได้ง่ายกว่าเบซิลโลไมซิน L, และเซอร์แฟคติน แนะนำว่าค่า pI ของไพลพาสตาตินแตกต่างจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอีก 2 ชนิด จึงอาจเพิ่มเปอร์เซ็นต์การสกัดไพลพาสตาตินออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และแยกออกจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอีก 2 ชนิดได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการตกตะกอน

3. การที่จะยืนยันว่าจีน *sfp-B* ควบคุมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 ชนิดใน *Bacillus subtilis* BBK-1 หรือไม่ อาจต้องทำการทดลองเกี่ยวกับ gene disruption ของจีน *sfp-B* ในสายพันธุ์ดังกล่าวด้วยจีน *sfp-B* หรือจีน *sfp-B* ที่เกิดการกลายพันธุ์ที่โคลนได้ แล้วดูผลต่อการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ชนขวัญ นุชบัน. 2539. การลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ที่เลี้ยงในภาวะต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บงกช สุทธิวานิชกุล. 2540. การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรสำหรับการผลิตไบโอดีเซลจาก *Bacillus licheniformis* F2.2. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิมลพรรณ พิทยานุกุล. 2533. หลักการตั้งตำหรับยาเตรียมและเครื่องสำอาง. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร : หจก. เฟม โปรดักชั่น พิมพ์ครั้งที่ 1. 217 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

- Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*: J. Bacteriol. 81 : 741-746.
- Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura, G. 1968. Surfactin , AcrySTALLINE peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* : isolation ; characterization and its inhibition of fibrin clot formation . Biochem. Biophys. Res. Comm. 31: 488- 494.
- Arima, K., Tamura, G. and Kakinuma, A. 1972. Surfactin. U.S. Patent No. 3,687,926.
- Arino, S., Marchal, R. and Vandecasteele, J.P. 1996. Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 : 162 -168.
- Babu, P.S., Deshpande, M., Juwarkar, A. and Khanna, P. 1994. Characterization and properties of the microbial biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain BS1. Australasian Biotechnol. 4 : 302-305.
- Banat, I.M. 1993. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* Biotechnol. Lett. 15 : 591-594.
- Banat, I.M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation : a review. Bioresource Technol. 51: 1-12.
- Baumgart, F., Kluge, B., Ullrich, C., Vater, J. and Ziessow D. 1991. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. Biochem. Biophys. Res. Comm. 177 : 998 - 1005.

- Borchert, S., Stachelhaus, T. and Marahiel, M.A. 1994. Induction of surfactin production in *Bacillus subtilis* by *gsp*, a gene located upstream of the gramicidin S operon of *Bacillus brevis*. J. Bacteriol. 176 : 2458-2462.
- Bortolato, M., Besson, F. and Roux, B. 1997. Inhibition of alkaline phosphatase by surfactin, a natural chelating lipopeptide from *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Lett. 19 : 433 - 435.
- Burd, G. and Ward, O.P. 1996a. Physicochemical properties of PM-factor, a surface-active agent produced by *Pseudomonas marginalis*. Can. J. Microbiol. 42 : 243-251.
- Burd, G. and Ward, O.P. 1996b. Involvement of a surface -active high molecular weight factor in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas marginalis*. Can. J. Microbiol. 42 : 791-797.
- Burd, G. and Ward, O.P. 1997. Energy-dependent accumulation of particulate biosurfactant by *Pseudomonas marginalis*. Can. J. Microbiol. 43 : 391-394.
- Busscher, H.J., Chris, G., Hoogmoed, V., Gesinda I., Doornbusch, G., Kuiji-Booij, M. and Mei, H.C. 1997. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 3810-3817.
- Cameotra, S.S. and Makkar, R. S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50 : 520-529.
- Carreru, P., Cosmina, P. and Grandi, G. 1993. Mutant of *Bacillus subtilis*. U.S. Patent No. 5,264,363.
- Carrillo, P.G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S.I. and Giulietti, A.M. 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 12 : 82-84.
- Clint, J.H. 1992. Micelle formation. Surfactant aggregation, pp. 82 - 129. New York : Chapman and Hall.
- Cooper, D.G. and Zajic, J. E. 1980. Surface-active compounds from microorganism. Adv. Appl. Microbiol. 26 : 229-256.
- Cooper, D.G., Macdonald, R., Duff, S.J.B. and Kosaric N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. Appl. Environ. Microbiol. 42 : 408-412.

