บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การผลิตสารลดแรงตึงผิว

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Modified Mckeen Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 2.5% ในขวดเขย่า ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *B. subtilis* MUV4 มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ และเข้าสู่ช่วง log phase ในชั่วโมงที่ 6 และเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 (ภาพที่ 5) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 10.15 g/L ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตของเซลล์ต่อสับสเตรตเป็น 0.94 ดังแสดงในตารางที่ 3 และเมื่อนำน้ำหมักมา (supernatant) ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว พบว่า น้ำหมักเริ่มต้นมีค่าแรงตึงผิวเป็น 54.00 mN/m และลดลงเป็น 33.07 mN/m ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.96

การศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิว ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการทดลองได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.5% พบว่าระดับน้ำตาลที่ 1.0% ให้ค่าของแรงตึงผิวดีที่สุด โดยลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 53.50 เป็น 33.5 mN/m ในเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 6) ค่าจลนพลศาสตร์ของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสแสดงในตารางที่ 3 และการเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง และกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 1.0% ให้ผลดังภาพที่ 7 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง และมีผลผลิตของเซลล์ต่อสับสเตรต (Yx/s) เป็น 0.713 และมีผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเซลล์ (Yp/x) เป็น 0.101 ในขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 0.5 % มีค่าผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อสับสเตรต (Yp/s) เป็น 0.110 และแม้จะมีค่า Yp/s สูงกว่าระดับน้ำตาลกลูโคส 1.0% แต่ให้ค่าผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเซลล์ (Yp/x) ที่ต่ำกว่า นั่นคือ มีค่าเท่ากับ 0.077 หมายความว่ามีการเกิดสารลดแรงตึงผิวเปรียบเทียบกับการเจริญของเซลล์เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 0.5% น้อยกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส 1.0% ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 1.0% ใช้ในการทดลองต่อไป

B. subtilis C9 สามารถผลิตสารลิโปเปปไทด์ได้ 7 g/L โดยให้ค่า Yp/s เป็น 0.175 g BS/g glucose ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเป็น 8.0 ค่าแรงตึงผิวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้เป็น 28.5 mN/m (Kim *et al*., 1997)

Makkar และ Cameotra (1997) ได้เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* MTCC2423 ซึ่งเป็นเชื้อที่ชอบอุณหภูมิสูง สามารถผลิตสารลิโปเปปไทด์ได้ 0.744 g/L ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้จาก 68 mN/m เป็น 28 mN/m ในขณะที่ *B. subtilis* MTCC1427 สามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้จาก 68 mN/m เป็น 34 mN/m เมื่อเลี้ยงในสภาวะและอาหารชนิดเดียวกัน เต่ถ้าใช้แป้ง2%เป็นแหล่งคาร์บอนค่าแรงตึงผิวที่ได้เป็น 32 mN/m (Makkar & Cameotra, 1998)

