



รายงานการวิจัย

ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการหมักเปลือกส้มโอ
ในการยับยั้งแบคทีเรีย

The Potential of Biosurfactant from Pomelo peel
fermentation for bacterinl inhibition

ณานิกา แซ่แง ชุกลิน Chanika Saenge Chooklin
เอนก สภาวะอินทร์ Anake Sawain
วรรณวิภา ไชยชาญ Wanvipa Chaichan

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2562

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการหมักเปลือกส้มโอในการยับยั้งแบคทีเรียครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมาในปีงบประมาณ 2562

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรังที่ให้การสนับสนุนทุนสนับสนุนในการวิจัย อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ให้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่ร่วมมือกันในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จตามเป้าหมาย

ฉานิกา แซ่แง ชุกลิน
มิถุนายน 2563



ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการหมักเปลือกส้มโอ เพื่อเป็นแนวทางในการยับยั้งแบคทีเรีย

ณานิกา แซ่แง ซุกลิน¹ เอนก สวระอินทร์¹ วรรณวิภา ไชยชาญ¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอเหลือทิ้ง โดยการหมักเปลือกส้มโอเหลือทิ้งร่วมกับน้ำใน 4 อัตราส่วน 1:1 2:1 3:1 และ 4:1 ตามลำดับเป็นเวลา 3 เดือนผลการศึกษาพบว่า ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) ของน้ำหมักจากเปลือกส้มโอในอัตราส่วน 1:1 มีค่าการเกิดอิมัลชันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 51.64 จึงเลือกน้ำหมักเปลือกส้มโอที่อัตราส่วน 1:1 ไปศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยสารสกัดชนิดต่างๆ พบว่าการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ได้ผลผลิตสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.45 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ในช่วงพีเอช 4-10 อุณหภูมิระหว่าง 25-121 องศาเซลเซียส ช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-12 โดยน้ำหนักช่วงความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก และช่วงความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0-0.4 โดย น้ำหนักสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่า มีค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ของเชื้อ *E. coli* *Salmonella* sp. *S. aureus* และ *B. cereus* เท่ากับ 25 25 6.25 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า MBC (Minimal Bactericidal Concentration) เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เปลือกส้มโอเหลือทิ้ง ยับยั้งแบคทีเรีย

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา ตรัง 92150

The Potential of Biosurfactant from Pomelo peel fermentation for bacterinl inhibition

Chanika Saenge Chooklin¹ Anake Sawain¹ Wanvipa Chaichan¹

Abstract

Four different ratios of pomelo peel waste and water (1:1, 1:2, 1:3 and 1:4) were fermented for 3 months to observe the development of their biosurfactances. For Emulsification activity was found in the sample of ratio 1:1. This study was conducted to characterize the biosurfactant produced by pomelo peel waste. The extraction of biosurfactant was carried out by ammonium sulphate precipitation, acid precipitation and organic solvent extraction (chloroform: methanol). The results indicated that crude biosurfactant was recovered from the culture supernatant by chloroform: methanol (2:1). The biosurfactant was capable to reduce surface tension of pH 6-9, temperature of 25-121°C and in the presence of NaCl up to 12% (w/v), MgCl₂ up to 0.1% (w/v) and CaCl₂ up to 0.04% (w/v). MBC (Minimal Bactericidal Concentration) was 55 mg/ml and MIC (Minimal Inhibitory Concentration) against *E.coli*, *Salmonella* sp., *S.aureus* and *B.cereus* were 23, 24, 5.25 and 1.75 mg/ml respectively.

Key words: biosurfactant, pomelo peel waste, inhibit bacteria

¹ Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus, Trang 92150, Thailand

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
ตรวจเอกสาร.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	17
ขอบเขตโครงการวิจัย.....	17
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	17
2 วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง.....	17
วัสดุและอุปกรณ์.....	17
วิธีการวิเคราะห์.....	17
วิธีการทดลอง.....	18
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	22
ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ	23
ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของการหมักเปลือกส้มโอ	24
อัตราส่วน 1:1	
การศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอ	24
คุณสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอ.....	25
การศึกษาความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่าง ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้	25
ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้	26
ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้	27
การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการหมักเปลือกส้มโอใน	29
การยับยั้งแบคทีเรีย	

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	28
4 สรุปลผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	29
สรุปลผลการวิจัย.....	29
ข้อเสนอแนะ.....	29
เอกสารอ้างอิง.....	30



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราส่วนที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้มโอ	18
2	เปรียบเทียบวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ	24



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดอิมัลชัน กับระยะเวลาการหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้มโอ อัตราส่วนต่างๆ	22
2	กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ ในอัตราส่วน 1:1	23
3	ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่หมักจากเปลือกส้มโอ	25
4	ผลของระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ	25
5	ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอ	26
6	ผลของเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเปลือกส้มโอ	27
7	ผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเปลือกส้มโอ	28



บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

จากปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งกลายเป็นปัญหาของโลกปัจจุบัน ที่เกิดจากการใช้สารบางอย่างโดยมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม และก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ การผลิตน้ำสัปดาห์ชีวภาพ เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทางการเกษตรทดแทนการใช้สารสารเคมี ก็เป็นวิธีหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากปริมาณการใช้สารยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมียุคสูงในด้านการเกษตรโรงงานอุตสาหกรรมและในชีวิตประจำวันของทุกคน โดยผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthetic surfactant) ล้วนมีความเป็นพิษต่อธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม โดยกระบวนการทำน้ำสัปดาห์ชีวภาพเป็นการนำวัสดุเหลือใช้ประเภทผักและผลไม้มาทำให้อยู่สลายด้วยวิธีการหมัก พบว่าสารสกัดจากผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว มีองค์ประกอบของแทนนิน สารประกอบฟีนอลิก และกรดแทนนิกสูง จึงมีความเหมาะสมสำหรับนำมาผลิตเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อผ่านกระบวนการหมักในสภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (anaerobic condition) จุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเหล่านั้นให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตรวมถึงการสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตรวมถึงการใช้เอนไซม์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือมีการเติมเอนไซม์ เพื่อเร่งการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งเรียกว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) ที่มีคุณสมบัติในการละลายคราบไขมันและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยกลไกการลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ดังนั้น คณะผู้วิจัยเห็นว่าการนำน้ำสัปดาห์ชีวภาพมาใช้ทดแทนสารยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทางการเกษตรที่มีใช้อยู่ทั่วไปน่าจะช่วยในลดหรือยับยั้งปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางการเกษตรและลดกลิ่นเหม็นจากสิ่งปนเปื้อนได้ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดมลพิษจากสิ่งแวดล้อม และมีความสอดคล้องกับแผนยุทธศาสตร์การเสริมสร้างและพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เกี่ยวกับการบริหารจัดการและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

ตรวจเอกสาร

1. สารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว (surfactants) ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวเข้ามามีบทบาทในการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งในครัวเรือนและอุตสาหกรรม บทบาทที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิว คือ การเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค การซักล้าง บทบาทและกิจกรรมเหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยหนึ่งในการดำรงชีวิตของมนุษย์ตั้งแต่ตื่นนอน การทำความสะอาดร่างกาย อุปกรณ์ ภาชนะ พื้นผิว การบำบัดน้ำ การเกษตรรวมไปจนถึงการนำไปใช้ในการแปรรูป เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวเป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำมักจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน คือมีธาตุคาร์บอนและ ไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนใหญ่แล้วจะมาจากไขมันและน้ำมันตามธรรมชาติ รวมทั้ง ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมและโพลีเมอร์สังเคราะห์ ลักษณะสำคัญของสารลดแรงตึงผิวคือ สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเพื่อให้เกิดกระบวนการต่างๆง่ายขึ้น เช่น การเกิดฟอง การทำให้เปียก คุณสมบัติในการลดปริมาณจุลินทรีย์

และสารพิษ เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะพยายามไปเกาะกับพื้นผิวที่ว่าง เช่น อากาศ แต่ส่วนที่ชอบน้ำจะยังคงอยู่ในน้ำ จึงทำให้สามารถแบ่งประเภทของสารลดแรงตึงผิว ตามลักษณะของประจุของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ได้เป็น 4 ประเภท

ประเภทที่ 1 สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactant) ได้แก่ ซิทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltrimethyl ammonium bromide; CTAB) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3 + Br^-$ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกนี้มักพบในผลิตภัณฑ์ยาสีฟันครีมยาสีฟัน และน้ำยาปรับผ้านุ่ม เป็นต้น

ประเภทที่ 2 สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) ได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate; SDS) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $CH_3(CH_2)_{11}SO_4^- Na^+$ มักเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในผงซักฟอกและสบู่

ประเภทที่ 3 สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (nonionic surfactant) ได้แก่ โพลีออกซีเอทิลีนแพทตีแอลกอฮอล์ (polyoxyethylene alcohol) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $(C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH)$ สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุนี้มักจะนำไปผสมในสบู่เหลวล้างหน้าส่วนใหญ่เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์ รวมถึงผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักผลไม้

ประเภทที่ 4 สารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ (amphoteric surfactants) มีสูตรโมเลกุล คือ $RN^+H_2CH_2CH_2COO^-$ โดยส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวประเภทนี้จะเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง สารป้องกันการกัดกร่อน และสารยับยั้งแบคทีเรีย เป็นต้น นอกจากสารลดแรงตึงผิวที่กล่าวไปข้างต้นซึ่งจัดได้ว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ซึ่งเป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันแล้วยังมีสารลดแรงตึงผิวอีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต เรียกว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในวัตถุติดทางการเกษตรที่ผ่านการล้างการทดสอบ การนำสารลดแรงตึงผิวมาใช้ควบคุมลดปริมาณจุลินทรีย์ สปอร์ และไวรัส