- Cooper, D.G. 1986. Biosurfactants. Microbiol. Sci. 3 : 145 - 149.
- Cosby, W. M., Vollenbroich, D., Lee, O. H. and Zuber, P. 1998. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the spoOK oligopeptide permease and the comQX system of extracellular control. J.Bacteriol. 180 : 1438-1445.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., Ferra, F. de, Grandi, G., Perego, M., Venema, G. and Sinderen, D. van 1993. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 8 : 821-831.
- Deshpande, M. and Daniels, L. 1995. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. Bioresource Technol. 54 : 143 - 150.
- Desai, J.D. and Desai, A.J. 1993. Production of biosurfactants. In N. Kosaric (ed.), Biosurfactant : production , property , application, pp. 65-98. New York : Marcel Dekker.
- Desai, A.J., Patel, R.M. and Desai, J.D. 1994. Advances in the production of biosurfactant and their commercial applications. J.Sci.Ind.Res. 53 : 619 - 629.
- Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol.Biol.Rev. 61 : 47-64.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactant : moving towards industrial application. Trends Biotechnol. 10 : 208-217.
- Fiedler, H.P. and Umbach, W. 1987. Cosmetics and toiletries. In J. Falbe (ed.), Surfactants in consumer products : theory , technology and application , pp. 350-398. New York : Springer-Verlag Heidelberg.
- Gerson, D.F. 1993. The biophysics of microbial surfactants : growth on insoluble substrates. In N. Kosaric (ed.), Biosurfactants : production , properties , applications, pp. 169 - 286. New York : Marcel Dekker.
- Gilmour, D. 1990. Halotolerant and halophilic microorganisms. Microbiology of extreme environments , pp : 147-177. New York : McGraw-Hill Publishing Company.
- Gorkovenko, A., Zhang, J., Gross, R.A., Allen, A.L. and Kaplan, D.L. 1997. Bioengineering of emulsifier structure : emulsan analogs. Can. J. Microbiol. 43 : 384-390.

- Guerra-Santos, L., Kappell, O. and Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Environ. Microbiol. 48 : 301 - 305.
- Guerra-Santos, L.H., Kappell, O. and Fiechter, A. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 : 443 - 448.
- Gurjar, M., Khire, J.M. and Khan, M.I. 1995. Bioemulsifier production by *Bacillus stearothermophilus* VR-8 isolate. Lett. Appl. Microbiol. 21 : 83-86.
- Hiraoka, H., Ano, T. and Shoda, M. 1992. Molecular cloning of a gene responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. J. Ferment. Bioeng. 74 : 323-326.
- Hommel, R., Stiwer, O., Stuber, W., Haferburg, D. and Kleber, H.P. 1987. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26 : 199 - 205.
- Horowitz, S., Gilbert, J.N. and Griffin, W.M. 1990. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. J. Indus. Microbiol. 6 : 243-248
- Horowitz, S. and Griffin, W.M. 1991. Structural analysis of *Bacillus licheniformis* 86 surfactant. J. Indus. Microbiol. 7 : 45-52.
- Huang, C.C., Ano, T. and Shoda, M. 1993. Nucleotide sequence and characteristics of gene, *lpa-14*, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14. J. Ferment. Bioeng. 76 : 445 - 450.
- Imanaka, T., Shoji, S. and Shizuoka, S. 1994. Biosurfactant cyclopeptide compound produced by culturing a specific *Arthrobacter* microorganism. U.S. Patent No. 5,344,913.
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F. and Suzuki, T. 1971. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions). J. Antibiot. 24 : 855-859.
- Javaheri, M., Jenneman, G., McInerney, M. J. and Knapp, R.M. 1985. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. Appl. Environ. Microbiol. 50 : 698 - 700.

- Jenny, K., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1991. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis* : structural analysis and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 5-13.
- Jenny, K., Deltrieu, V. and Kappeli, O. 1993. Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. In N. Kosaric (ed.), Biosurfactants : production , properties , applications, pp. 135-156. New York : Marcel Dekker.
- Kakinuma, A., Hori, M., Isono, M., Tamura, G. and Arima, K. 1969a. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. Agric. Biol. Chem. 33 : 971- 972.
- Kakinuma, A., Sugino, H., Isono, M., Tamura, G. and Arima, K. 1969b. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin . Agric. Biol. Chem. 33 : 973- 976.
- Kakinuma, A., Hori, M., Sugino, H., Yoshida, I., Isono, M., Tamura, G. and Arima, K. 1969c. Determination of the location of lactone ring in surfactin. Agric. Biol. Chem. 33 : 1523 - 1524.
- Kakinuma, A., Ouchida, A., Shima, T., Sugino, H., Isono, M., Tamura, G. and Arima, K. 1969d. Conformation of the structure of surfactin by mass spectrometry. Agric. Biol. Chem. 33 : 1669-1671.
- Kameda, Y., Ouhira, S., Matsui, K., Kanatomo, S., Hase, T. and Atsusaka, T. 1974. Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. Chem. Pharm. Bull. 22 : 938 - 944.
- Kim, H.S., Yoon, B.D., Lee, C.H., Suh, H.H., Oh, H.M., Katsuragi, T. and Taki, Y. 1997a. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. J. Ferment. Bioeng. 84 : 41-46.
- Kim, P., Oh, D.K., Kim, S.Y. and Kim, J.H. 1997b. Relationship between emulsifying activity and carbohydrate backbone structure of emulsan from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. Biotechnol. Lett. 19 : 457 - 459.
- Kushner, D.J. 1968. Halophilic bacteria. Adv. Appl. Microbiol. 10 : 73-99.
- Lang, S. and Wullbrandt, S. 1999. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51 : 22-32.

