บทที่ 4

สรุป

เชื้อ *B. subtilis* MUV4 ที่เลี้ยงในอาหาร Modified Mckeen Medium ในระดับขวดเขย่า ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1.0%(w/v) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ 0.652 mg/mL ลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 53.50 เป็น 33.50 mN/m ในเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง มีผลผลิตของเซลล์ต่อสับสเตรต (Yx/s) เป็น 0.713 ผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวต่อสับสเตรต (Yp/s) เป็น 0.072 และผลผลิจของสารลดแรงตึงผิวต่อเซลล์ (Yp/x) เป็น 0.101 และเมื่อเลี้ยงในระดับถังหมักพบว่าเชื้อ *B. subtilis* MUV4 นั้นสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีในสภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ และไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง โดยค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 96 เป็น 35.00 mN/m และผลิตสารลดแรงตึงผิวได้เป็น 0.30 g/L

เมื่อทดลองเลี้ยง *B. subtilis* MUV4 ในอาหาร Modified Mckeen Medium ปริมาตร 23.60 ลิตร สามารถให้สารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวเป็น 9.54 กรัม และเมื่อละลายด้วยเมธานอลแล้วได้สารสกัดหยาบในเมธานอล 4.50 กรัม ซึ่งส่วนสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 41.00 mN/m และส่วนสกัดหยาบเมธานอลให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 38.50 mN/m จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบเมธานอลแยกด้วยวิธี adsorption column chromatography แบบ normal phase ด้วยตัวเคลื่อนที่คือคลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ (65:15:1) ถึงเมธานอล:น้ำ (100:1) แยกสารได้ทั้งหมด 6 fraction

นำส่วนย่อย F4 มาทดลองแยกสารให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี adsorption column chromatography แบบ normal phase ด้วยตัวเคลื่อนที่คือคลอโรฟอร์ม:เมธานอล (90:10) ถึงเมธานอล (100) แยกสารได้ทั้งหมด 5 fraction และแยกส่วนย่อย F5 ด้วยวิธี adsorption column chromatography แบบ normal phase เช่นกัน ด้วยตัวเคลื่อนที่คือคลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ (65:25:4) ถึงเมธานอล:น้ำ (100:4)แยกสารได้ทั้งหมด 2 fraction เมื่อคัดเลือกส่วนย่อยจากการแยกทั้งหมดที่มีน้ำหนักมากเพียงพอ ได้แก่ F2, F3 และ F6 จากการแยกครั้งที่หนึ่ง ส่วนย่อย F4-C และ F5-B จากการแยกครั้งที่สอง มาทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวพบว่าส่วนย่อย F5-B และ F6 ให้ค่าแรงตึงผิวดีคือ 30.5 และ 35.2 mN/m ตามลำดับ และนำ F5-B มาแยกต่อด้วยวิธี preparative TLC ให้ส่วนย่อยที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวเพียง 1 ส่วนเท่านั้น คือ ส่วนย่อย S3 ซึ่งมีค่า CMC เป็น 200 mg/L ที่ให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 34.70 mN/m

เมื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้น พบว่า ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีความคงตัวที่พีเอช 6-12 ให้