1.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตได้จากจุลินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์เป็นหลักที่นำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรองลงมา คือ ยีสต์ บางสายพันธุ์ ซึ่งสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวเป็นผลของความมีขี้ผึ้ง และไม่มี ขี้ผึ้งในโมเลกุลเดียวกันนอกจากจะสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่หลากหลาย จุลินทรีย์ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอนไนโตรเจน (carbon and nitrogen source) ที่เป็นองค์ประกอบในผักผลไม้ได้ (Ron and Rosenberg, 2001) และสามารถนำของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมมาเป็นวัตถุดิบ ในการผลิต เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง

1.1.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจัดเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างของ 33 โมเลกุลแบบป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipathic molecules) ประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้

1) ส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนหัว (head group) อาจจะเป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ฟอสเฟต (phosphate) กรดอะมิโน (amino acid) ไซคลิกเปปไทด์ (cyclic peptide) หรือแอลกอฮอล์ (alcohol)

2) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนหาง (tail group) อาจจะเป็นกรดไขมันสายยาว (long-chain fatty acid) กรดไขมันไฮดร็อกซี (hydroxyl fatty acid) เป็นต้น เมื่ออยู่ในสารละลาย โมเลกุลแบบแอมฟิพาติกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะจับกับบริเวณพื้นผิวของตัวทำละลาย จากโครงสร้างดังกล่าวจึงทำให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนละลายได้ในน้ำหรือส่วนของน้ำละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารชำระล้าง (detergent) สารเกิดฟอง และการเกิดอิมัลชันโดยทั่วไป สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวที่สัมผัสกันได้ เช่น ระหว่างของแข็งกับของเหลว ของเหลวกับของเหลว และของเหลวกับก๊าซ ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของน้ำกับอากาศ เรียกว่า surface tension และค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับไฮโดรคาร์บอน เรียกว่า interfacial tension ค่าแรงตึงผิวที่เกิดขึ้นสามารถวัดได้และมีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ไดน์ (Dyne) เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นในตัวทำละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน ด้วยแรงจับกันของสารลดแรงตึงผิว (surfactant self-association) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันนี้ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดเรียกความเข้มข้น (critical micelle concentration; CMC) การเกิดไมเซลล์จะมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุดซีเอ็มซี (CMC) คือ ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีกถึงแม้จะมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย

1.2 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.2.1 ไกลโคไลปิด (glycolipid) ส่วนใหญ่จุลินทรีย์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้กลุ่มนี้ โครงสร้างประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่เป็นน้ำตาล เช่น น้ำตาลแรมโนส (rhamnose) ทรีฮาโลส (trehalose) ซูโครส (sucrose) และ กลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกับกรดแอลิฟาติกที่เป็นสายยาว (long chain aliphatic acid) หรือ กรดไฮดร็อกซี แอลิฟาติก (hydroxyaliphatic acid) สารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคไลปิดมีกลุ่มย่อย ได้แก่ แรมโนลิปิด (rhamnolipids) ทรีฮาโลลิปิด (trehalolipids) และโซโฟลิปิด (sophorolipids)

1.2.2 ไลโปเปปไทด์ (lipopeptide) สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โครงสร้างมีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์จุลินทรีย์กลุ่ม Bacillus สามารถผลิตได้มีคุณสมบัติการลดแรงตึงผิวและการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้ ได้แก่ เซอร์แฟกทีน (surfactin) อีทูริน (iturin) และเฟนจีซิน (fengycin) ซึ่งมีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกัน กล่าวคือ เซอร์แฟกทีนมีกรดอะมิโนชนิดแอลฟา 7 โมเลกุล เฟนจีซินจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นวงซึ่งมีคาร์บอน 14 ถึง 18 อะตอม ในขณะที่อีทูรินประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดเบต้า 7 โมเลกุลต่อกันเป็นวงและมีโมเลกุลของกรดไขมัน 14 ถึง 17 คาร์บอน

1.2.3 ฟอสโฟไลปิด กรดไขมัน และนิวทรัลไลปิด (phospholipids หรือ fatty acid และ neutral lipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดฟอสโฟลิปิด (phospholipids) มีโครงสร้างที่เกิดจากพันธะเอสเทอร์ขึ้นระหว่างหมู่แอลกอฮอล์ของลิปิดและฟอสเฟต โดยจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถ

ผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้ได้ เช่น *Aspergillus* spp. *Thiobacillusthiooxidans* *Arthrobacter* sp. AK-19 โดยมีการสะสมไขมันในโครงสร้างร้อยละ 40 ถึง 80

1.2.4 สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ริก (polymeric surfactant) เป็นสารที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวของหน่วยโพลีแซคคาไรด์กับโปรตีน (polysaccharide-protein) และหน่วยของกรดไขมันมีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ในธรรมชาติ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ คือ อิมัลชัน (emulsion) อะลาซาน (alasan) และไบโอดีสเพอแซน (biodispersan) เป็นต้น

1.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่นำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รองลงมาคือ ยีสต์และเชื้อราบางสายพันธุ์ โดยการผลิตจะใช้ความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยองค์ประกอบของวัตถุดิบที่เป็นผักผลไม้ โดยวัตถุดิบที่เป็นผักผลไม้เหลือใช้จากอุตสาหกรรมหรือจากการเกษตรสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง องค์ประกอบของวัตถุดิบผักผลไม้ที่มีทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส น้ำตาล และส่วนประกอบอื่นๆ จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายองค์ประกอบเหล่านี้ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เพื่อเจริญเติบโตและมีการสร้างสารเมตาบอไลต์ขึ้นระหว่างกระบวนการเจริญนี้ สารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์จะทำให้เกิดคุณสมบัติที่เป็นสารลดแรงตึงผิวโดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารทำความสะอาดชีวภาพ กลุ่มของแบคทีเรียได้แก่ *Bacillus* sp. *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* sp. *Pseudomonas* sp. *Pseudozyma* sp. และ *Micrococcus luteus* กลุ่มของเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger* *Penicillium* และ *Rhizopus* และ กลุ่มของยีสต์ ได้แก่ *Candida* sp. (Folmsbee et al., 2006) ในกลุ่มของแบคทีเรียจะมี บทบาทในการย่อยสลายวัสดุที่ใช้ในการผลิต ทำให้สารประกอบโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ให้เล็กลงได้ โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติก มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยแบคทีเรียจะมีการใช้น้ำตาลในผักผลไม้ หรือสารตั้งต้นโดยกระบวนการหมัก (fermentation) สภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (Banat et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการนำวัตถุดิบทางการเกษตร หรือส่วนประกอบในวัตถุดิบทางการเกษตรมาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต (ตารางที่ 1) ได้แก่ เปลือกส้ม แครอทเหลือทิ้ง เปลือกมะนาว น้ำมันมะพร้าว และกล้วย เป็นต้น กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดขึ้นด้วยกระบวนการหมักที่มี *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 เป็นจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กลุ่มแรมโนลิฟิด

ตารางที่ 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Substrate	Rhamnolipid Concentration (g/l)	Emulsification index (%)
Orange peelings	9.18	73.3
Carrot waste	5.71	30.12
Lime peeling	4.35	9.64
Coconut oil cake	2.17	50.10
Banana waste	2.10	48.19

ที่มา : Bhardwaj et al. (2013)

1.4 กลไกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อสารกำจัดศัตรูพืช

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Burkholderia cenocepacia* BSP3 มีผลต่อสารกำจัดศัตรูพืชกล่าวคือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มการละลายในสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ทำให้สามารถละลายได้ กลไกการลดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ด้วยคุณสมบัติที่สามารถรวมตัวกันเป็นโครงสร้างแบบไมเซลล์ (micellar solubilization) คือ เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเข้มข้นในระดับที่เกิดการจับรวมตัวเป็นโครงสร้างดังกล่าว โดยโครงสร้างนี้จะจับกับโครงสร้างของสารกำจัดศัตรูพืช กลายเป็นสารเอสเทอร์ (ester) ของกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) ที่สามารถละลายได้ดีในไขมัน จากนั้นโครงสร้างแบบไมเซลล์จะเปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบทรงกลม (spherical micelle) ซึ่งสารประกอบกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเหล่านี้จะถูกละลายอยู่ในโครงสร้างแบบทรงกลมนี้ที่จับแบบหันด้านที่ไม่ชอบน้ำเข้าจับกันแล้วรวมตัวกันทำให้สามารถละลายน้ำได้ (Ron and Rosenberg, 2001)

1.5 กลไกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเชื้อรา

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปลิพิด ที่มีโครงสร้างไขมันจับอยู่บนสายเปปไทด์โครงสร้างที่เป็นไขมันอยู่บนสายทำให้สามารถจับกับผนังเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งมีผนังเซลล์เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (chitin) จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ N-acetyl glucosamine มายึดเกาะกันด้วย β -1,4 glycosidic bond ลักษณะดังกล่าวนี้ไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ไปจับกับผนังเซลล์ของเชื้อราจะไปมีผลต่อกิจกรรมผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายหรือหยุดชะงักสามารถยับยั้งเชื้อรา

2. สมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน เช่น ไกลโคลิพิด ฟอสโฟลิพิด กรดไขมัน และ นิวทรัลลิพิด สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์ลิโปโปรตีน และลิโปเปปไทด์ ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละกลุ่มมีสมบัติและหน้าที่ที่หลากหลายแตกต่างกัน

