การประเมินแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *บาซิลลัส เมกาเทอเรียม* WC2

Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Biosurfactant by *Bacillus megaterium* WC2

พรวดี สาตรา[1] สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ[1] นฤมล จียโชค[3] พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์[1] และ ชินพงษ์ กฤตยากรนุพงศ์[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา [2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
[3]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย*บาซิลลัส เมกาเทอเรียม* WC2 (*Bacillus megaterium* WC2) ที่อุณหภูมิและความเร็วรอบในการเขย่าคงที่ โดยมีจุดมุ่งหมายที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต การสร้างสารลดแรงตึงผิววิเคราะห์โดยการวัดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) และความสามารถในการกระจายน้ำมันดีเซล จากการทดลองพบว่า *B. megaterium* WC2 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มและเปปโตนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำกว่า 25 มิลลินิวตันต่อเมตร และส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบ โดยมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันสูงกว่า 65%

คำสำคัญ : *สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน บาซิลลัส เมกาเทอเรียม* WC2

Abstract

This research aimed to study the variation of carbon and nitrogen sources on the production of a biosurfactant by *Bacillus megaterium* WC2 at constant temperature and shaking condition in order to increase productivity in the process. Then, biosurfactant synthesis was followed by measuring surface tension, emulsifying index (E_{24}), and oil displacement ability. The results showed that biosurfactant was best produced by *B. megaterium* when palm oil and peptone were used as carbon and nitrogen sources, respectively. The surface tension of the medium was reduced by lower than 25 mN/m and the 48-h cell-free supernatant was able to emulsify all hydrocarbons tested and the emulsification index was more than 65%.

มหาวิทยาลัยรังสิต

Keywords : *Biosurfactant, carbon and nitrogen sources, Bacillus megaterium* WC2

1. บทนำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งส่วนใหญ่สร้างมาจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยสารลดแรงตึงผิวจะถูกผลิตออกมาจากเซลล์ และเซลล์ของจุลินทรีย์ก็สามารถทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวได้เช่นกัน เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์มีโครงสร้างคล้ายสารลดแรงตึงผิว คือมีโครงสร้างแบบแอมฟิพาติก (amphipathic compounds) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้ว และ ส่วนที่ไม่มีขั้ว สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกได้ 6 กลุ่ม ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี ได้แก่ 1. ไกลโคลิปิด (Glycolipid) 2. ไลโปเปปไทด์ (Lipopeptides) และไลโปโปรตีน (Lipoprotein) 3. กรดไขมัน และลิปิดที่เป็นกลาง (Fatty acid and Neutral lipid) 4. ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) 5. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (Polymeric Biosurfactants) และ 6. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเป็นอนุภาค (Particulate Biosurfactants) (Desai and Banat, 1997) ข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวที่เป็นสารเคมี คือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม (Fiechter, 1992) ทนอุณหภูมิสูง ทน pH ในช่วงกว้าง และมีความทนเกลือสูง (Banat et al., 2000) การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีการขยายตัวค่อนข้างมาก เนื่องจากมีศักยภาพที่หลากหลาย มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมน้ำมัน ปิโตรเลียม อุตสาหกรรมทำกระดาษ และอื่นๆ (Soumen et al., 2006) ปัจจุบันนี้ จึงมีการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อให้ได้มาซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถนำไปใช้กับงานในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงขั้นตอนกระบวนการผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ปริมาณสูง

2. วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus megaterium* WC2 เพื่อให้เกิดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด

3. อุปกรณ์และวิธีการ

3.1. แหล่งของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *Bacillus megaterium* WC2 ที่แยกได้จากสหกรณ์โคนม ซึ่งเก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียงนิวเทรียนท์ (Nutrient agar slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นหัวเชื้อ (stock culture)