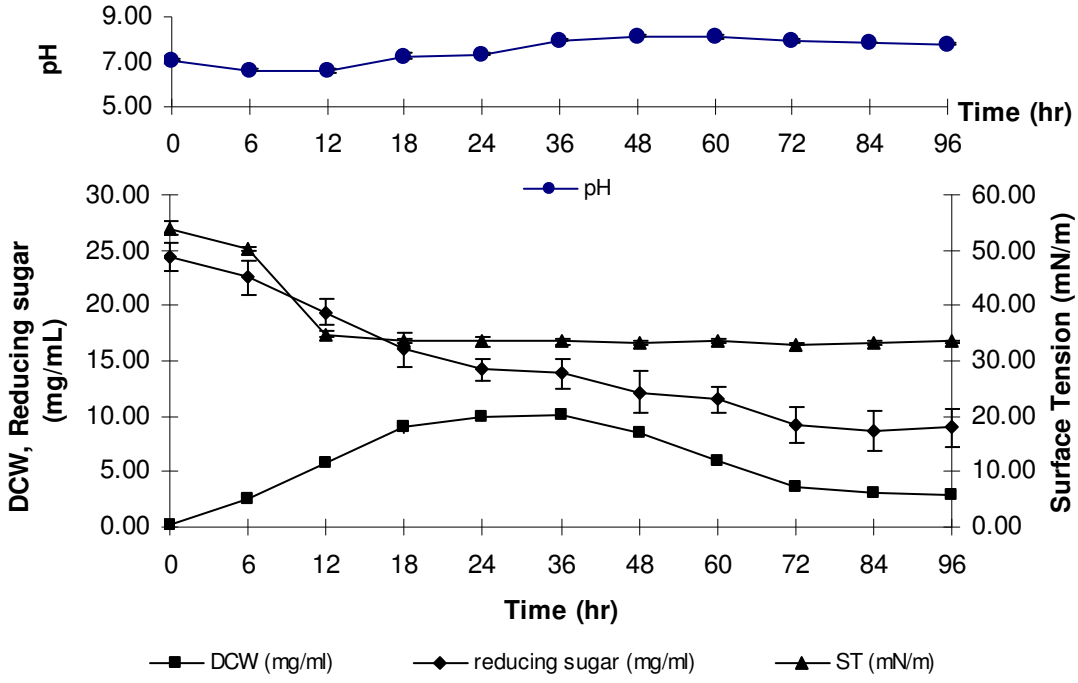
สำหรับ *Bacillus* sp. strain KP-2 ผลิตสารลิโปเปปไทด์ได้ 35 mg/L และสามารถลดค่าแรงตึงผิวเป็น 35 mN/m เมื่อเลี้ยงในอาหาร defined medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อที่ได้นั้นแยกได้จากอาหารหมัก (Roongsawang *et al*., 1999) และ *B. subtilis* BKK-1 นั้น สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวลิโปเปปไทด์ได้ภายใน 24 ชั่วโมง ในอาหาร LB medium และลดค่าแรงตึงผิวได้จาก 50 mN/m เป็น 28 mN/m (Roonsawang *et al*., 2003)

Lee และคณะ (2006) ได้แยกเชื้อจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบและtributyrin ($C_{4;0}$) เมื่อศึกษาลักษณะของเชื้อแล้วพบว่าเป็นเชื้อ *B. subtilis* A8-8 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดยลดค่าแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m เป็น 26 mN/m น้ำหนักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้คิดเป็น 30 mg/L ในอาหาร M9 มีน้ำมันดิบ 2% เป็นแหล่งคาร์บอน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

การผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *B. subtilis* MUV4 ทั้งในขวดเขย่าและในถังหมักที่มี working volume 1 ลิตร นั้นเป็นแบบ non-growth associated คือผลิตขึ้นเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase ซึ่งตรงกับการทดลองของ Davis และคณะ (1999) ซึ่งพบว่า เชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 สามารถผลิตสาร surfactin ได้ เมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 g/L เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium nitrate 4 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลผลิตของ surfactin ต่อ biomass (Yp/x) เป็น 0.0068 และผลผลิตของ biomass ต่อ น้ำตาลกลูโคส (Yx/s) เป็น 0.46

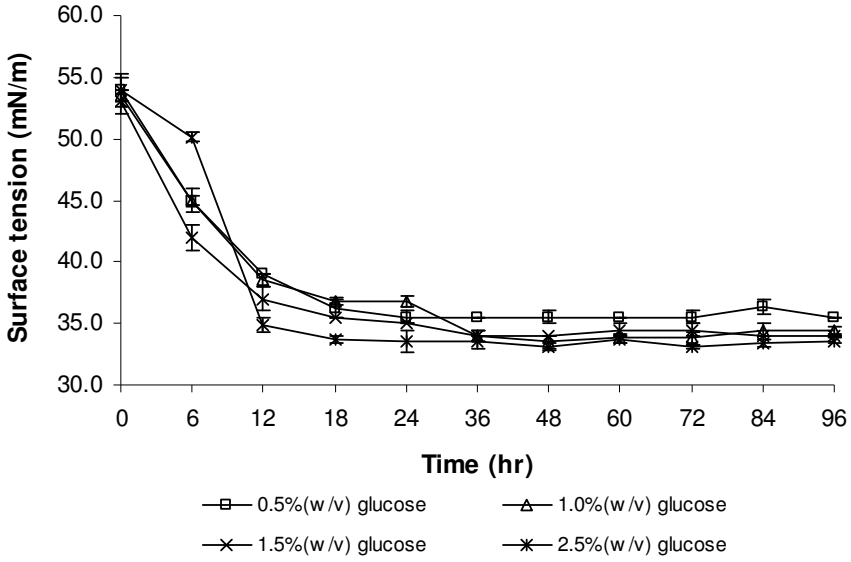
การทดลองของ Besson และ Michel (1992) พบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตสาร surfactin ได้ ในช่วงปลายของ log phase ให้ผลผลิตสูงสุดเป็น 700 μg/mL ในขณะที่มีการผลิตสาร iturin ในช่วงกลางของ stationary phase ให้ผลผลิตสูงสุดเป็น 70 μg/mL ซึ่งตรงกับการทดลองของ Kluge และคณะ (1988) และ Lee และคณะ (2006)