2.1 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวัดค่าแรงตึงผิวเป็นวิธีการเบื้องต้น สำหรับการวัดกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยที่น้ำหนักจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะมีค่าแรงตึงผิวน้อยลงเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบผลของกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวค่อนข้างยาก ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์และสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกันทั้งชนิดและความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอช การให้อากาศ เป็นต้น (Banat et al., 2010)

กิจกรรมการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเกลือในส่วนของ aqueous phase ตัวอย่างเช่น สารไกลโคลิปิดจาก *Torulopsis apicola* ไม่สามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวได้เมื่อมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง ในขณะที่น้ำหนักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* JF-2 สามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวได้ เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ซึ่งให้ค่าที่ดีกว่าการเติมเกลือแคลเซียม (Folmsbee et al., 2006)

2.2 หน้าที่ทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่นั้นเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติที่สำคัญต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่ผลิตทั้งการนำสารเข้าสู่เซลล์หรือการปฏิสัมพันธ์กันระหว่างจุลินทรีย์และผู้ให้อาศัย (microbe-host interaction) หรือการเป็น biocide ซึ่งหน้าที่ดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องกับความเป็นสาร amphipathic ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การที่จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาจะทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการสลายเพิ่มขึ้น และมีการเกิดอิมัลชันเพิ่มขึ้น เพิ่มการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตบนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ง่าย โดยการลดแรงตึงผิวรอบๆบริเวณเซลล์ กระบวนการนำสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์นั้นโดยการทำให้สารประกอบเข้าสู่เซลล์และกระบวนการเกิดเมทาบอลิซึมได้ง่ายขึ้น

นอกจากนี้กระบวนการหรือหน้าที่ทางกายภาพอื่นๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ การมีสมบัติของการเป็นสาร antibiotic ต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรีย และเชื้อรา (Shekhar et al., 2015)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารที่เหมาะสมแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นพลังงานในกิจกรรมต่างๆ และใช้ผลิตสารตั้งต้นในกระบวนการสลายพลังงานเพื่อนำไปผลิตสารประกอบที่เซลล์ต้องการในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สูตรอาหารส่วนใหญ่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ นอกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วยังมีสภาวะอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศ เป็นต้น

3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

เป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แหล่งคาร์บอนที่ใช้มีทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ชนิดที่ละลายน้ำเช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอล และเอทานอล เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอลและเอทานอล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น *n*-alkanes และน้ำมันมะกอก แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตจึงมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอย่างมาก (Abouseoud et al., 2008)

3.1.1 แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ

Das และคณะ (2009) ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ กลีเซอรอล แป้ง กลูโคสและซูโครส ที่มีผลในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล คือ *B. circulans* พบว่า การใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุดในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 1.16 กรัมต่อลิตรและ 0.94 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนเดิม ยูเรีย ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

Hayder และคณะ (2014) ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ *Streptomyces* sp. SS20 ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ โซโลส แมนนิทอล กลูโคส มอลโตส ซูโครส กลีเซอรอล และแป้ง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. SS20 สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนทุกชนิดและเจริญได้ดีที่สุด 19 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Streptomyces* sp. SS20 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในทุกแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองและให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่สุดหลังจากการวัดที่เวลา 48 ชั่วโมงเมื่อใช้ซูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

Noparat และคณะ (2014) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Ochrobactrum anthropi* 2/3 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำได้ชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลทราย กลูโคส กลีเซอรอล กากน้ำตาล และกากดีแคนเตอร์ พบว่าการใช้กากดีแคนเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *O. anthropi* 2/3 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุด 4.25 กรัมต่อลิตร หลังจากเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

3.1.2 แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ

Fagade และคณะ (2009) ศึกษาการใช้ไขมันดิบ น้ำมันปาล์ม น้ำมันดีเซล และน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus* สปีชีส์ต่างๆ ได้แก่ *B. sphaericus* BS 01, *B. subtilis* BS 03, *B. sphaericus* BS 04, *B. subtilis* BS 58, *B. pumilus* BS 66, *B. licheniformis* BS 69, *B. subtilis* BS 73 และ *B. licheniformis* BS 102 ที่แยก

จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน โดยใช้อาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *B. sphaericus* BS 01, *B. subtilis* BS 03, *B. sphaericus* BS 04, *B. pumilus* BS 66, *B. licheniformis* BS 69, *B. subtilis* BS 73 และ *B. licheniformis* BS 102 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า E_{24} อยู่ที่ร้อยละ 30-55 และเชื้อ *B. subtilis* BS 58 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันดิบหรือน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า E_{24} เท่ากับร้อยละ 50

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน เติมนูเรียความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

Saimmai และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral salt medium ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำได้แก่ น้ำมันปาล์มใช้แล้ว น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว และน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. calcoaceticus* CT 03 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 0.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

Silva และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Pseudomonas* 5 สปีชีส์ ได้แก่ *P. cepacia*, *P. acidovorans*, *P. picketti* และ *P. fluorescens* เลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral medium โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันพืชใช้แล้วและของเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตร ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *P. cepacia* CCT6659 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ร่วมกับ corn steep liquor ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนร่วม โดยสามารถลดแรงตึงผิวจากอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 58 เป็น 27.57 มิลลินิวตันต่อเมตร และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 5.2 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง

ปัจจุบันมีการตระหนักถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีเพราะสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีสามารถทำลายสิ่งแวดล้อมได้ ถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่ถูกต้องและมีการนำสารลดแรงตึงผิวผิดประเภทมาใช้ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากแบคทีเรียเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมส่งผลให้มีความต้องการใช้เพิ่มมากขึ้นและอาจสามารถเข้ามาแทนที่สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีได้ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ด้วยเหตุนี้ผลของแหล่งคาร์บอนจึงเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยแบคทีเรีย ซึ่งการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ดีจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูง รวมถึงทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเศษเหลือจะทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง ซึ่งอาจจะช่วยให้สามารถแข่งขันกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีได้

3.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์

3.2.1 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen)

Gnanamani และคณะ (2010) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ beef extract, ยีสต์สกัดและเปปโตเน เดิมในอาหาร mineral medium ใช้น้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากน้ำทะเล ตะกอนป่าชายเลน หอยและทรายบริเวณชายหาดในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลต ESW Na12s สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นจาก 72 มิลลิวัตันต่อเมตร เหลือ 25 มิลลิวัตันต่อเมตร

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน คือ ยูเรีย, เคซีน ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน, beef extract, ยีสต์สกัด หรือเคซีนไฮโดรไลเซท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่มีกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิลิตรต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 750 มิลลิลิตรต่อลิตร

Chooklin และคณะ (2014) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ เนื้อวัวสกัด ยีสต์สกัด ยูเรีย ผงชูรส และเปปโตเน เดิมในอาหาร mineral medium ใช้ผงแป้งจากเมล็ดขนุนร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Deinococcus caeni* PO5 พบว่าเชื้อ *D. caeni* PO5 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสามารถตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 72 มิลลิวัตันต่อเมตร เหลือ 43 มิลลิวัตันต่อเมตร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.2 แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen)

Younis และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *Bacillus subtilis* KO เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่ต่างกัน คือ $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NaNO_3 , NH_4Cl หรือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก พบว่าเชื้อ *B. subtilis* KO ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 7.41 กรัมต่อลิตรเมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Apama และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus clausii* 5B ที่แยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม เลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาล

กลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ยีสต์สกัด, เปปโตน, NH_4Cl , ยูเรียหรือ NH_4NO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อ *B. clausii* 5B สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 2.41 กรัมต่อลิตร เมื่อเติม NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนและสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 53.56 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 29.48 มิลลินิวตันต่อเมตร

Saimmai และคณะ (2013) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 และ $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 ปรับพีเอชเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเติม NaNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุดจาก 71.08 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 44.64 มิลลินิวตันต่อเมตร และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ 1.91 กรัมต่อลิตร

3.3 แร่ธาตุ (mineral source)

ปกติจะมีการเติมแร่ธาตุลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการสร้างหรือเป็นองค์ประกอบของสารที่จำเป็นในการดำรงชีวิต แร่ธาตุสำคัญ เช่น ซัลเฟตและฟอสเฟต จุลินทรีย์ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน แร่ธาตุนอกจากจะเป็นปัจจัยที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโตแล้วยังมีผลในการยับยั้งหรือกระตุ้นการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

Wei และคณะ (2007) ศึกษาผลของการใช้แร่ธาตุ 5 ชนิดเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ K^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} และ Ca^{2+} ต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ NH_4NO_3 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็นอาหารที่มีแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด ทำการทดสอบผลของแร่ธาตุแต่ละตัวต่อการผลิต surfactin โดยไม่เติมแร่ธาตุที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม K^+ เชื้อมีการเจริญและการผลิต surfactin จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม Mg^{2+} เชื้อจะไม่ผลิต surfactin เลยแสดงว่า Mg^{2+} และ K^+ ส่งผลต่อการผลิตอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นศึกษาปริมาณและอัตราส่วนระหว่างแร่ธาตุทั้งสองต่อการผลิต surfactin พบว่าเมื่อใช้ปริมาณและอัตราส่วนของ Mg^{2+} ต่อ K^+ 3:1 เชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 สามารถผลิต surfactin เพิ่มขึ้นสองเท่า แสดงว่าปริมาณ Mg^{2+} ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อควรเป็น 3 เท่าของปริมาณ K^+ ขณะเดียวกันเมื่อดูผลของอัตราส่วนที่เท่ากันของ Mg^{2+} และ K^+ เช่นที่อัตราส่วน 1:1, 2:2, 3:3 จะให้ผลผลิตต่างกันแสดงว่าปริมาณเป็นตัวแปรสำคัญในการผลิต surfactin โดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 เช่นกัน