3.2. การเตรียมกล้าเชื้อและสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* WC 2 ลงในอาหารเหลวลูเรีย เบอทานิ (Luria Bertani Broth) ที่ผสม 2% กลูโคส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กล้าเชื้อที่ได้จะถูกปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.8 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ก่อนถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเบซัล (basal medium) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อโดยเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อ

นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ มาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำการแยกเซลล์ หลังจากนั้นนำส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อไปทำการศึกษาสมบัติของสารลดแรงตึงผิว เช่น ค่าแรงตึงผิว ดัชนีการเกิดอิมัลชัน และความสามารถในการกระจายน้ำมันดีเซล

อาหารเบซัล ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย โซเดียมไนเตรท 7 กรัม โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัม เฟอรัสซัลเฟต 0.01 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 0.1 กรัม สารละลายเกลือแร่ (trace elements) 0.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1 ลิตร (สารละลายเกลือแร่ 1 ลิตร ประกอบด้วย กรดบอริก 0.25 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม แมงกานิสซัลเฟต 0.5 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 0.06 กรัม ซิงค์ซัลเฟต 0.7 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร)

3.3. การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

การศึกษาหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะเริ่มจากการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนโดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดเดียว เมื่อได้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงเริ่มทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ กลูโคส ซูโครส น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก และน้ำมันดีเซล ที่ความเข้มข้น 2% น้ำหนักต่อปริมาตร และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เปปโตน (Peptone) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) แอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate, NH_4NO_3) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แทนโซเดียมไนเตรท (sodium nitrate, $NaNO_3$) ที่ความเข้มข้น 0.7% น้ำหนักต่อปริมาตร

3.4. การวัดค่าแรงตึงผิว

นำส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าแรงตึงผิวที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง Ring tensiometer ยี่ห้อ PHYWE บันทึกค่าที่ได้จากตัวเลขบนหน้าปัดของเครื่อง แล้วนำไปคำนวณหาค่าแรงตึงผิว จากสูตร

$$\text{แรงตึงผิว} = \frac{\text{แรง (มิลลินิวตัน)}}{2\pi \times 19.65 \text{ (มิลลิเมตร)}}$$

3.5. การวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24})

ปิเปตสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ต้องการทดสอบ (น้ำมันดีเซล ไซลีน น้ำมันก๊าด เฮปเทน และน้ำมันปาล์ม) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความสูงของอิมัลชันที่ได้ นำมาคำนวณหาค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Patel and Desai, 1997) ดังสูตรต่อไปนี้

$$E_{24} = \frac{\text{ความสูงของของเหลวที่เกิดอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของของเหลวทั้งหมด}} \times 100$$

3.6. การวัดความสามารถในการกระจายน้ำมันดีเซล

ตวงน้ำ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณส่วนใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร) หยดน้ำมันดีเซล 15 ไมโครลิตร ให้ปกคลุมบนผิวน้ำ หยดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร อ่านความกว้างของบริเวณใสและคำนวณหาพื้นที่ กำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของ

มหาวิทยาลัยรังสิต

การกระจายตัวของน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย (อารีย์, 2542)

พื้นที่ของบริเวณใส = π x รัศมีความกว้างของบริเวณใส^2 (เซนติเมตร)^2

3.7. การวิเคราะห์อื่นๆ

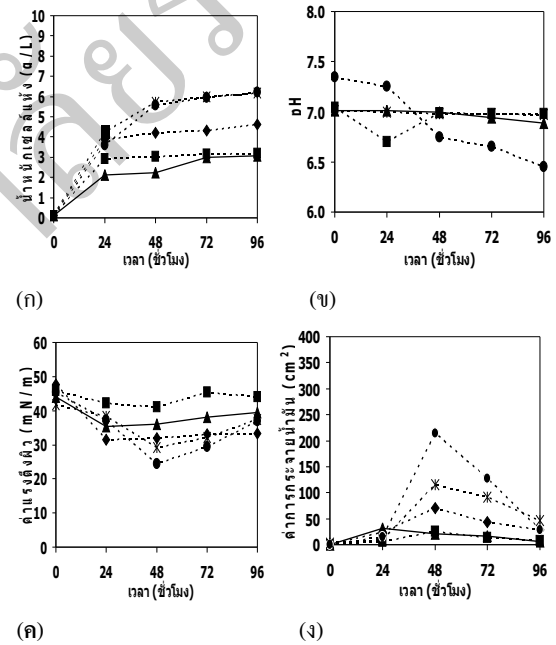
วิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการแยกเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์และนำเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ นำมาเก็บใน Desiccator ก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก

วิเคราะห์ความเป็นกรด – เบส (pH) ด้วย pH meter

4. ผลการวิจัย

4.1. การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

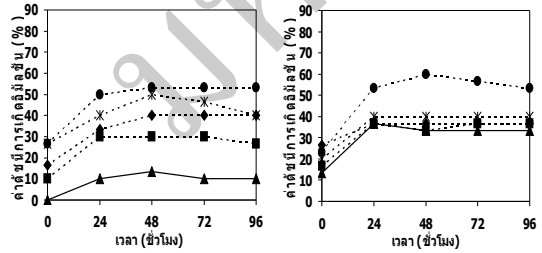
เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* WC 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำมันดีเซล น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 2% น้ำหนักต่อปริมาตร และมีโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย ความเป็นกรด-เบส สมบัติของแรงตึงผิว และสมบัติการกระจายน้ำมัน พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่สุดในน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์ม ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.71 และ 5.55 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างคงที่ ที่ประมาณ 7.0 แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆลดลงตลอดระยะการหมัก แต่ไม่ต่ำกว่า 6.5 (จาก pH เริ่มต้น 7.4) และเป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด โดยสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจากค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น 45.38 mN/m เป็น 24.47 mN/m และส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมงสามารถกระจายน้ำมันดีเซลได้พื้นที่สูงที่สุดเท่ากับ 213.96 ตารางเซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น (รูปภาพที่ 1)



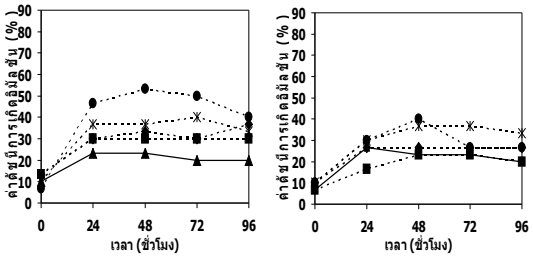
รูปภาพที่ 1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *B. megaterium* WC2 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที (ก) การเจริญของแบคทีเรีย (ข) ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ (ง) ค่าการกระจายน้ำมันของส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ

···◆··· น้ำตาลกลูโคส ···■··· น้ำตาลซูโครส —▲— น้ำมันดีเซล —●— น้ำมันปาล์ม และ --✳-- น้ำมันมะกอก

เมื่อนำส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่เจริญในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆมาทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชัน พบว่า ส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบ และให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) กับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบสูงที่สุด โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ เฮปเทน (60%) ไซลีน (53%) น้ำมันก๊าด (53%) และ น้ำมันดีเซล (40%) (รูปภาพที่ 2) รองลงมาได้แก่ ส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบอยู่ระหว่าง 37-50% สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล ส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสจะให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันสูงกว่าที่มีน้ำตาลซูโครส โดยมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบอยู่ระหว่าง 27-40% และน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีน้อยที่สุด มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบต่ำกว่า 35% (รูปภาพที่ 2)



(ก) (ข)



(ค) (ง)

รูปภาพที่ 2 ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) ของส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยง *B. megaterium* WC2 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเบชัลที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ (ก) ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับไซลีน (ข) ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับเฮปเทน (ค) ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับน้ำมันก๊าด (ง) ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับดีเซล

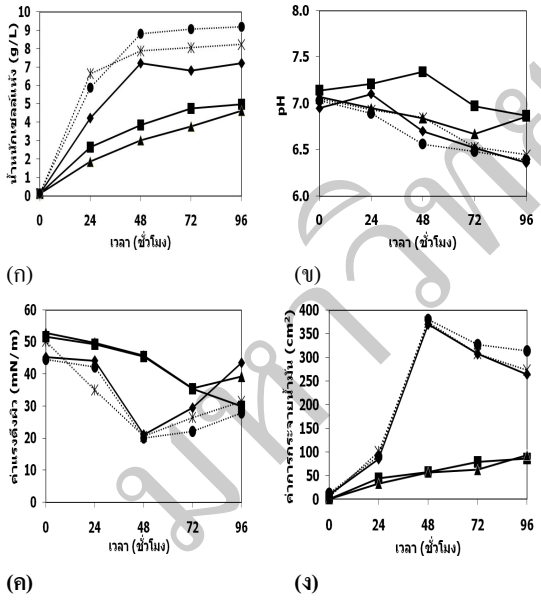
น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำมันดีเซล น้ำมันปาล์ม และ น้ำมันมะกอก

4.2. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการทดลองแปรผันแหล่งคาร์บอน พบว่า น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ดังนั้น ในการทดสอบหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จึงเลือกน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบ โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 5 ชนิด แบ่งเป็นสารอนินทรีย์ไนโตรเจน 3 ชนิด คือ $NaNO_3$, NH_4Cl และ NH_4NO_3 และสารอินทรีย์ไนโตรเจน 2 ชนิด คือ เปปโตน และ สารสกัดจากยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย ความเป็นกรด-เบส สมบัติของแรงตึงผิว และสมบัติการกระจายน้ำมัน (รูปภาพที่ 3) พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเบชัลที่มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.88 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก 7.03 เป็น 6.56 ที่เวลา 48 ชั่วโมง และสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจากค่าแรงตึง

ผิวเริ่มต้น 45.57 mN/m เป็น 20.09 mN/m และส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถกระจายน้ำมันดีเซลได้พื้นที่สูงที่สุด เท่ากับ 380.43 ตารางเซนติเมตร

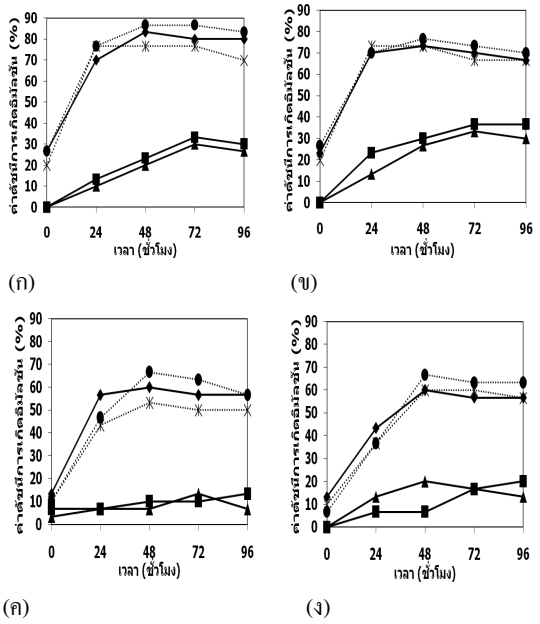
แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ดีที่สุด คือ $NaNO_3$ โดยแบคทีเรียสามารถเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เท่ากับ 7.2 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง และลดความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 6.95 เป็น 6.70 ที่เวลาเดียวกัน สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจากค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น 45.38 mN/m เป็น 21.07 mN/m และส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมงสามารถกระจายน้ำมันดีเซลได้พื้นที่สูงที่สุด เท่ากับ 370.23 ตารางเซนติเมตร (รูปภาพที่ 3)



รูปภาพที่ 3 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *B. megaterium* WC2 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเบชัลที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที (ก) การเจริญของแบคทีเรีย (ข) ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค) ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ (ง) ค่าการกระจายน้ำมันของส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ

···◆·· $NaNO_3$ ···■·· NH_4Cl —▲— NH_4NO_3 -●- Peptone และ -✳- Yeast extract

เมื่อนำส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่เจริญในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆมาทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชัน พบว่า ส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมง และมีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบ และให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบสูงที่สุด โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ ไซลีน (86.7%) เฮปเทน (76.7%) น้ำมันก๊าด (66.7%) และ น้ำมันดีเซล (66.7%) (รูปภาพที่ 4) ขณะที่ส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบอยู่ระหว่าง 53-77% ในกลุ่มของอนินทรีย์ไนโตรเจน ส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 ชั่วโมง และมี $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบ และให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบสูงที่สุด โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ ไซลีน (83.3%) เฮปเทน (73.3%) น้ำมันก๊าด (60.0%) และ น้ำมันดีเซล (60.0%) (รูปภาพที่ 4) แต่ส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีสารประกอบแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทุกชนิดที่ทดสอบต่ำที่สุด โดยมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันไม่เกิน 30% (รูปภาพที่ 4)



รูปภาพที่ 4 ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (E_{24}) ของส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยง *B. megaterium* WC2 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัลที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างๆ (ก) ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับไซลีน (ข) ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับเฮปเทน (ค) ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับน้ำมันก๊าด (ง) ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับน้ำมันดีเซล

···◆·· $NaNO_3$ ···■·· NH_4Cl —▲— NH_4NO_3 -●- Peptone และ -✳- Yeast extract

5. การอภิปรายผล

จากการทดลองหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ได้ผลการทดลองดังรูปภาพที่ 1 และ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น้ำมันพืช (น้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์ม) เป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าน้ำตาล Abouseoud et al. (2008) รายงานว่า การใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดย *Pseudomonas fluorescens* ให้ผลผลิตดีกว่าการใช้กลูโคสและเฮกซาเดกเคน และจากการศึกษาของ Ferraz et al. (2002) เมื่อทดลองใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว และ castor oil ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดย *Serratia marcescens* พบว่า น้ำมันดอกทานตะวันให้ผลการทดลองดีที่สุด สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 64.54 เป็น 29.75 mN/m ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกรดไลโนเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวในดอกทานตะวัน อย่างไรก็ตาม Das et al. (2009) รายงานว่า แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำได้ เช่น กลูโคส ซูโครส แป้ง และกลีเซอรอล ส่งเสริมการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *B. circulans* ที่แยกได้จากทะเล ขณะที่แหล่งคาร์บอนจำพวกน้ำมัน เช่น น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันก๊าด ไม่ส่งเสริมทั้งการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของเชื้อชนิดนี้ นอกจากนี้รายงานของ Kim et al. (1997) กล่าวว่า *B. subtilis* C9 สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 72.8 เป็น 28.2 dyne/cm และเกิดอิมัลชันกับน้ำมันดิบ (crude oil) ได้ดีถ้ามีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน เท่ากับ 683.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร) แต่ความสามารถนี้จะหายไป (เท่ากับศูนย์) ถ้าใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน และค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ลดลงเป็น 45.3 dyne/cm เท่านั้น Joshi et al. (2008) ได้ทดสอบแหล่งคาร์บอน 14 ชนิด และพบว่า น้ำตาล แอลกอฮอล์ และน้ำมัน สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและการสร้างสารลดแรงตึงผิวของ *B. subtilis* 20B ได้ แต่แรงตึงผิวจะลดลงมากกว่าถ้าใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (30.5-33.5 dyne/cm เทียบกับ 33.00-36.33 dyne/cm เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น)

เมื่อทำการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่า เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ทั้งส่งเสริมการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิว และแหล่งไนโตรเจนที่ดีรองลงมา คือ โซเดียมไนเตรท Silva et al. (2010) รายงานว่า โซเดียมไนเตรทและน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดย

Pseudomonas aeruginosa UCP0992 (ดีกว่าเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์) สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อลงเหลือ 28.3 mN/m จากค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น 53 mN/m และมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันกับเฮกซาเดกเคนและน้ำมันดีเซล เท่ากับ 75.2% และ 53.7% ตามลำดับ Abouseoud et al. (2008) พบว่า แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *P. fluorescens* สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ต่ำกว่า 32 dyne/cm และมีค่า E_{24} ต่อน้ำมันดีเซลและน้ำมันก๊าด เท่ากับ 54-55% Das et al. (2009) รายงานว่า สารสกัดจากเนื้อและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการเจริญ แต่ไม่ส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *B. circulans* ที่แยกได้จากทะเล แต่ Kim et al. (1997) รายงานว่า *B. subtilis* C9 สร้างสารลดแรงตึงผิวได้สูงที่สุด เมื่อมี NH_4HCO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน และการเสริมสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ช่วยเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ ขณะที่ในการทดลองนี้แหล่งไนโตรเจนที่มีแอมโมเนียม (NH_4) เป็นองค์ประกอบเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีน้อยที่สุด

6. บทสรุป

จากการทดลองพบว่า *Bacillus megaterium* WC2 สามารถเจริญได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มและเปปโตนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น 45.57 mN/m เป็น 20.09 mN/m ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.9 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง และส่วนใสของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถกระจายน้ำมันดีเซลได้พื้นที่สูงที่สุด เท่ากับ 380.43 ตารางเซนติเมตร ดังนั้น ในการศึกษาต่อไป อาจนำแบคทีเรียชนิดนี้ไปทดสอบการกำจัดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในสภาวะแวดล้อม

7. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากรในภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาเคมีที่เอื้อเฟื้อและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือต่างๆ

8. เอกสารอ้างอิง

อารีย์ กิ่งฉิน. (2542). *การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abouseoud, M., Maach, R., Amrane, A., Boudergua S. and Nabi, A. (2008). *Evaluation of different carbon and nitrogen source in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens*. Desalination. 223: 143-151.

Banat, I.M., Makkar, R.S., and Cameotra, S.S. (2000). *Potential commercial applications of microbial surfactants*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 495-508.

Das, P., Mukherjee, S. and Sen, R. (2009). *Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium.* Bioresource Technol. 100: 1015-1019.

Desai, J.D. and Banat, I.M. (1997). *Microbial production of surfactants and their commercial potential*. Microbiol. Mol. Biol. R. 61: 47-64.

Ferraz, C., De Arujo, A.A. and Pastore, G.M. (2002). *The influence of vegetable oils on biosurfactant production by Serratia marcescens*. Appl. Biochem. Biotechnol. 100: 841-848.

Fiechter, A. (1992). *Integrated systems for biosurfactant synthesis*. Pure Appl. Chem. 64: 1739-1743.

Joshi, S., Bharucha, C. and Desai, A.J. (2008). *Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate Bacillus subtilis 20B*. Bioresource Technol. 99: 4603-4608.

Kim, H-S., Yoon, B-D., Lee, C-H., Suh, H-H., Oh, H-M., Katsuragi, T. and Tani, Y. (1997). *Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from Bacillus subtilis C9*. J. Ferment. Bioeng. 84: 41-46.

Patel, R.M. and Desai, A.J. (1997). *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa GS3 from molass*. Lett. Appl. Microbiol. 25: 91-94.

Silva, S.N.R.L., Farias, C.B.B., Rufino, R.D., Luna, J.M. and Sarubbo, L.A. (2010). *Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa UCP0992*. Colloids Surf., B. 79: 174–183.

Soumen, M., Palashpriya, D. and Ramkrishna, S. (2006). *Towards commercial production of microbial surfactants*. Trends Biotechnol. 11: 509-515.

มหาวิทยาลัยรังสิต