Vater (1986) กล่าวว่าสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. เกิดจากการเหนี่ยวนำของเซลล์ซึ่งปลดปล่อยสารที่จำเป็นออกมาหนึ่งหรือมากกว่าในระบบ และสาร surfactin ก็เกิดจากการถูกเหนี่ยวนำของเซลล์ที่เจริญในช่วงปลายของ log phase



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2.5%(w/v) ในระดับขวดเขย่า

Figure 5. Growth, residual sugar and surface tension activity of *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen Medium with 2.5%(w/v) glucose in shaked-flask condition.



ภาพที่ 6 ผลของกลูโคสต่อค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium ในระดับขวดเขย่า

Figure 6. Effect of glucose on the surface tension of supernatant of *Bacillus subtilis* MUV4 cultivated in Mckeen Medium in shaked-flask condition.

ตารางที่ 3 ค่าจลนพลศาสตร์ของ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium ที่มีน้ำตาลกลูโคสต่างๆกัน

Table 3. Kinetics of *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen Medium with different glucose concentrations.

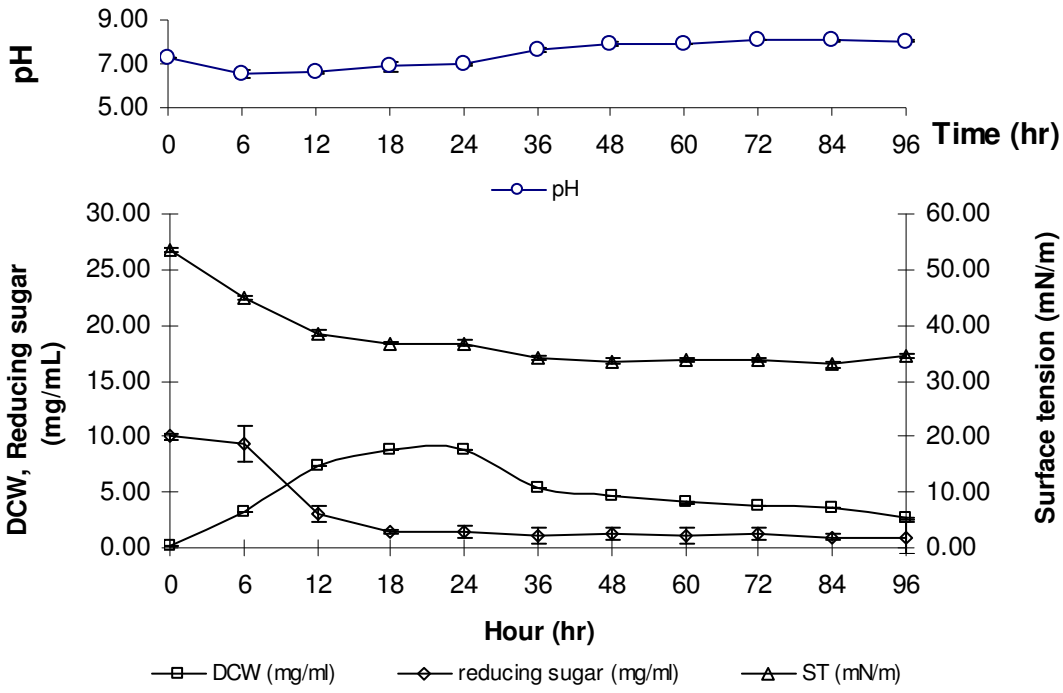
%w/v glucose	product(mg/ml)	Yp/s	Yx/s	Yp/x	Specific growth rate* (μ) (h^{-1})
0.5	0.436	0.110	1.413	0.077	0.14
1.0	0.652	0.072	0.713	0.101	0.14
1.5	0.778	0.059	0.697	0.085	0.11
2.5	0.332	0.022	0.941	0.023	0.11

*specific growth rate (μ) (h^{-1}) = $\frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$

X_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

X_0= ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

t = เวลา (ชั่วโมง)



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1.0%(w/v) ในระดับขวดเขย่า

Figure 7. Growth, residual sugar and surface tension activity of *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen Medium with 1.0%(w/v) glucose in shaked-flask condition.