3.4 พีเอช (pH)

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึม และการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลกระทบจากค่าพีเอช โดยทั่วไปค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ราและยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่มีค่าเป็นกลาง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน และไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรืออัลคาไลน์อื่นๆ ออกมาทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงขึ้น (Park and Lee, 1998; Nagal and Jain, 2010) แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (Zhao et al., 2009) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์

Najafia และคณะ (2010) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus mycoide* ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่พีเอชในช่วง 5-9 และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่พีเอช 7.37 สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดที่ 34 มิลลินิวตันต่อเมตร

El-sersy (2012) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* N10 เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่พีเอช 5-9 ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* N10 เจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7 โดยให้ค่า EA สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 86 แต่เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 6 พบว่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวจะลดลงอย่างรวดเร็ว

3.5 อุณหภูมิ (temperature)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน ถ้าจุลินทรีย์เจริญในอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเจริญได้เร็วและอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย เชื้อ *Bacillus subtilis* N10 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า EA มากกว่าร้อยละ 80 (El-sersy, 2012) เป็นต้น

Abushady และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต surfactin จาก *Bacillus subtilis* BBk 1 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียสตามลำดับ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิต surfactin สูงสุดเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ผลผลิต surfactin ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึง 55 องศาเซลเซียสเชื้อจะไม่มีการผลิต surfactin

Gogotov และ Miroshnikov (2009) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* VKM B-511

ที่เลี้ยงในอาหาร mineral medium ใช้ kerosene ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักและ NaNO_3 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรและให้ค่าความสามารถในการคงตัวของอิมัลชันเท่ากับ ร้อยละ 41

3.6 การกวนและการให้อากาศ (agitation and aeration)

การกวนและการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอยสามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น (Desai and Banat, 1997) ส่วนการกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ช่วยลดขนาดของฟองอากาศให้เล็กลงทำให้มีผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับจุลินทรีย์มากขึ้น

Yeh และคณะ (2006) ศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ NH_4NO_3 เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าการกวนที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่ระดับ 1.5 vvm อัตราการผลิต surfactin สูงสุดที่ระดับ 190 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Fonseca และคณะ (2007) ศึกษาผลของการกวนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาลทราย ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ NH_4NO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เขย่าด้วยความเร็วรอบต่างกัน คือ 50, 150 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 และ 150 รอบต่อนาที กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 66 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 39-40 มิลลินิวตันต่อเมตร แต่เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นเป็น 250 รอบต่อนาที สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้นจาก 66 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงมาอยู่ที่ 35 มิลลินิวตันต่อเมตร

4. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จาก 2 กระบวนการผลิต คือ กระบวนการหมักโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ และกระบวนการเปลี่ยนรูปแบบทางชีวภาพ (biotransformation) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยทั่วไปมักจะมีค่าความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นกระบวนการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิว (downstream process) จะเป็นขั้นตอนที่มีค่าใช้จ่ายมากที่สุดของกระบวนการผลิตบางครั้งอาจสูงถึงประมาณร้อยละ 60 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด

การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักจะให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ตัวอย่างเช่น การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Corynebacter lepus* ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะให้ผลผลิตร้อยละ 20-25 ปัจจัยที่สำคัญในการสูญเสียผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม ถ้าเก็บเกี่ยวได้ผลผลิตร้อยละ 30-50 จะสามารถลดค่าใช้จ่ายสองหรือสามเท่าของต้นทุนทั้งหมด (Kosaric, 2001) ดังนั้นการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ จึงจำเป็นต้อง

พิจารณาถึงราคา ความคุ้มค่า และความเหมาะสมกับลักษณะงานที่ต้องนำไปใช้ต่อไป เนื่องจากจุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวออกมาในความเข้มข้นที่ไม่สูงมากนัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีหลายปัจจัยซึ่งจะมีผลต่อต้นทุนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ เช่น ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จากการหมัก ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือน้ำหมัก (pH, viscosity และ complexity) ลักษณะของผลิตภัณฑ์ (น้ำหนักโมเลกุลความสามารถในการละลายประจุสารที่อยู่ภายในเซลล์ หรือ หลั่งออกมานอกเซลล์) ผลผลิตที่ได้จากการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ และความง่ายในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ต้นทุนในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวสามารถลดลงโดยเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์

วิธีส่วนใหญ่ที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกรณีที่เป็นการเก็บเกี่ยวแบบกะ (batch recovery) เช่น ตกตะกอนด้วยกรด (acid precipitation) สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction) การตกผลึก (crystallization) ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) วิธีการเก็บเกี่ยวเหล่านี้สามารถนำคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ประโยชน์ เช่น surface activity หรือ ความสามารถในการเกิดไมเซลล์ หรือ vesicles

โดยปกติการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายที่ใช้ประกอบด้วย chloroform-methanol และ dichloromethane-methanol, butanol, ethyl acetate, pentane และ hexane

Trehalose lipid ผลิตได้หลายชนิดจาก *Mycobacterium* spp. และ *Arthrobacter paraffineus* trehalose corynomycolates และ tetraesters ผลิตจาก *Rhodococcus erythropolis*, mono-, di และ penta-saccharide lipids ของ *A. paraffineus* และ *N.corynebacterioids*, cellobiose lipids ผลิตจาก *Ustilago* spp., sophorolipid จากยีสต์หลายชนิด, liposan จาก *Candida lipolytica* และ rhamnolipids ของ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เก็บเกี่ยวโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Kosaric, 2001)

สำหรับการสกัดไกลโคลิปิดที่ผลิตจาก *Torulopsis bombicola* (Cooper and Paddock, (1984) *Torulopsis petrophilum* (Cooper et al., 1983) และ *Torulopsis apicola* (Hommel et al., 1987) เป็นการสกัดด้วย ethyl acetate โดยการแช่เย็นหลังจากการดูดซับบนถ่าน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* จะมีการเก็บเกี่ยวในลักษณะที่คล้ายกัน ยกเว้นการสกัดจะใช้ acetone ไกลโคลิปิดที่ผลิตโดย *Ustilago maydis* (Hewald et al., 2005) และ mannosylerythritol lipid ผลิตจาก *Candida* spp. (Bhardwaj et al., 2013) เป็นตะกอนที่มีน้ำมันมาก เมื่อปั่นเหวี่ยงแล้วจึงต้องสกัดในอีเทอร์ เอทานอล หรือเมทานอลต่อไป

ไกลโคลิปิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Ustilago zae* จะมีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีการตกตะกอนด้วยกรด (acid precipitation) ที่อุณหภูมิต่ำ ไกลโคลิปิดจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และแรมโนลิปิดจาก *P. aeruginosa* และ *Candida lipolytica* จะมีการเก็บเกี่ยวด้วยวิธี acidification โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล เมื่อไม่นานมานี้มีการสกัด cell-bound ของ bioemulsifier จาก *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ใน buffer ที่ประกอบด้วย potassium metabisulfite โดยการตกตะกอนโดยใช้เอทานอล-อะซิติก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บ่มข้ามคืน (Desai and Banat, 1997)

5. คุณสมบัติและการประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้โครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา

5.1 เพิ่มพื้นที่ผิวสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำต่ำแบบคิที่เรียที่เจริญในบริเวณที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอนมีการเจริญแบบจำกัดเนื่องจากแรงตึงระหว่างผิวของน้ำและน้ำมัน (Banat et al., 2010) ซึ่งในระบบเปิด เช่น แหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนคราบไขมัน มีจำนวนของจุลินทรีย์ไม่เพียงพอต่อการอิมัลซิไฟด์น้ำมันให้มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ไขมันที่ถูกอิมัลซิไฟด์ที่กระจายอยู่ในน้ำก็ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวซึ่งมีสมบัติเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันจึงมีความจำเป็นในการย่อยสลายคราบไขมันที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของน้ำมันโดยการทำให้เกิดอิมัลชัน ทำให้เซลล์สัมผัสกับน้ำมันแล้วนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดียิ่งขึ้น (Ron and Rosenberg, 2001)

5.2 เพิ่ม bioavailability ของสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ เหตุผลหลักที่ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนย่อยสลายได้ยาก คือ มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ และถูกดูดซับอยู่ในพื้นผิว เช่น ถูกดูดซับในดิน จึงทำให้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนนำสารดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ยาก (Ron and Rosenberg, 2001) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อในสารตั้งต้นที่ถูกดูดซับโดยการชะสารออกจากพื้นผิวหรือเพิ่มความสามารถการละลายน้ำของสารดังกล่าว (Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

5.3 กำจัดโลหะหนัก สาร rhamnolipid มีความสามารถในการกำจัดแคดเมียม, ตะกั่ว และสังกะสีจากดิน (Wang and Mulligan, 2009) ซึ่งกลไกในการกำจัดโลหะหนักของ rhamnolipid คือ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ rhamnolipid และแคดเมียม และการทำปฏิกิริยาของ rhamnolipid ต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้โพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดโพลีเมอร์สามารถจับกับโลหะหนักและทำให้เกิดการตกตะกอนของโลหะหนัก เช่น การจับกับยูเรเนียมของ emulsan จาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Uzoigwe et al., 2015)