ค่าแรงตึงผิว 35.00-37.50 mN/m ส่วนสกัดหยาบคงตัวที่พีเอช 7-10 มีค่าแรงตึงผิวช่วง 35.17-35.33 mN/m และส่วนสกัดหยาบเมธานอลคงตัวต่อพีเอช 4-10 มีค่าแรงตึงผิวช่วง 32.33-33.50 mN/m ผลของพีเอชต่อความคงตัวของอิมัลชั่นพิจารณาได้จากค่า emulsion index (E24) พบว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนสกัดหยาบ และส่วนสกัดหยาบเมธานอลให้ค่า E24 ที่พีเอช 7 เป็น 66.67% 33.33% และ 33.33% ตามลำดับ ผลของความคงตัวต่ออุณหภูมิ ส่วนใสมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง (30±2°C) และ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่าแรงตึงผิวเป็น 35.00 mN/m และส่วนสกัดหยาบมีความคงตัวที่อุณหภูมิเดียวกับส่วนใส โดยให้ค่าแรงตึงผิวในช่วง 34.50-35.00 mN/m แต่ส่วนใสและส่วนสกัดหยาบไม่คงตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีความคงตัวต่ออุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง, 50 และ 100 องศาเซลเซียสได้ดี มีค่าแรงตึงผิวช่วง 33.67-34.83 mN/m แต่อุณหภูมิมีผลต่อความคงตัวของการเกิดอิมัลชั่น โดยส่วนใสมีความคงตัวของอิมัลชั่นที่อุณหภูมิห้องให้ค่า E24 เป็น 66.67% ส่วนสกัดหยาบ และส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีอิมัลชั่นคงตัวที่ 4 องศาเซลเซียส ให้ค่า E24 เป็น 50.00% ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมสารลดแรงตึงผิว ส่วนใส มีค่าแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 32.00-33.50 mN/m และส่วนสกัดหยาบมีค่าแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 30.50-30.67 mN/m เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3-10%w/v แต่ส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีค่าแรงตึงผิวเป็น 30.50 mN/m เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5-20%w/v โดยความเข้มข้นของเกลือที่มากกว่า 5%w/v ส่งผลให้สูญเสียความคงตัวของอิมัลชั่นในทุกตัวอย่าง

สำหรับการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าส่วนย่อย F4-C สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC11778 ได้ที่ระดับ MIC 37.5 µg/mL ซึ่งการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเป็นแบบ Bacteriocidal นั่นคือสามารถทำลายเซลล์จุลินทรีย์จนไม่สามารถทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ และทุกส่วนย่อยไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 และ *S. aureus* ATCC25923 ได้

การใช้สารลดแรงตึงผิวในการละลายสาร naphthalene และ phenanthrene พบว่า ส่วนสกัดหยาบเมธานอลสามารถละลาย naphthalene และ phenanthrene ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ส่วนย่อย F6 และ F5-B ตามลำดับ ในขณะที่การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวในการเก็บเกี่ยวน้ำมันด้วยวิธี sand pack column พบว่าส่วนสกัดหยาบเมธานอล สามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบได้ 41.85% และสามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันก๊าดได้ 75.00% และเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวในการเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบร่วมกับกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปนั้นปริมาณสาร saturated hydrocarbon ลดลง 96.63% เมื่อเลี้ยงไป 7 วัน ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นลดลงเพียง 19.96%

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาขั้นตอนการแยกสารให้บริสุทธิ์ ควรแยกสารโดยใช้ตัวเคลื่อนที่จากไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน และเพิ่มขั้วของตัวทำละลายให้มากขึ้น เช่น คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม:เมธานอล และ เมธานอล เป็นต้น และทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวควบคู่กันไป จากนั้นนำเฉพาะส่วนที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวมาแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. สารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* MUV4 ที่เป็นส่วนสกัดหยาบ และส่วนสกัดหยาบเมธานอลนั้นมีค่าแรงตึงผิวและเกิดอิมัลชั่นได้ดี จึงเหมาะต่อการนำไปใช้ในเรื่องการย่อยสลายน้ำมันดิบ เพราะส่วนสกัดหยาบและส่วนสกัดหยาบเมธานอลจะช่วยลดค่าแรงตึงผิวระหว่างชั้นน้ำและน้ำมันดิบได้ และทำให้น้ำมันดิบเกิดเป็นอิมัลชั่นจุลินทรีย์จึงนำไปใช้ได้ง่าย ทำให้มีการย่อยสลายเกิดขึ้น

3. เนื่องจากสารลดแรงตึงที่ได้จาก *B. subtilis* MUV4 ที่แยกด้วย adsorption chromatography นั้นเป็นสารที่เป็น hydrophilic ค่อนข้างสูง และมีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวเรื่องลดค่าแรงตึงได้ดีกว่าการเกิดอิมัลชั่น จึงเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในด้านการลดแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวตัวอย่างเช่น oil/water หรือ soil/oil และช่วยเพิ่มการละลายของสารที่เป็น hydrophobic สูงๆ ได้ดีกว่า เช่น PAHs

4. ส่วนย่อยจากการแยกด้วย adsorption chromatography มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค หากทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น อาจจะได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่านี้ได้