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ *B. subtilis* MUV4 ในอาหาร modified Mckeen medium ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 1.0% ในถังหมักขนาด 2 ลิตร มี working volume เท่ากับ 1 ลิตร และให้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เปรียบเทียบผลของการให้อากาศปริมาตร 1.0 vvm และไม่ให้อากาศ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 8 พบว่าการให้อากาศส่งเสริมการเจริญ โดยเซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และให้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 และ 60 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 9.88 mg/mL แต่น้ำหมักไม่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวเลย โดยในการเลี้ยงเริ่มต้นน้ำหมักมีค่าแรงตึงผิว 54.7 mN/m และที่ 96 ชั่วโมงมีค่าแรงตึงผิวเป็น 60.0 mN/m และการให้อากาศ 0.5 vvm เชื้อ *B. subtilis* MUV4 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ให้ปริมาณเซลล์เป็น 8.02 mg/mL และน้ำหมักไม่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว โดยค่าแรงตึงผิวในชั่วโมงที่ 0 เป็น 55.67 mN/m และมีค่าแรงตึงผิวไม่คงที่ตลอดระยะเวลาการผลิต และในชั่วโมงที่ 96 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 54.17 mN/mในขณะที่การเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* MUV4 ในถังหมัก แต่ไม่มีการให้อากาศนั้น มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพขึ้นในถังหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase แล้ว โดยเป็นช่วงที่มีปริมาณเซลล์สูงสุดด้วยเช่นกัน ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.22 g/L ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้ต่ำสุดเกิดขึ้นที่ชั่วโมงที่ 96 เป็น 35.0 mN/m (ภาพที่ 9) ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้หลังจากผ่านการทำแห้งด้วยวิธี freeze-dry คิดเป็น 0.3 g/L ดังนั้นการผลิตสารลดแรงตึงผิวในระดับถังหมัก การให้อากาศมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *B. subtilis* MUV4 จึงไม่ให้อากาศในการผลิตในระดับถังหมัก

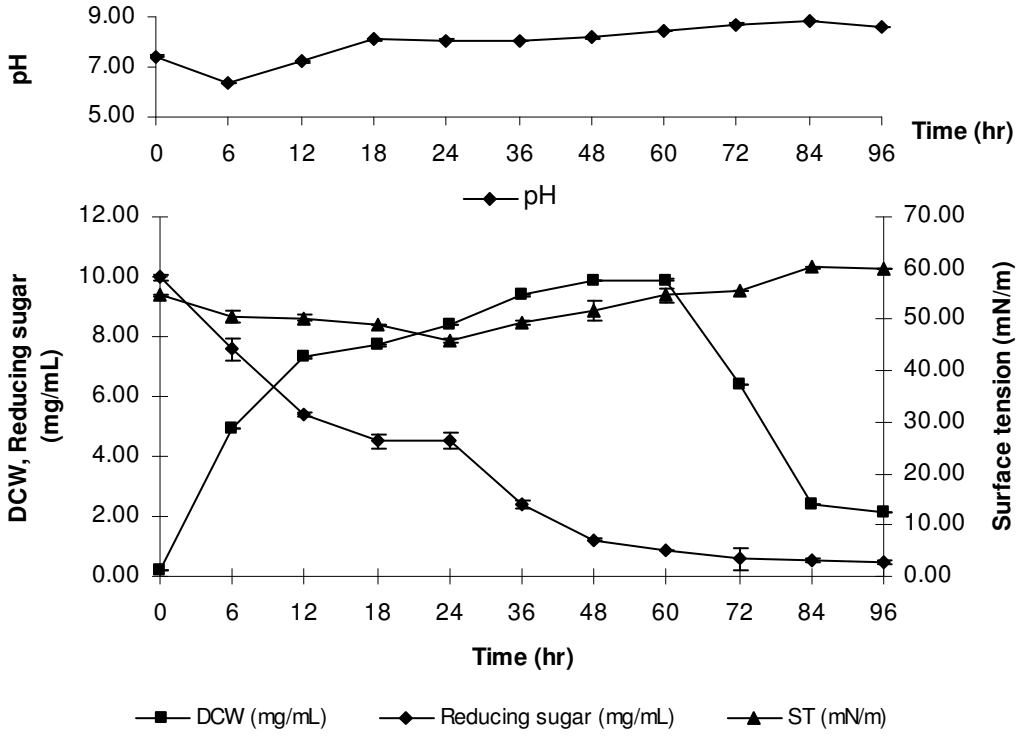
สำหรับการผลิตในถังหมักที่มีการให้อากาศ 1.0, 0.5 vvm และไม่มีการให้อากาศนั้นพบว่าการให้อากาศที่มากเกินไปนั้นยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่นเดียวกับการทดลองของ Kim และคณะ (1997) ที่พบว่า เชื้อ *B. subtilis* C9 ที่เลี้ยงในถังหมักที่มี working volume 1.5 ลิตร มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และคุมความเป็นกรด-ด่างที่ 6.8 มีการผลิตสารลิโปเปปไทด์ออกมาในปริมาณที่แตกต่างกัน นั่นคือ เมื่อให้อากาศ 1.0 vvm จะให้สารลดแรงตึงผิว 1.3 g/L ในขณะที่การให้อากาศ 0.1 vvm จะสามารถผลิตสารได้มากถึง 4.5 g/L