5.4 บทบาทของอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีต่อฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักรวมสูงหรืออิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถถ่ายทอดสู่จุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ พบว่า alasan จาก *Acinetobacter radioresistens* KA53 สามารถจับกับพื้นผิวเซลล์ของเชื้อ *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 และ *A. calcoaceticus* RAG-1 และเปลี่ยนแปลงพื้นผิวเซลล์ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งการถ่ายทอดดังกล่าวเกิดขึ้นหลังจากบ่มเซลล์ผู้รับกับอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ นอกจากนี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. radioresistens* KA53 ร่วมกับ *A. calcoaceticus* RAG-1 พบว่า alasan หลังออกมาจาก *A. radioresistens* KA53 แล้วจับกับเซลล์ผู้รับ คือเชื้อ *A. calcoaceticus* RAG-1 (Osterreicher-Ravid et al., 2000) การถ่ายทอดอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพของแบคทีเรียจากสายพันธุ์

หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่งแสดงให้เห็นถึงการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ การรวมกลุ่ม และการเกิดฟิล์มชีวภาพ (Ron and Rosenberg, 2001)

5.5 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์ส่วนใหญ่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ลิโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวน ได้แก่ polymyxins ที่ผลิตจาก *Bacillus polymyxa* (Balaji et al., 2011), gramicidins ที่ผลิตจาก *Bacillus brevis* (Abraham et al., 2014), circulocins ที่ผลิตจาก *Bacillus circulans* J2154 ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีรวมถึงแบคทีเรียที่ทนต่อสารยาปฏิชีวนะ (He et al., 2001) และ iturin A ที่ผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ที่มีความสามารถในการเป็นสารควบคุมจุลินทรีย์ทางชีวภาพ ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และเชื้อราก่อโรคในพืชได้ (Yu et al., 2002)

Folman และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตสารต้านเชื้อราในแตงกวาจากเชื้อ *Lysobacter enzymogenes* 3.1T8 พบว่าสารดังกล่าวคือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ซึ่งทำให้เกิดโรคยอดและรากเน่าในแตงกวาจากการทดลองพบว่าสาละละลายส่วนใสจากเชื้อ *L. enzymogenes* 3.1T8 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อทดสอบบนอาหาร R2A หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

Joshi และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* 20B ซึ่งแยกจากอาหารหมักในประเทศอินเดีย พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporium*, *Alternaria burnsii*, *Cryosporium indicum* และ *Rhizoctonia bataticola* หลังจากการเลี้ยงเชื้อร่วมกันในบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้โดยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นชนิด ลิโปเปปไทด์

Mukherjee และคณะ (2009) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ crude biosurfactant และ purified biosurfactant ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus circulans* โดยใช้วิธี agar well diffusion พบว่า crude และ purified biosurfactant ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*Micrococcus flavus*, *Bacillus pumilis*, *Mycobacterium smegmatis*) และแกรมลบ (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas* sp.) รวมทั้งเชื้อรา (*Aspergillus niger*, *A. flavus*) และยีสต์บางสายพันธุ์ (*Candida albicans*) ด้วย แต่ purified biosurfactant สามารถยับยั้งได้ดีกว่า

Kim และคณะ (2010) ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* CMB32 ซึ่งแยกได้จากดิน พบว่าสารลดแรงตึงผิวดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคแอนแทรกคโนส (anthracnose disease) ในพริก บลูเบอร์รี่ มะม่วง และธัญพืชบางชนิด จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีโดยวิธี Matrix-assisted laser

desorption/ionization (MALDI-TOF) พบว่า สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ 3 ชนิด ได้แก่ iturin A, fengycin และ surfactin

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

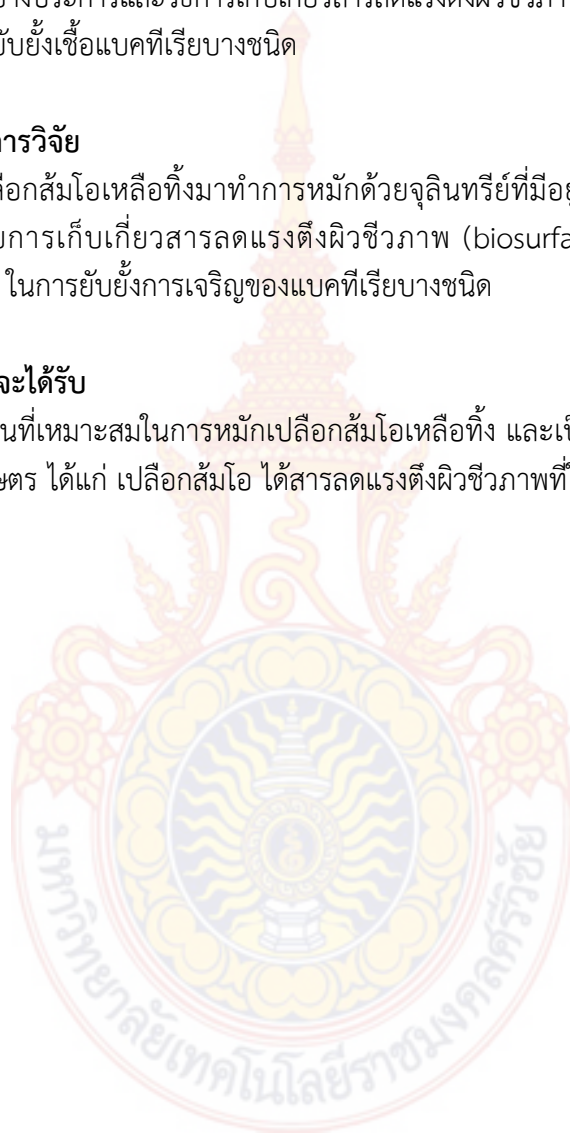
1. เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการหมัก
2. เพื่อศึกษาสมบัติบางประการและวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอ
3. เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การนำเปลือกส้มโอเหลือทิ้งมาทำการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ด้วยอัตราส่วนต่างๆ และทดสอบการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ที่ได้จากการทดลอง และมีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้อัตราส่วนที่เหมาะสมในการหมักเปลือกส้มโอเหลือทิ้ง และเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกส้มโอ ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้ทดแทนสารเคมี



บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างเปลือกส้มโอ

เก็บตัวอย่างส้มโอเหลืองทิ้ง เปลือกส้มโอจากสวนส้มโอทับทิมสยาม อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช รวบรวมส้มโอเหลืองทิ้งมาล้าง ให้ได้ขนาด 2-3 เซนติเมตร แล้วนำไปหมักตามอัตราส่วนที่กำหนด แล้วนำเข้าสู่ขั้นตอนกระบวนการหมัก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยมีชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ (Joshi et al., 2008)

2. การวัดค่าพีเอช

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตรวจวัดค่าพีเอชของสารละลายส่วนใสโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

3. การวัดค่าแรงตึงผิวโดยเครื่อง Ring tensiometer

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในกระจกนาฬิกา วางบนแท่นวาง จุ่มหลอดทองคำขาวลงไปในสารละลายแล้วค่อยๆ ดึงหลอดขึ้น จนถึงรอยต่อระหว่างของเหลวและอากาศ (liquid-air layer interface) ค่าแรงตึงผิวที่ทำให้หลอดแยกออกจากของเหลวเป็นค่าแรงตึงผิวของของเหลวที่วัดได้มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (Bodour and Maier, 1998)

4. การทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชันด้วยวิธี Emulsification activity

เติมน้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 2 นาที แล้วทิ้งไว้ 10 นาที คำนวณหาค่า emulsification activity (EA) (Cooper and Goldenberg, 1987)

$$EA = \frac{\text{ความสูงของ emulsion ที่เกิดขึ้น} \times 100}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}}$$

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

งานวิจัยนี้ได้เลือกวัสดุพิเศษเหลือทางการเกษตร ซึ่งได้แก่ เปลือกส้มโอเหลือทิ้ง จากเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอทับทิมสยามจาก อ. ปากพั่น จ. นครศรีธรรมราช โดยแบ่งการหมักเปลือกส้มโอกับน้ำเป็นสี่อัตราส่วนดังนี้คือ 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ โดยทุกอัตราส่วนจะเติมน้ำตาลความเข้มข้น 2 % (w/v) ซึ่งการเตรียมน้ำหมักในแต่ละอัตราส่วนจะเตรียมในปริมาณ 6 ลิตร (ตารางที่ 1) แล้วหมักในสภาวะปิดและไม่มีการเขย่า (standing close system fermentation) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้มโอ

อัตราส่วน	ปริมาณเปลือกส้มโอ (กิโลกรัม)	ปริมาณน้ำ(กิโลกรัม)
1:1	3	3
1:2	2	4
1:3	1.5	4.5
1:4	1.2	4.8

โดยทำการเก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักสำหรับการวิเคราะห์จะเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72) หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในสัปดาห์ที่ 1 2 3 และในเดือนที่ 1 2 3

2. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการหมักในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอในอัตราส่วนต่างๆเมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมจากนั้นนำมาทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดยนำอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำการหมักเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72) หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในสัปดาห์ที่ 1 2 3 และในเดือนที่ 1 2 และ 3 โดยจะทำการวัดค่า Emulsification activity (EA), Emulsification index (EI) และ Surface tension reduction (SR) เพื่อทำการเปรียบเทียบ

3. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ

3.1 ตกตะกอนด้วยอะซีโตน

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการหมักเปลือกส้มโอนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยอะซีโตนในอัตราส่วน 1:3 ทั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระเหยอะซีโตน วิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่า EA EI และ SR