- Lin, S.C., Carswell, K.S., Sharma, M.M. and Georgiou, G. 1993. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2 . Biotechnol. Prog. 9 : 138-145.
- Lin, S.C., Minton, M.A., Sharma, M.M. and Georgiou, G. 1994a. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2 . Appl. Environ. Microbiol. 60: 31-38.
- Lin, S.C., Carswell, K.S., Sharma, M.M. and Georgiou, G. 1994b. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2 . Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 : 281-285.
- Lin, S.C. 1996. Biosurfactants : Recent advances. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66 :109-120
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishizuka, I., Toida, T. and Yano, I. 1990. Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxy fatty acids produced by *Serratia rubidaea*. J. Bacteriol. 172 : 3015 - 3022.
- Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa, Y., Isa, K., Hara-Hotta, H. and Yano, I. 1992. A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and - independent spreading growth of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 174 : 1769 -1776.
- McInerney, M.J., Jenneman, G.E. Knapp, R.M. and Menzie, D.E. 1985. Biosurfactant and enhanced oil recovery. U.S. Patent No. 4,522,261.
- McInerney, M.J., Javaheri, M. and David, P. 1990. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. J. Indus. Microbiol. 5 : 95-102.
- Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D. and Kamp, R.S. 1993. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. J. Biol. Chem. 268 : 7678 - 7684.
- Morikawa, M., Ito, M. and Imanaka, T. 1992. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. J. Ferment. Bioeng. 74 : 255-261.
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter sp* strain MIS 38. J. Bacteriol. 175 : 6459-6466.

- Morikawa, M. and Imanaka, T. 1993. Isolation of a new mixotrophic bacterium which can fix CO₂ and assimilate aliphatic and aromatic hydrocarbons anaerobically. J.Ferment.Bioeng. 76 : 280 - 283.
- Mulligan, C.N. and Gibbs, B.F. 1989. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl.Environ.Microbiol. 55 : 3016 - 3019.
- Mulligan, C.N. and Gibbs, B.F. 1990. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. J.Chem.Tech.Biotechnol. 47 : 23 - 29.
- Nakano, M.M. and Zuber, P. 1989. Cloning and characterization of *surfB*, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 171 : 5347 -5353.
- Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J. and Zuber, P. 1992. Isolation and characterization of *sfp* : a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. Mol.Gen.Genet. 232 : 313 - 321.
- Nakano, M.M. and Zuber, P. 1993. Mutation analysis of the regulatory region of the *surfA* operon in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 175 : 3188 - 3191.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmell, S., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl.Environ. Microbiol. 61 : 3240-3244.
- Neu, T.R., Hartner, T. and Poralla, K. 1990. Surface active properties of viscosin : a peptidolipid antibiotic. Appl.Microbiol. Biotechnol. 32 : 518-520.
- Neu, T.R. 1996. Significance of bacterial surface -active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiol.Rev. 60 : 151 - 166.
- Nishikiori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T and Umezawa, H. 1986. Plipastatins : new inhibitors of phospholipase A2 produced by *Bacillus cereus* BMG302-ff67, III. Structural elucidation of plipastatins. J. Antibiot. (Tokyo) 35 : 755-761.
- Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1992. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. Biotechnol.Lett. 14 : 1165 - 1168.
- Passeri, A., Schmidt, M., Haffener, T., Wray, V., Lang, S. and Wagner, F. 1992. Marine biosurfactants. IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic

- glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. Appl.Microbiol.Biotechnol. 37 : 281 - 286.
- Patel, R.M. and Desai, A.J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3. from molasses. Lett. Appl. Microbiol. 25 : 91- 94.
- Peypoux, F., Pommier, M-T., Das, B.C., Besson, F., Delcambe, L. and Michel, G. 1986. Structures of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. J. Antibiot. (Tokyo) 37 : 1600-1604.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbe, H., Das, B.C. Ptak, M. and Michel, G. 1991. Isolation and characterization of a new variant of surfactin , the [Val⁷]surfactin. Eur. J. Biochem. 202 : 101-106.
- Peypoux, F. and Michel, G. 1992. Controlled biosynthesis of Val⁷-and Leu⁷-surfactin. Appl. Microbiol.Biotechnol. 36 : 515-517.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbe, H., Grangemard, I., Das, B.C., Ptak, M., Wallach, J. and Michel G. 1994. [Ala 4]surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. Eur. J. Biochem. 224 : 89 - 96.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M. and Wallach, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl.Microbiol.Biotechnol. 51:553-563.
- Pfiffner, S.M., Mcinerney, M.J., Jenneman, G.E. and Knapp, R.M. 1986. Isolation of halolerant, thermotolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of the exopolymer. Appl. Environ. Microbiol. 51 : 1224 - 1229.
- Prathi, V. and Cameotra, S.S. 1997. Production and properties of a biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae*-an Antarctic strain. World J. Microbiol.Biotechnol. 13 : 137-139
- Quadri., L.E.N., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. and Walsh, C.T. 1998. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. Biochem. 37:1585-1595.
- Ramana, K.V. and Karanth, N.G. 1989. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J.Chem.Tech. Biotechnol. 45 : 249 - 257.

- Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnol. Lett. 11 : 871 - 874.
- Roggiani, M. and Dubnau, D. 1993. *comA*, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *surfA*. J. Bacteriol. 175 : 3182-3187.
- Roongsawang N., Thaniyavarn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Properties of biosurfactant produced by *Bacillus* sp. strain KP-2. Thai J. Biotechnol. 1 : 54-60.
- Rosenberg, E. 1986. Microbial surfactant. CRC Crit.Rev.Biotechnol. 3 : 109 - 132.
- Roubin, M.R. and Mulligan, C.N. 1989. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity. Can. J. Microbiol. 35 : 854-859.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis. 1989. Molecular cloning (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sandrin, C., Peypoux, F. and Michel, G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Appl.Biochem. 12 : 370-375.
- Sen, R. 1997. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. J.Chem. Tech.Biotechnol. 68 : 263-270.
- Sen, R. and Swaminathan, T. 1997. Application of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. Appl.Microbiol.Biotechnol. 47 : 358-363.
- Sheppard, J.D. and Mulligan, C.N. 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. Appl. Microbiol.Biotechnol. 27 : 110-116.
- Sheppard, J.D. and Cooper, D.G. 1990. The effects of a biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. J.Chem.Tech.Biotechnol. 48 : 325-336.
- Sim, L., Ward, O.P. and Li, Z.Y. 1997. Production and Characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. J. Indus. Microbiol. Biotechnol. 19 : 232-238.
- Sneath P.H.A. 1986. Endospore-forming gram positive rods and cocci. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2. Baltimore/London : Williams & Wilkins. p 1104-1207.

- Thimon, L., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Roux, B. and Michel, G. 1992a. Interaction of bioactive lipopeptide, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Appl. Biochem. 16 : 144 - 151.
- Thimon, L., Peypoux, F. and Michel, G. 1992b. Interaction of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*, with inorganic cations. Biotechnol. Lett. 14 : 713 - 718.
- Thimon, L., Peypoux, F., Das, B.C., Wallach, J. and Michel, G. 1994. Selective esterification of surfactin : preparation and properties of surfactin methyl esters. Biotechnol. Appl. Biochem. 20 : 415 - 423.
- Tsuge, K., Ano, T. and Shoda, M. 1995. Characterization of *Bacillus subtilis* YB8, coproducer of lipopeptide surfactin and plipastatin B1. J. Gen. Appl. Microbiol. 41 : 541 - 545.
- Tsuge, K., Ano, T. and Shoda, M. 1996. Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. Arch. Microbiol. 165 : 243-251.
- Velraeds, M.M.C., Van Der Mei, H., Reid G. and Busscher H. 1996. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 1958-1963.
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M. and Vater, J. 1997. Antimycoplasmal properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 44 - 49.
- Weinrauch, Y., Guillen, N. and Dubnau, D. 1989. Sequence and transcription mapping of *Bacillus subtilis* competence genes *comB* and *comA*, one of which is related to a family of bacterial regulatory determinants. J. Bacteriol. 171 : 5362-5375.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 1706-1713.
- Yakimov, M.M., Fredrickson, H. L. and Timmis, K.N. 1996. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A , a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. Biotechnol. Appl. Biochem. 23 : 13-18.

Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lansdorf, H. and Timmis, K. 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 : 339-348.

Yakimov, M.M., Abraham, W-R., Meyer, H., Giuliana, L. and Golyshin, P.N. 1999. Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta.* 1438 : 273-280.

Zhang, Y. and Miller, R.M. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 3276 - 3282.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งแอล-บี (LB- Agar)

สารสกัดจากยีสต์	5.0 กรัม
กลูโคส	10.0 กรัม
ทริปโตน	10.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	50.0 กรัม
วุ้นผง	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

2. อาหารเหลวแอล-บี (LB- Broth)

สารสกัดจากยีสต์	5.0 กรัม
กลูโคส	10.0 กรัม
ทริปโตน	10.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	50.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3. อาหารเหลวสูตร L (L - Broth)

สารสกัดจากยีสต์	5.0 กรัม
ทริปโตน	10.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

4. อาหารแข็งนิวเทรียนท์ (Nutrient Agar)

เนื้อสกัด	3.0 กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0 กรัม
วุ้นผง	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

5. อาหารเหลวนิวเทรียนท์ (Nutrient Broth)

เนื้อสกัด	3.0 กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

6. อาหารเลี้ยงเชื้อวี-พี (Voges-Proskaver Broth)

โปรติโอสเปปโตน	7.0 กรัม
กลูโคส	5.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

7. อาหารซิมมอนซิเตรท (Simmon Citrate Medium)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.2 กรัม
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)	1.0 กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0 กรัม
โซเดียมซิเตรท	2.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
ผงวุ้น	20.0 กรัม
บรอมไธมอลบลู	0.08 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.9 ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

8. อาหารเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol Red Broth Base)

โปรติโอสเปปโตน	10.0 กรัม
เนื้อสกัด	1.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0 กรัม
ฟีนอลเรด	0.018 กรัม
น้ำตาล	1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)
น้ำกลั่น	1000 มล.