ในขณะที่การทดลองของ Lin และคณะ (1994) ได้รายงานว่าเชื้อ *Bacillus lichenisformis* JF-2 นั้นไม่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ในสภาวะไม่ให้อากาศ แต่หากมีการให้อากาศที่มีค่า %dissolved oxygen (DO) เท่ากับ 30% จะให้ค่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่สูงกว่าการให้อากาศที่ 85% DO ในการเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.0% ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ 34.64 mg/L ที่ 30% DO แต่เมื่อมีอากาศ 85% DO ผลิตสารลดแรงตึงผิวเท่ากับ 6.08 mg/L

De Roubin และคณะ (1989 อ้างโดย Peypoux *et al*., 1999) ได้กลายพันธุ์เชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 ด้วยวิธี UV mutagenesis ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่คือ *B. subtilis* ATCC 51338 ซึ่งสาย

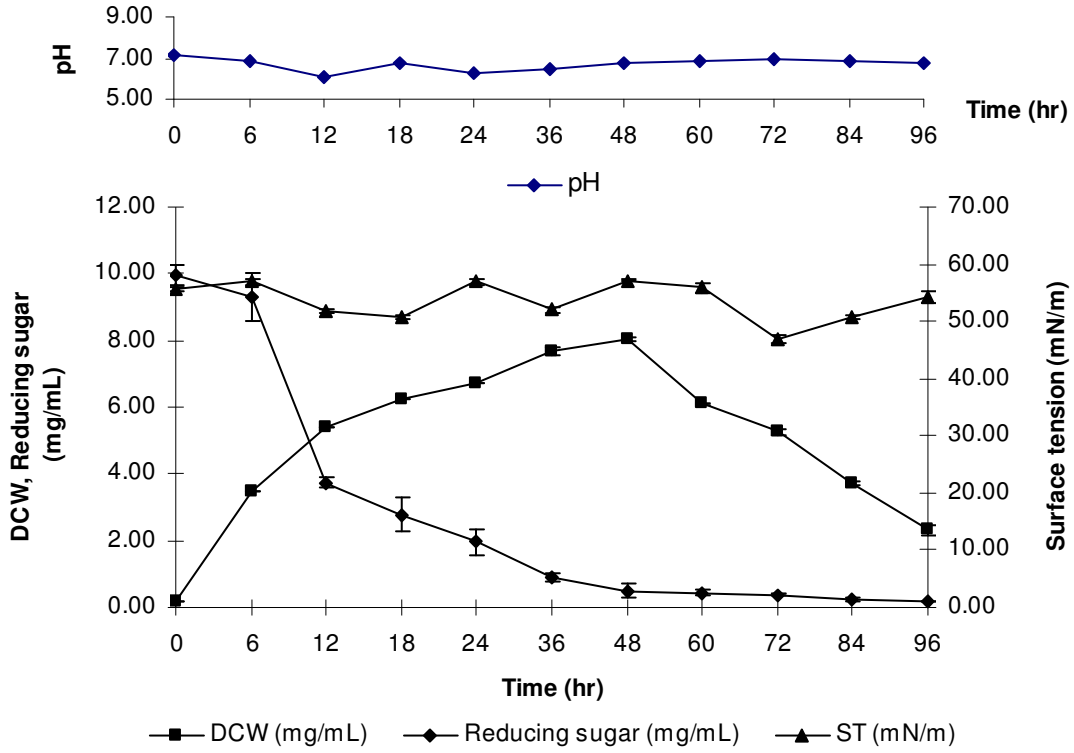
พันธุ์ใหม่นี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ต่ำกว่าสายพันธุ์เดิม 30 เท่า แต่ให้ผลการผลิตสาร surfactin มากกว่าเดิม 4 เท่า เมื่อกิจกรรมของเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ลดลง จะเกิดภาวะ oxygen limitation หรือมีกรดซิตริกเกิดในระบบมากขึ้น กล่าวได้ว่ากระบวนการ oxidation ลดลง ทำให้มีสาร surfactin เกิดมากขึ้น ดังนั้นในการผลิตสาร surfactin จึงจำเป็นต้องควบคุมกระบวนการให้ออกซิเจนด้วย