3.2 ตกตะกอนด้วยเมทานอล

นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระเหยเมทานอล (ดัดแปลงจาก Saimmai et al., 2012)

3.3 ตกตะกอนด้วยเอทานอล

นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระเหยเอทานอล (ดัดแปลงจาก Saimmai et al., 2012)

3.4 ตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช

นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช โดยใช้ 6 M HCl ปรับพีเอชเป็น 2.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นเก็บตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน นำไปล้างด้วย 100 mM HCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 178,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอช เป็น 7.0 ด้วย 2 N NaOH และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization (ดัดแปลงจาก Saimmai et al., 2012)

3.5 สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำสารละลายส่วนใสสกัด 2 ครั้งด้วย chloroform:methanol ในอัตราส่วน 2:1 (ดัดแปลงจาก Saimmai et al., 2012) โดยใช้กรวยแยก (separation funnel) นำชั้นของตัวทำละลายกำจัดน้ำโดยการเติม anhydrous Na_2SO_4 แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในเครื่อง evaporator

3.6 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 40 ถึง 60 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือโดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 ดาลตัน ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิล-เซลลูโลสและทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization (ดัดแปลงจาก Saimmai et al., 2012)

จากวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 6 วิธี เลือกวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเปรียบเทียบค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์ 1 กรัมต่อลิตร โดยเลือกวิธีการเก็บเกี่ยวที่ให้กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์สูงที่สุดเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

4. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

4.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของสารละลายที่ได้ด้วย 1N HCl หรือ 1 N NaOH ให้มีค่าพีเอช เท่ากับ 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ แล้ววัดกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.2 ความคงตัวของอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากจากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุด ละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและบ่มที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น

4.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากจากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุด ละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เติม NaCl ให้มีความเข้มข้นที่ร้อยละ 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 ตามลำดับ หรือ CaCl_2 หรือ MgCl_2 ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 โดยน้ำหนักตามลำดับ แล้ววัดกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

5.1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ของสารลดแรงตึงผิว ชีวภาพจากเปลือกส้มโอด้วยวิธี Broth Dilution Method

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella sp.* ซีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. เชื้อโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth (MHB) โดยเลือก single colony บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ 180 rpm เป็นเวลา 18-24 ชม. นำมาตกตะกอนเซลล์ โดย centrifuge ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วทำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบด้วย 0.85% NaCl เจือจางเทียบความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No.4 (จำนวนเซลล์ประมาณ 3×10^8 cfu/ml) แล้วเจือจางต่อ ด้วย 0.85% NaCl จนได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^6 - 10^7 cfu/ml นำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาตรวจนับจำนวนโคโลนี โดยเกลี่ยบนอาหาร Plate Count agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. แล้ว คำนวณจำนวนโคโลนีเป็น cfu/ml

6. การเตรียมน้ำหมักจากเปลือกส้มโอ อัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อใช้ทดสอบ

ดูดส่วนใสของน้ำหมักจากเปลือกส้มโออัตราส่วนที่เหมาะสมมา Centrifuge ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว รอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนและเก็บส่วนใสไว้ทดสอบ โดยนำส่วนใสมาผสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) แบ่งหลอดทดลองออกเป็น 12 หลอด โดย หลอดที่ 1 เป็นอาหาร MHB (Positive Control) หลอดที่ 2 เป็นน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นร้อยละ 100 (Negative Control) ส่วนหลอดที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 เป็นอาหาร MHB ผสมน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นร้อยละ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 และ 0.08 ตามลำดับ ปิเปิดเชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตรแต่ละชนิดลงในชุดการทดลอง

ที่ 1-12 บ่มเชื้อ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น หากชุดการทดลองใดไม่พบความขุ่น แสดงว่า หลอดทดลองนั้น ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จะเป็นความเข้มข้นที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) จากนั้นนำหลอดทดลองที่ไม่พบความขุ่นไปนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate บน อาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) หากหลอดทดลองใดที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ จะพบ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 20 โคโลนี จะเป็นความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 99 (Minimal Bactericidal Concentration; MBC)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

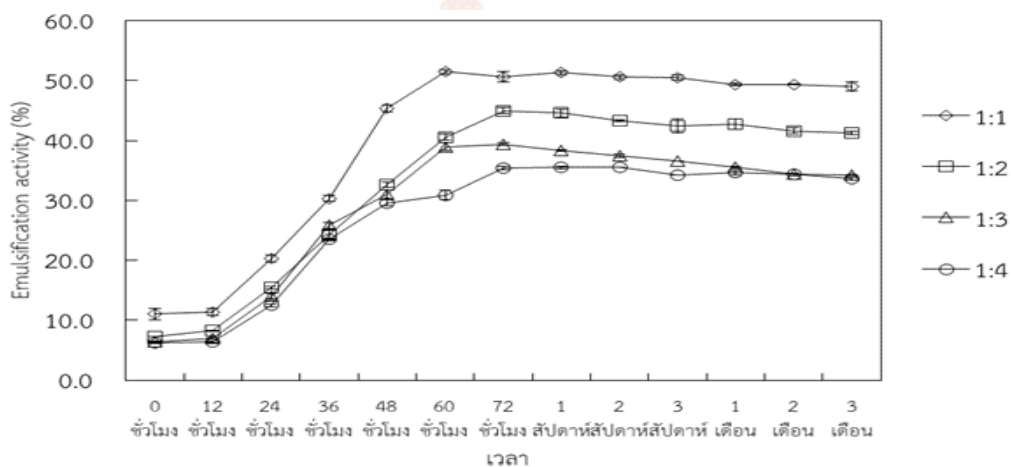
ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป R (<https://cran.rproject.org/bin/windows/base/>) SPSS version 3.5.0 (He et al., 2001) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทาง สถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งคำนวณหาค่าความถี่ร้อยละ และค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ

ในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะวัดจากความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) ของน้ำหมักจากเปลือกส้มโอในอัตราส่วนต่างๆ ที่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน สูงสุดคือ น้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่อัตราส่วน 1:1 มีค่าการเกิดอิมัลชันเท่ากับร้อยละ 51.64 ตามลำดับ ดังรูปที่ 1

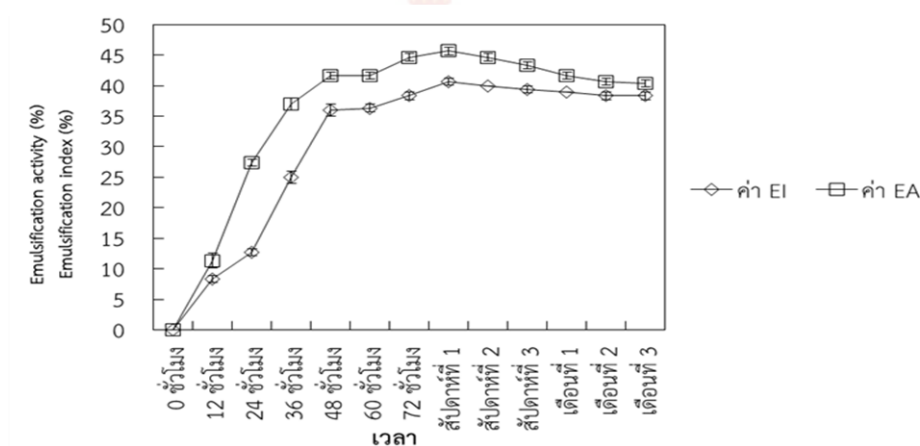


ภาพที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดอิมัลชัน กับระยะเวลาการหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้มโอ อัตราส่วนต่างๆ

จากรูปที่ 1 เมื่อวัดกิจกรรมการเกิดอิมัลชันของทั้ง 4 อัตราส่วนในการหมักเปลือกส้มโอ พบว่าอัตราส่วน 1:1 มีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันสูงสุดคือร้อยละ 51.64 รองลงมาคือ อัตราส่วน 1:2 มีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันร้อยละ 50.32 และอัตราส่วน 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ จากการหมักเปลือกส้มโอทั้ง 4 อัตราส่วน นั้นมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันที่ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนในการหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีศักยภาพจะนำไปใช้ทางการค้าได้ควรมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากกว่าร้อยละ 50 (Willumsen and Karlson, 1997) จากการทดลองในครั้งนี้ อัตราส่วนในการหมักเปลือกส้มโอที่ 1:1 ที่มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มมากกว่าร้อยละ 50 มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากที่สุด (ร้อยละ 51.64) ค่าการอิมัลซิไฟด์เออร์ของสารละลายส่วนใสจากการหมักเปลือกส้มโอแสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอไปประยุกต์ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทางการค้าได้ จากผลการทดลองจึงเลือกน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่อัตราส่วน 1:1 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของการหมักเปลือกส้มโออัตราส่วน 1:1

นำส่วนใสที่ได้จากการหมักมาตรวจวัดค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน จากการทดลองพบว่ามีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการหมักและมีแนวโน้มปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักโดยปริมาณสูงสุดที่เวลาในการหมัก 1 สัปดาห์ ด้วยความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยการวัดค่า EA และ EI พบว่าจะเริ่มผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและปลดปล่อยออกสู่น้ำหมักเมื่อเริ่มเข้าสู่การหมักใน ชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก และมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 1 สัปดาห์โดยมีค่า EA และ EI เท่ากับ ร้อยละ 45.67 และ 40.50 ตามลำดับ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอในอัตราส่วน 1:1

3. การศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอ

หลังจากการหมักเปลือกส้มโอ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กำจัดตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสที่ได้มาศึกษาการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยการปรับค่าพีเอชแอมโมเนียมซัลเฟต อะซีโตน เมทานอล เอทานอล และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (chloroform:methanol, 2:1) จากวิธีการเก็บเกี่ยวทั้ง 6 วิธี พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ

Recovery method	Yield (g/L)	EA (%)	EI (%)	SR (mN/m)
Acid precipitation	2.87±0.015 ^b	56.03±0.69 ^c	23.67±0.57 ^c	30.66±0.95 ^d
Acetone precipitation	1.96±0.023 ^c	57.73±0.72 ^c	25.26±0.92 ^c	30.92±0.63 ^d
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	1.95±0.042 ^c	58.39±0.20 ^c	25.12±0.83 ^c	32.64±0.56 ^c
MeOH precipitation	2.07±0.025 ^b	60.05±0.93 ^b	38.25±0.73 ^b	38.86±0.69 ^b
EtOH precipitation	2.10±0.042 ^b	61.09±0.93 ^b	41.32±0.79 ^a	37.59±0.92 ^b
CH ₃ Cl:MeOH extraction	3.15±0.045 ^a	65.46±0.59 ^a	41.63±0.60 ^a	40.78±0.49 ^a

*Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

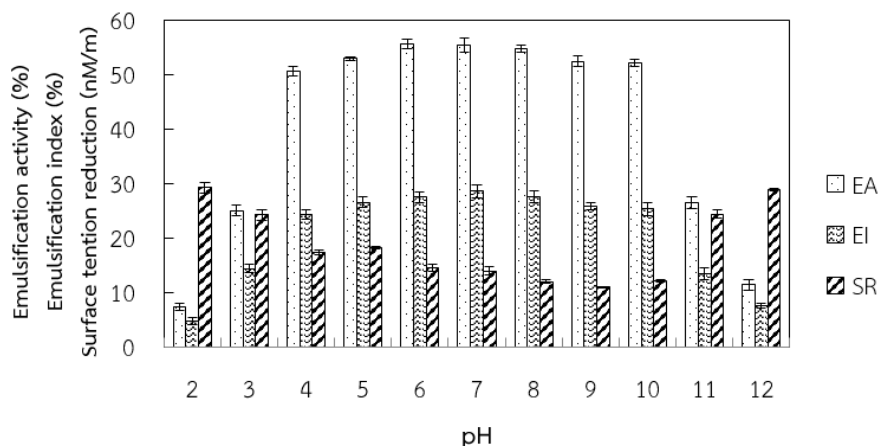
**Different letters in the same column indicate significant differences (p<0.05)

จากการทดลองพบว่าการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการสกัดโดยใช้สารละลายอินทรีย์ (chloroform:methanol, 2:1) มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดสามารถเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวได้ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร สูงที่สุดที่ร้อยละ 65.46 และ 41.63 สำหรับค่า EA และ EI ตามลำดับ และมีค่าความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 40.78 (mN/m)

5. คุณสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอ

5.1 การศึกษาความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่าง ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

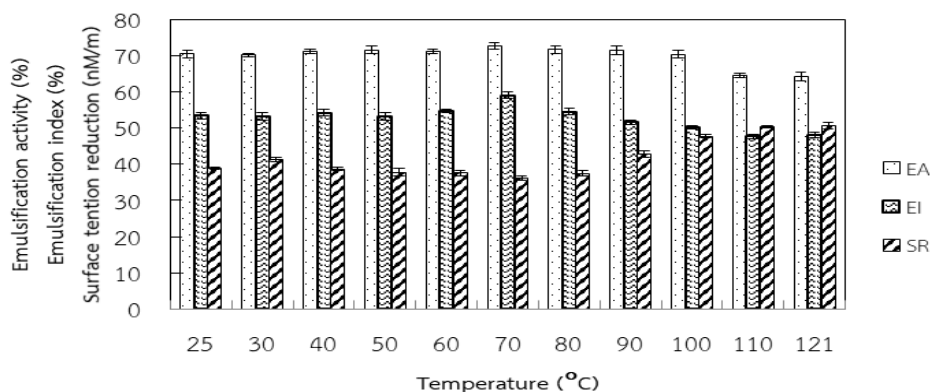
นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอละลายในน้ำกลั่นที่ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 2.0-12.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน จากการทดลองแสดงดังภาพที่ 7 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอจะเกิดกิจกรรมอิมัลซิไฟด์ช่วงพีเอชตั้งแต่ 4 ถึง 10 ซึ่งมีค่าการอิมัลซิไฟด์ในช่วงร้อยละ 50.65-52.22 และ 24.31-25.32 ของค่า EA และ EI ตามลำดับ เมื่อปรับพีเอชให้ลดลงต่ำกว่า 4 หรือมากกว่า 11 จะทำให้กิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ลดลงอย่างมากเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดการตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรดสูงและด่างสูง (Sutthivanitchakul *et al.*, 1999) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Vaz *et al.* (2012) ที่พบว่าค่าการอิมัลซิไฟด์ของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* มีค่าคงที่ในช่วงพีเอช 5.0-10.0 และลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 เนื่องจากสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพบางส่วนตกตะกอน ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่หมักจากเปลือกส้มโอ

5.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอ ละลายในน้ำกลั่นที่ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งไว้ให้อุณหภูมิกลับลงมาที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4

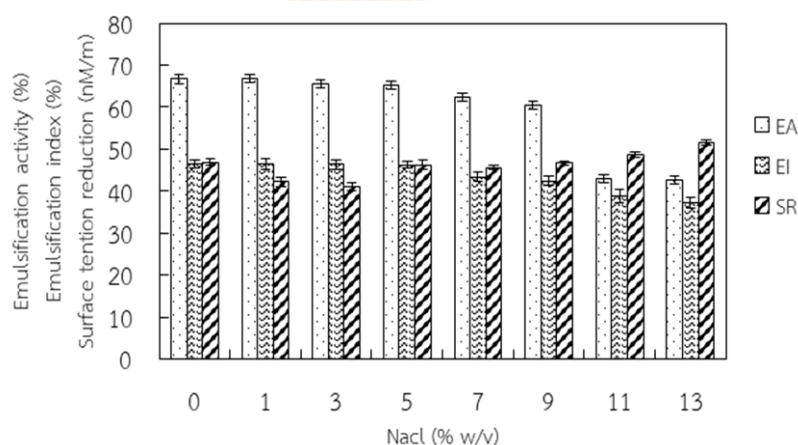


ภาพที่ 4 ผลของระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิในช่วง 25-121 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ซึ่งเห็นได้จากค่า EA และ EI ที่ค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วงร้อยละ 64.30-72.62 และ 47.66-59.05 ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษา Wang *et al.* (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* strain JA-1 พบว่าสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 4-100 องศาเซลเซียส โดยมีค่า EI อยู่ในช่วงร้อยละ 72-75

5.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

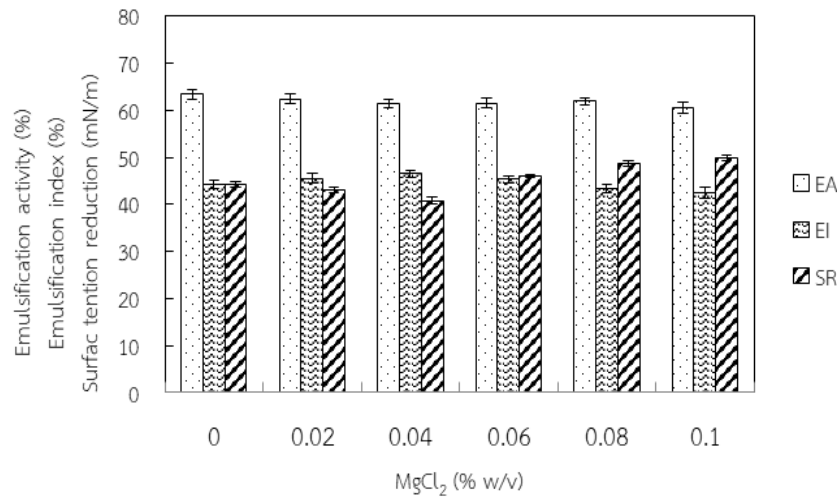
ในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดคราบไขมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเล โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำทะเลอาจมีผลต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นจึงต้องศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอพบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1-9 โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 60-66 และ 42-46 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มากกว่าร้อยละ 9 โดยน้ำหนัก กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์เออร์จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 5) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพลดลง จากรายงานของ Thimon *et al.* (1992) ไอออนของเกลือจะมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากไอออนของเกลือจะจับหมู่คาร์บอกซิลิกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



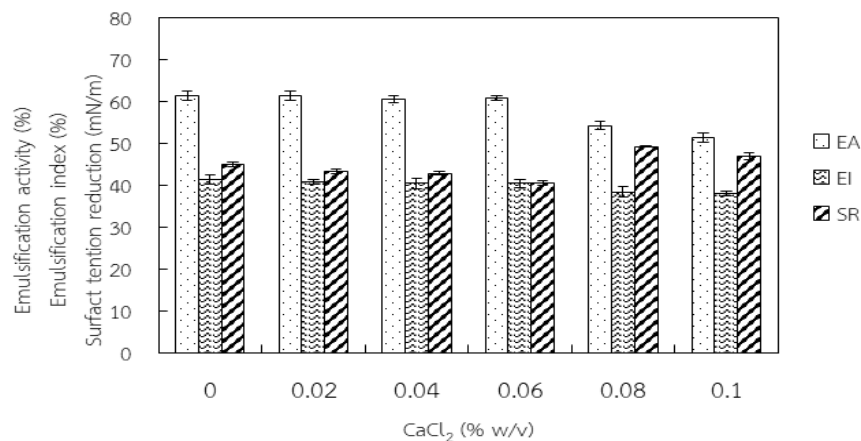
ภาพที่ 5 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอ

ภาพที่ 6 แสดงผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอ แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 60-63 และ 42-46 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ และจากศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอ พบว่าที่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.06 โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ (ภาพที่ 11) โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 60-62 และ 40-41 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 0.06 ความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Myroidessp. SM1* ซึ่งแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Myroidessp. SM1* มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-9 โดยน้ำหนักและการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้เพียงเล็กน้อย แต่การเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4-18 มิลลิโมลทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูญเสียกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน



ภาพที่ 6 ผลของเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเปลือกส้มโอ



ภาพที่ 7 ผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเปลือกส้มโอ

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการหมักเปลือกส้มโอในการยับยั้งแบคทีเรีย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักจากเปลือกส้มโอในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี Broth Dilution Method พบว่าน้ำหมักจากเปลือกส้มโอมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* *Salmonella sp.* *S. aureus* และ *B. cereus* เท่ากับ 23, 24, 5.25 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์พบว่า น้ำหมักจากเปลือกส้มโอสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *Salmonella sp.*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*) เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ที่มีความบางกว่าแบคทีเรียแกรมบวกที่มีชั้นเปปติโดไกลแคนหนาถึง 20-80 นาโนเมตร จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวสามารถเข้าทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนค่าความต่ำสุด (MBC) ที่สามารถทำลายเชื้อ *E. coli* *Salmonella sp.* *S. aureus* และ *B. cereus* คือ 55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรังที่ให้การสนับสนุนทุนสนับสนุนในการวิจัย อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย



บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สำหรับ Emulsification activity (EA), Emulsification index (EI) และ Surface tension reduction (SR) ตามลำดับ จากการศึกษาวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอพบว่าการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform:methanol ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตรสามารถเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีค่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูงสุดโดยมีค่า EA และ EI ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรเท่ากับร้อยละ 81 และ 60 ตามลำดับ สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 1.85 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้พบว่ามีน้ำหนักตัว ในช่วงพีเอช 4-10 อุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียส โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์ในช่วงร้อยละ 72-81 และ 53-60 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 9 โดยพบว่าค่าการอิมัลซิไฟด์สูงกว่าร้อยละ 77 และ 56 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ มีความคงตัวต่อแมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 และ 0-0.06 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการประชาสัมพันธ์ถึงประโยชน์และข้อดีของการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชจากธรรมชาติ เพื่อให้การใช้ประโยชน์จากสารชีวภาพเป็นที่รู้จักและแพร่หลายมากยิ่งขึ้น



เอกสารอ้างอิง

- Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 223:143-151.
- Abraham T., Prenner E.J., Lewis R.N., Mant C.T., Keller S., Hodges R.S., McElhane R.N. (2014). Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1838:1420-1429.
- Abushady H.M., Bashandy A.S., Aziz N.H., Ibrahim H.M.M. (2005). Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. *Int. J. Agri. Biol.* 7:337-344.
- Aparna A., Srinikethan G., Smitha H. (2012). Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloid. Surface. B*. 95:23-29.
- Balaji V., Jeremiah S.S., Baliga P.R. (2011). Polymyxins: antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. *Indian. J. Med. Microbiol.* 29:230-242.
- Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 87:427-444.
- Bhardwaj G., Cameotra S.S., Chopra H.K. (2013). Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. *AMB. Express*. 21:68.
- Bodour A.A., Maier R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* 32:273-280.
- Chooklin C.C., Petmeaun S., Maneerat S., Saimmai A. (2014). Isolation and characterization of a biosurfactant from *Deinococcus caeni* PO5 by using jackfruit seed powder as a substrate. *Ann. Microbiol.* 64:1007-1020
- Cooper D.G., Goldenberg B.G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:224-229.
- Cooper D.G., Paddock D.A. (1983). *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1426-1429.
- Cooper D.G., Paddock D.A. (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ.* 47:173-176.

- Das P., Mukherjee S., Sen R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Biores. Technol.* 100:1015-1019.
- Desai J.D., Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:47-64.
- El-sersy N.A. (2012). Plackett-Burman design to optimize biosurfactant production by marine *Bacillus subtilis* N10. *Rom. Biotechnol. Lett.* 17:7049-7064.
- Fagade O.E., Okolie B.I. Balogun S. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources on biosurfactant producing *Bacillus* species isolates. *Nig. J. Microbiol.* 23:1915-1921.
- Folman L.B., Postma J., van Veen J.A. (2003). Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. *Microbiol. Res.* 158:107-15.
- Folmsbee M., Duncan K., Han S.O., Nagle D., Jennings E., McInerney M. (2006). Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojaviensis* strain JF-2. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:645-649.
- Fonseca R.R., Silva A.J.R., de Franca F.P., Cardoso V.L., Servulo E.F.C. (2007). Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 471:136-140.
- Ghribi D., Ellouze-Chaabouni S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnol Res Int* doi:10.4061/2011/653654.
- Gnanamani A., Kavitha V., Radhakrishnan N., Mandal A.B. (2010). Bioremediation of crude oil contamination using microbial surface-active agents: isolation, production and characterization. *J. Bioremed. Biodegrad.* 1:107-115.
- Gogotov I.N., Miroshnikov A.I. (2009). The influence of growth medium composition and physicochemical factors on biosurfactant production by the bacterium *Bacillus licheniformis* VKM B-511. *Appl. Biochem. Microbiol.* 45:588-592.
- Hayder N.H., Alaa S., Abdulmalik H. (2014). Optimized conditions for bioemulsifier production by local *Streptomyces* sp. SS 20 isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Rom. Biotechnol. Lett.* 19:8979-8993.
- He H., Shen B., Korshalla J., Carter G.T. (2001). Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus curculans* J2154. *Tetrahedron.* 57:1189-1195.
- Joshi S., Bharucha C., Desai A.J. (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Biores. Technol.* 99:4603-4608.

- Kim P.I., Ryu J., Kim Y.H., Chi Y.T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:138-145.
- Kosaric N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food. Technol. Biotechnol.* 39:295-304.
- Lang S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* 7:12-20.
- Mukherjee S., Das P., Sivapathasekaran C., Sen R. (2009). Antimicrobial biosurfactant from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:281-288.
- Nagal S., Jain P.C. (2010). Production of feather hydrolysate by *Elizabethkingia meningoseptica* KB042 MTCC 8360 in submerged fermentation. *Indian. J. Microbiol.* 50:S41-S45.
- Najafia A.R., Rahimpoura M.R., Jahanmiria A.H., Roostaazadb R., Arabianb D., Ghobadib Z. (2010). Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *J. Chem. Eng.* 163:188-194.
- Noparat P., Maneerat S., Saimmai A. (2014). Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 30:865-877.
- Osterreicher-Ravid D., Ron E.Z., Rosenberg E. (2000). Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. *Environ. Microbiol.* 2:366-372.
- Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12:633-654.
- Park C.B., Lee S.B. (1998). Ammonia production from yeast extract and its effect on growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 3:115-118.
- Ron E.Z., Rosenberg E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3:229-236.
- Saimmai A., Rukadee O., Onlamool T., Sobhon V., Maneerat S. (2012). Characterization and phylogenetic analysis of microbial surface active compounds-producing bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168:1003-1018.

- Saimmai A., Udomsilp S., Maneerat S. (2013). Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium of *Acinetobacter calcoaceticus* CT 03 grown on low-cost raw materials. *Ann. Microbiol.* 63:1327-1339.
- Shekhar S., Sundaramanickam A., Balasubramanian T. (2015). Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45:DOI:10.1080/10643389.2014.955631.
- Silva N.M.P., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. (2014). Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3:132-139.
- Singer M.E., Tyler S.M., Finnerty W.R. (1985). Growth of *Acinetobacter* sp. strain HO1-N on *n*-hexadecanol:physiological and ultrastructural characteristics. *J. Bacteriol.* 162:162-169.
- Sutthivanitchakul, B., Thaniyavorn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* F2.2. **Thai Journal of Biotechnology** 1: 46-53.
- Thimon, L., Peypoux, F. and Michel, G. 1992. Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis* with inorganic cations. **Bioresource technology Letter** 14: 713-718.
- Uzoigwe C., Burgess J.G., Ennis C.J., Rahman P.K. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front. Microbiol.* 6:245.
- Vaz D.A., Gudinab E.J., Alameda E.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloid. Surf.* 89:167-174.
- Wang J., Ji G., Tian J., Zhang H., Dong H., Yu L. (2011). Functional characterization of a biosurfactant-producing thermo-tolerant bacteria isolated from an oil reservoir. *Pet. Sci.* 8:353-356.
- Wang S.L., Mulligan C.N. (2009). Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. *Process. Biochem.* 44:296-301.
- Wei Y.H., Lai C.C., Chang J.S. (2007). Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Proc. Biochem.* 42:40-45.

- Willumsen, P.A. and Karlson, U. 1997. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation** 7: 415-423.
- Yeh M.S., Wei Y.H., Chang J.S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Proc. Biochem.* 41:1799-1805.
- Younis M.A.M., Hezayen F.F., Nour-Eldein M.A., Shabeb M.S.A. (2010). Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *American-Eurasian. J. Agricul. Environ. Sci.* 7:31-37.
- Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L., Bertagnolli B.L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil. Biol. Biochem.* 34:955-963.
- Zhao Z., Wong J.W. (2009). Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Technol.* 30:291-299.