น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ดี-กลูโคส ดี-ฟรุคโตส ดี-แมนนิทอล ดี-ไซโลส และ แอล-อะราบิโนส ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

9. อาหารอินโดลโปรดักชัน (Indole Production Medium)

ทริปโตเนน	10.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

10. อาหารซอลท์โทเลอแรนซ์ (Salt Tolerance Medium)

อาหารเหลวนิวเทรียนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 5)	100 มล.
โซเดียมคลอไรด์	2.0, 5.0, 7.0, 10.0, 12, 14, 16 และ 20% น้ำหนัก/ปริมาตร

ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

11. อาหารแข็งสตาร์ช (Starch Agar)

แป้งมันฝรั่ง	1.0 กรัม
อาหารแข็งนิวเทรียนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 4)	100 มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

12. อาหารแข็งนิวเทรียนท์ เจลาติน (Nutrient Gelatin Agar)

อาหารแข็งนิวเทรียนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 4)	100 มล.
เจลาติน	0.4 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

13. อาหารแข็งสกีมมิลค์ (Skim Milk Agar)

อาหารส่วนที่ 1	
สกีมมิลค์พาวเดอร์ (Skim Milk Powder)	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	50 มล.
อาหารส่วนที่ 2	
วุ้นผง	1 กรัม
น้ำกลั่น	50 มล.

อาหารส่วนที่ 1 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110⁰ซ อาหารส่วนที่ 2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121⁰ซ ที่ความดันและเวลามาตรฐาน เมื่ออุณหภูมิลดลงจนถึง 45⁰ซ จึงผสมอาหารทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน

14. อาหารเหลวไทโอไกลิโคเลต (Thioglycolate Broth)

แบคโตคาซิโตน (Casitone)	15.0 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0 กรัม
เดกซ์โทรส	5.5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.5 กรัม
แอล-ซิสทีน (L-Cystine)	0.5 กรัม
โซเดียมไทโอไกลิโคเลต	0.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

15. อาหารกึ่งแข็ง (Semi-Solid Medium)

ทริบิโตน	2.0 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.0 กรัม
วุ้นผง	1.0 กรัม
ไตรฟีนีลเตตระโซเลียมคลอไรด์ (Triphenyl Tetrazolium Chloride)	20.0 มล.
น้ำกลั่น	180 มล.

หลอมอาหารให้เข้ากันแล้วจึงเติม ไตรฟีนีลเตตระโซเลียมคลอไรด์ (0.5% น้ำหนัก/ปริมาตร) 20.0 มล. ใส่หลอดขนาด 20.0 มล. หลอดละ 5.0 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

16. อาหารเหลวที่มีองค์ประกอบดังรายงานของ Carrillo และคณะ (1996)

กลูโคส	20 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	7 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.7 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3.8 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.5 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

17. อาหารเหลวกำหนดสูตร (Defined medium)

กลูโคส	20.0 กรัม
แอมโมเนียไนเตรท (NH_4NO_3)	4 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.4 กรัม
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม
กรดฟอสเฟอริก (H_3PO_4)	0.5 มล.
กรดบอริก (H_3BO_3)	1.53 มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.284 มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.71 มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.7 มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.9 มิลลิกรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4.3 มิลลิกรัม
โคบอลคลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 มิลลิกรัม
อีดีทีเอ (EDTA)	200 มิลลิกรัม
แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium Pantothenate)	1.176 มิลลิกรัม
ไบโอติน (Biotin)	5.88 ไมโครกรัม
กรดฟอริก (Folic acid)	5.88 ไมโครกรัม
อินโนซิทอล (Inositol)	0.588 มิลลิกรัม
ไนอาซิน (Niacin)	1.176 มิลลิกรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (p-Aminobenzoic acid)	0.588 มิลลิกรัม
ไพโรดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)	1.176 มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	0.588 มิลลิกรัม
ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)	1.176 มิลลิกรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	14 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

นี้มาเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน สำหรับสารละลายวิตามินทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง

18. อาหารเหลวสูตร TF I

กลูโคส	5 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	6 กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	14 กรัม
โซเดียมซิเตรท	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.2 กรัม
Vitamine assay casamino acid	0.2 กรัม
แอล-อาร์จินีน (L- arginine)	50 มิลลิกรัม
แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophane)	50 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.
นำมาเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน	

19. อาหารเหลวสูตร TF II

กลูโคส	5 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	6 กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	14 กรัม
โซเดียมซิเตรท	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.2 กรัม
Vitamine assay casamino acid	0.2 กรัม
แอล-อาร์จินีน (L- arginine)	5 มิลลิกรัม
แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophane)	5 มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.
นำมาเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน	

ภาคผนวก ข

สี้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1 สารละลายแกรมคริสตอลไวโอเล็ต (Gram ' s Crystal Violet Solution)

สารละลาย ก

คริสตอลไวโอเล็ต	2 กรัม
เอทานอล 95%	20 มล.

สารละลาย ข

แอมโมเนียมออกซาลेट	0.8 กรัม
น้ำกลั่น	80 มล.

ผสมสารละลาย ก และ ข ที่เตรียมได้เข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีชา

2 สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram ' s Iodine Solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1 กรัม
โปตัสเซียมไอโอไดด์	2 กรัม
น้ำกลั่น	300 มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

3 สารละลายแกรมซาฟานินไอ (Gram ' s Safranin Straining Solution)

ซาฟานิน	0.25 กรัม
เอทานอล 95 %	10 มล.
น้ำกลั่น	100 มล.