เมื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวในถังหมักที่ไม่มีการให้อากาศ และมีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 พบว่า เชื้อ *B. subtilis* MUV4 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ในช่วง stationary phase เช่นเดียวกัน ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 โดยให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในชั่วโมงที่ 96 เป็น 33.67 mN/m ดังแสดงในภาพที่ 10 และปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ได้คิดเป็น 0.15 g/L เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักที่ไม่ให้อากาศและไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างนั้น พบว่าชุดการทดลองที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 ให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 96 (ST=33.67 mN/m) ดีกว่าชุดการทดลองที่ไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (ST=35.00 mN/m) แต่ปริมาณสารที่ได้นั้นมีน้ำหนักน้อยกว่า 2 เท่าของชุดที่ไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง



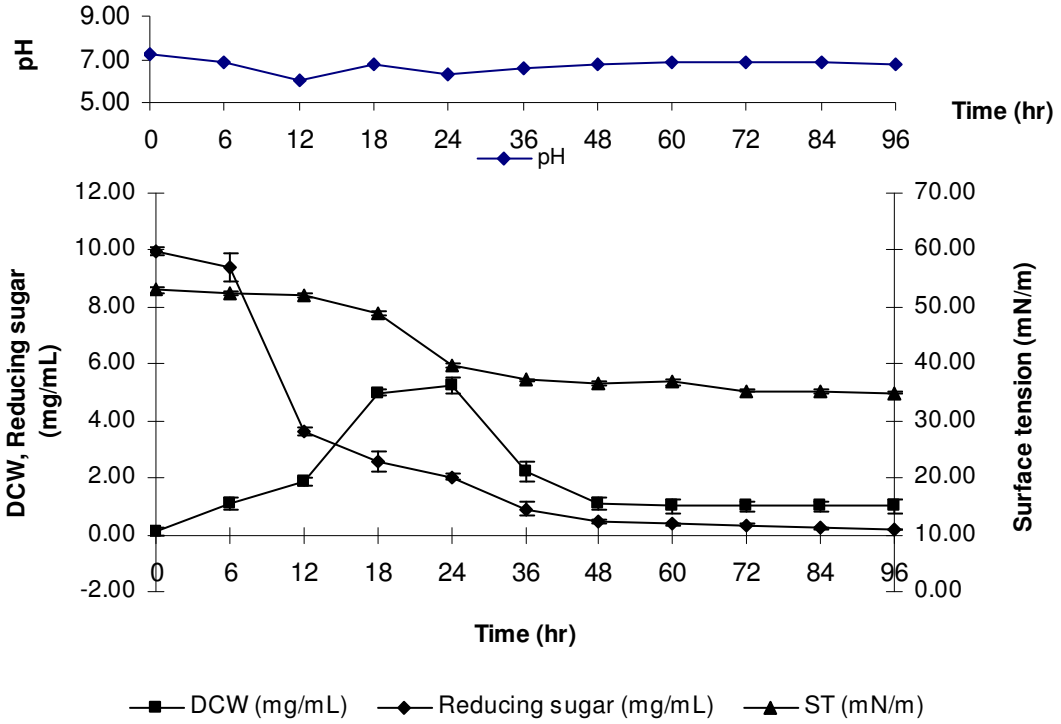
ภาพที่ 8 การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium (น้ำตาลกลูโคส 1.0%(w/v)) ในระดับถังหมัก ให้อากาศ 1.0 vvm และไม่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