ละลายซาฟานินในเอทานอล แล้วจึงเติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

4. สารละลายมาลาไคท์กรีน (Malachite green Solution)

มาลาไคท์กรีน	5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มล.

5 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์)	10 มล.
น้ำกลั่น	90 มล.

6 สารละลายวี-พี (VP Reagent)

สารละลาย ก (สารละลาย 5 % แอลฟาเนฟтол)

แอลฟาเนฟтол (α -Naphthol)	5 กรัม
เอทานอลเข้มข้น 100 %	100 มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

สารละลาย ข (สารละลาย 40% โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์)

โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์	40 กรัม
น้ำกลั่น	100 มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

7. สารละลายโคแวก (Kovac 's Solution)

พาราไดเมทิลอะมีโนเบนซัลดีไฮด์ (P-Dimethylamenobenzaldehyde)	5 กรัม
--	--------

เอมิล หรือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Amyl or Butyl Alcohol)	75 มล.
---	--------

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	25 มล.
-----------------------	--------

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

8. สารละลายบีเฟอ์ TEA

เตรียมที่ความเข้มข้น 5 เท่า

ทริสมาเบส	24.2 กรัม
-----------	-----------

กรดอะซิติกเข้มข้น	5.71 มล.
-------------------	----------

0.5 โมลาร์ อีดีทีเอ pH 8.0	10 มล.
----------------------------	--------

น้ำกลั่น	990 มล.
----------	---------

ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า

9. สีสติดตาม (Tracking dye)

เตรียมที่ความเข้มข้น 5 เท่า

ซูโครส	60 %
--------	------

โบรโมฟีนอลบลู	0.25 %
---------------	--------

ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0	100 มิลลิโมลาร์
---------------------------	-----------------

โซเดียมคลอไรด์	100 มิลลิโมลาร์
----------------	-----------------

Na ₂ EDTA pH 8.0	0.5 มิลลิโมลาร์
-----------------------------	-----------------

10. Denaturation buffer

โซเดียมไฮดรอกไซด์	20 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	87.75 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.

11. Neutralization buffer

โซเดียมคลอไรด์	1.5 โมลาร์
ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ pH 7.2	0.5 โมลาร์
อีดีทีเอ	1 มิลลิโมลาร์

12. สารละลาย 10X SSC

โซเดียมคลอไรด์	87.7 กรัม
โซเดียมซิเตรท	44.1 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มล.
ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0	

13. สารละลายบัฟเฟอร์ปฐมภูมิ

ยูเรีย	2 โมลาร์
โซเดียมเดโคซิลซัลเฟต (SDS)	1 %
โซเดียมฟอสเฟต pH 7.0	50 มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	150 มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	10 มิลลิโมลาร์
Blocking reagent	0.2 %

14. สารละลายบัฟเฟอร์ทุติยภูมิ

ทริสเบส	100 มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	200 มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์	2 มิลลิโมลาร์
ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 10.0	

ภาคผนวก ก

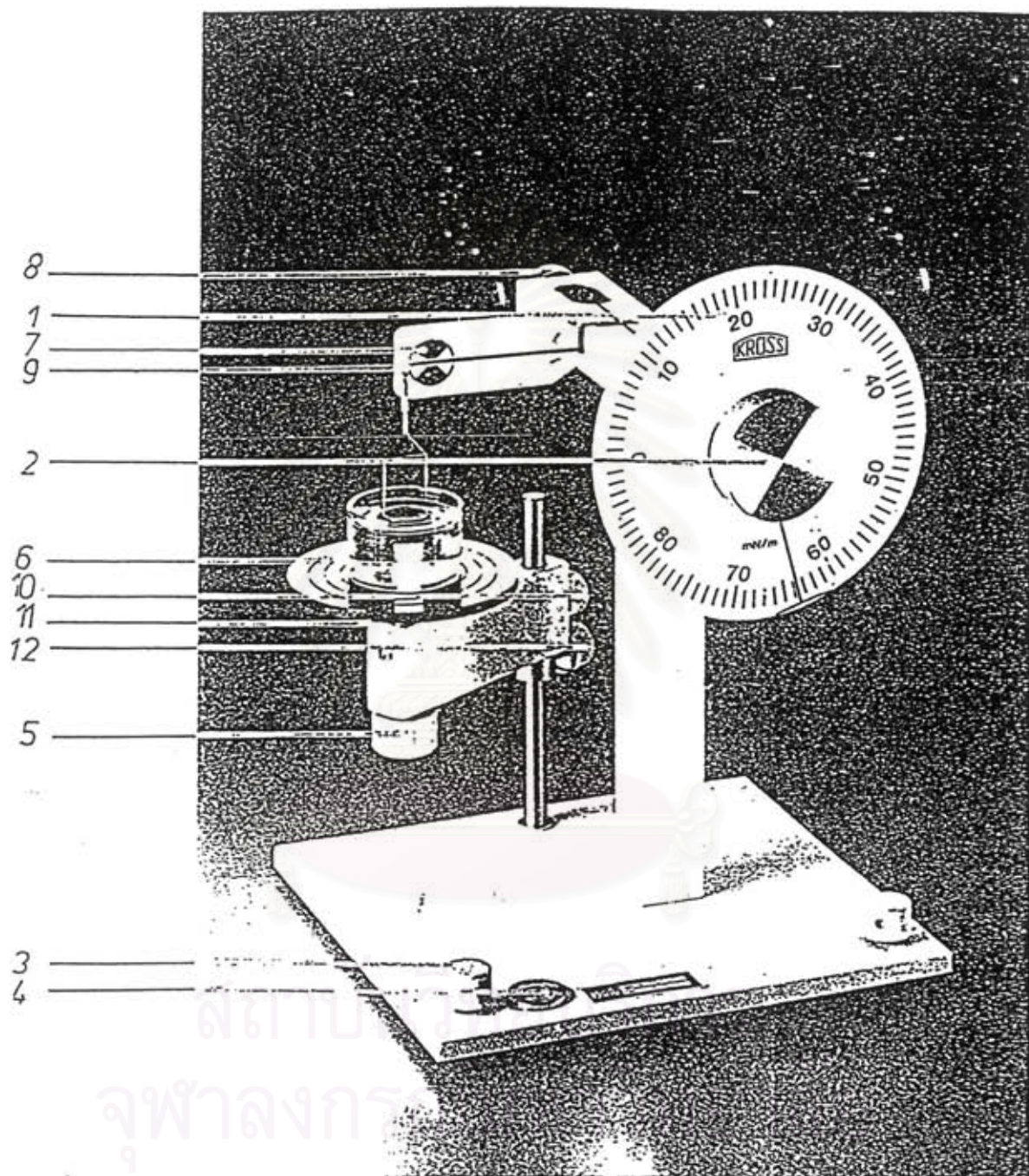
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

ลักษณะและองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Tensiometer) รุ่น K₆ ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน แสดงดังรูป

การวัดค่าแรงตึงผิวของของเหลวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิวนี้ ใช้วิธีการที่เรียกว่า ring method เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดค่าแรงตึงผิวของของเหลว (surface tension) และค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวประจัน (interfacial tension) การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องมือนี้ได้ทำการวัดที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ตลอดการทดลอง

วิธีการใช้เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 มีขั้นตอนดังนี้

1. ปรับ handwheel with pointer (2) ให้สเกลมีค่าเป็นศูนย์
2. ปรับ zero adjustment (8) โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุลกึ่งกลางของ mark (7)
3. ปรับระดับที่วางสารตัวอย่างโดยหมุน (10) แล้วยกขึ้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ
4. แขนง ring ลงใน balance beam (9) ปรับให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลโดยหมุน zero adjustment (8) ตามเข็มนาฬิกา
5. ใส่สารตัวอย่างในที่ใส่สารตัวอย่างประมาณ 10-50 มล. วางลงบน sample table (6) แล้วหมุน micrometer screw (5) ตามเข็มนาฬิกาเพื่อยกที่ใส่สารตัวอย่างขึ้นให้สัมผัสกับ ring โดยให้ ring จมอยู่ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 5 มม.
6. เมื่อ ring สัมผัสกับตัวอย่างแล้วอาจต้องปรับ balance beam (9) ให้อยู่ในตำแหน่งสมดุลอีกครั้ง โดยหมุน zero adjustment (8)
7. เริ่มวัดค่าแรงตึงผิวโดยหมุน micrometer screw (5) ทวนเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ ในขณะที่เดียวกันก็หมุน pointer (2) ตามเข็มนาฬิกาอย่างช้าๆ โดยรักษาให้ balance beam (9) อยู่ในตำแหน่งสมดุล
8. เมื่อ ring หลุดออกจากตัวอย่างอ่านค่าแรงตึงผิวตามสเกล (1) มีหน่วยเป็น mN/m



แสดงองค์ประกอบของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 บริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

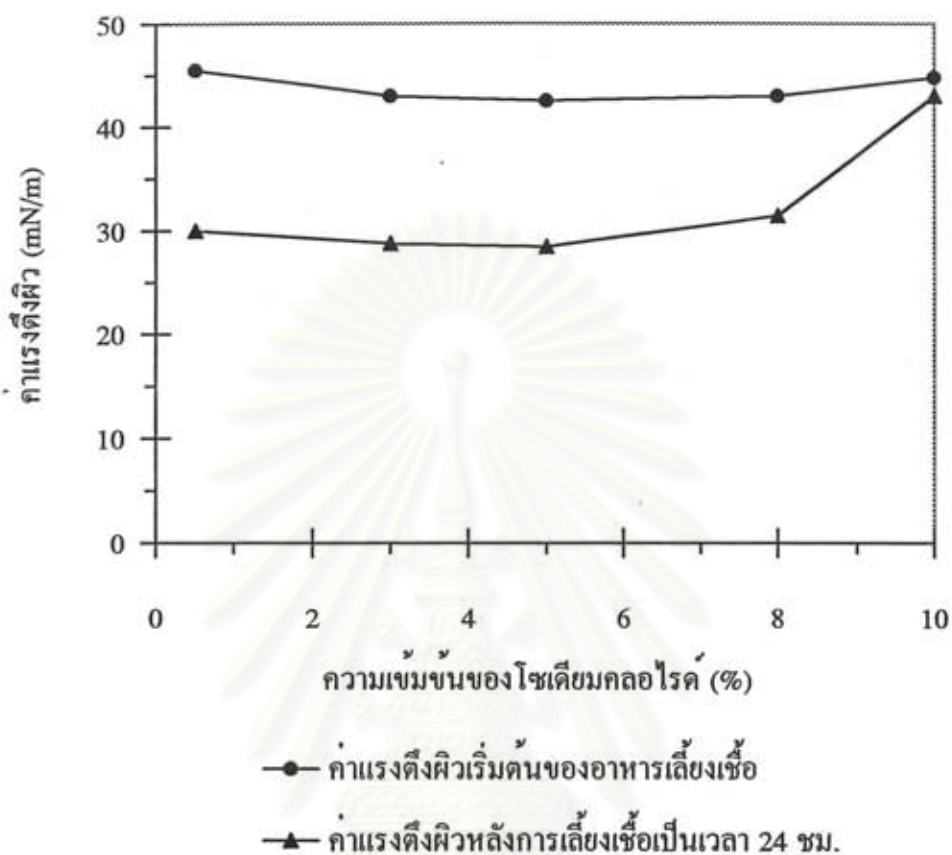
- (1) scale in mN/m (2) handwheel with pointer (3) screws for regulation of the level (4) box level (5) micrometer screw (6) sample-table (7) mark (8) handwheel for zero-adjustment (9) balance-beam (10) and (12) handwheels for fixing the crossbar (11) carrier of sample-table

ภาคผนวก ง

สัญลักษณ์ของกรดอะมิโนแบบ 3 ตัวอักษร และแบบ 1 ตัวอักษร

กรดอะมิโน	สัญลักษณ์ แบบ 3 ตัวอักษร	สัญลักษณ์ แบบ 1 ตัวอักษร
อะลานีน (Alanine)	Ala	A
อาร์จินีน (Arginine)	Arg	R
แอสปาราจีน (Asparagine)	Asn	N
กรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid)	Asp	D
แอสปาราจีน หรือ กรดแอสปาร์ติก	Asx	B
ซิสเตอีน (Cysteine)	Cys	C
กรดกลูตามิก (Glutamic acid)	Glu	E
กลูตามีน (Glutamine)	Gln	Q
กลูตามีน หรือ กรดกลูตามิก	Glx	Z
ไกลซีน (Glycine)	Gly	G
ฮิสติดีน (Histidine)	His	H
ไอโซลิวซีน (Isoleucine)	Ile	I
ลิวซีน (Leucine)	Leu	L
ไลซีน (Lysine)	Lys	K
เมไธโอนีน (Methionine)	Met	M
ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine)	Phe	F
โพรลีน (Proline)	Pro	P
เซรีน (Serine)	Ser	S
ธรีโอนีน (Threonine)	The	T
ทริปโตเฟน (Tryptophan)	Trp	W
ไทโรซีน (Tyrosine)	Tyr	Y
วาลีน (Valine)	Val	V

ภาคผนวก จ



ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการลดค่าแรงดึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร และแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน



นายนิรันดร์ รุ่งสว่าง เกิดวันที่ 24 กันยายน พ.ศ. 2516 ที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 ในระหว่างศึกษาได้รับทุนจากมหาวิทยาลัยโอซากา ภายใต้การสนับสนุนจากสมาคมการศึกษานานาชาติแห่งประเทศไทย (AIEJ) เพื่อไปทำการวิจัยค้นคว้าประกอบการทำวิทยานิพนธ์ที่มหาวิทยาลัยโอซากา ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2541 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2542 เป็นระยะเวลา 1 ปี

ผลงานทางวิชาการที่พิมพ์เผยแพร่

Roongsawang N., Thaniyavarn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Properties of biosurfactant produced by *Bacillus* sp. strain KP-2. *Thai J. Biotechnol.* 1 : 54-60.

ผลงานทางวิชาการที่เข้าร่วมประชุม

Roongsawang, N. and Thaniyavarn, J. 1997. Microbial biosurfactant produced by *Bacillus* sp. strain KP-2. Poster presented at the 9th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar , 19-22 November , Nakhon Ratchasima, Thailand. Abstracts book. p. 181.

Roongsawang, N., Thaniyavarn, J., Morikawa, M., Haruki, M., Imanaka, T. and Kanaya, S. 1999. Isolation of halotolerant *Bacillus* which produced three types of lipopeptide type biosurfactants. Poster presented at the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry, 30-1 March/April, Fukuoka, Japan, Abstracts book. p. 321

Roongsawang, N., Thaniyavarn, J., Thaniyavarn, S. Morikawa, M., Haruki, M., Imanaka, T. and Kanaya, S. 1999. Halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1, a coproducer of lipopeptide bacillomycin L, plipastatin and surfactin. Poster presented at the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference and the 11th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 15-18 November, Phuket arcadia hotel and resort, Phuket, Thailand. Abstracts book. p. 215