Figure 8. Time course of *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen Medium (1.0%(w/v)glucose) in fermenter (working volume 1 liter, aeration rate 1.0 vvm and uncontrolled pH).



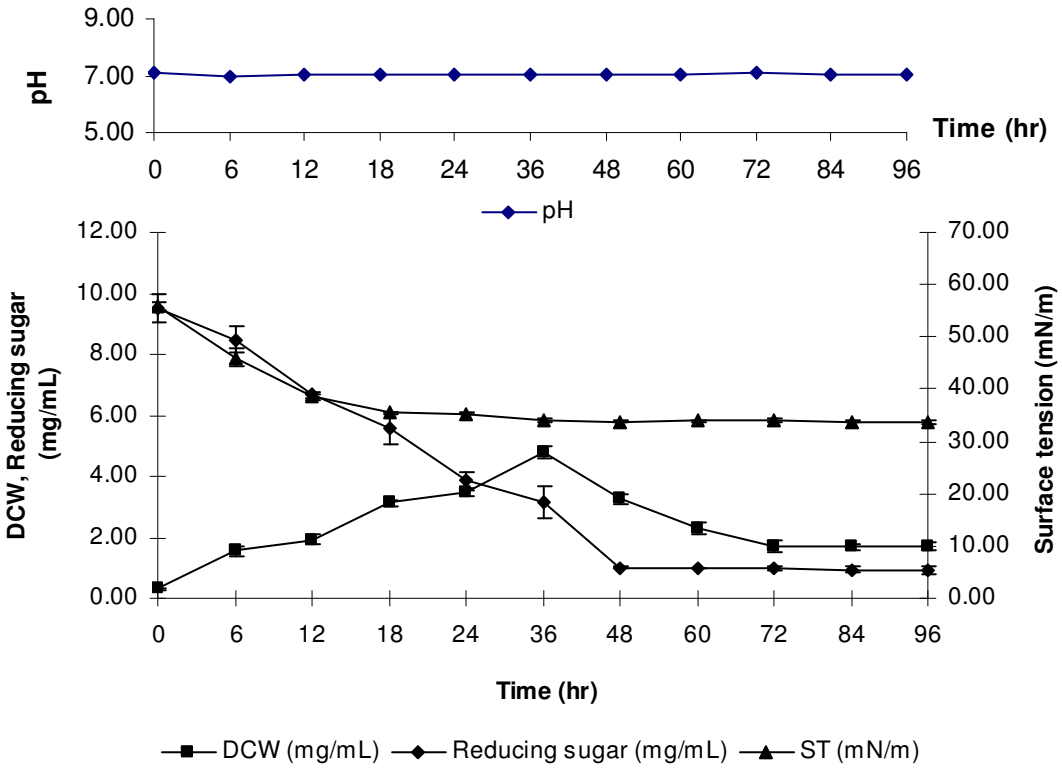
ภาพที่ 9 การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium (น้ำตาลกลูโคส 1.0%(w/v)) ในระดับถังหมัก ให้อากาศ 0.5 vvm และไม่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

Figure 9. Time course of *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen Medium (1.0%(w/v)glucose) in fermenter (working volume 1 liter, aeration rate 0.5 vvm and uncontrolled pH).



ภาพที่ 10 การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium (น้ำตาลกลูโคส 1.0%(w/v)) ในระดับถังหมัก ไม่ให้อากาศ และไม่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

Figure 10. Time course of *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen Medium (1.0%(w/v)glucose) in fermenter (working volume 1 liter, no aeration and uncontrolled pH).



ภาพที่ 11 การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าแรงตึงผิวของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ในอาหาร Mckeen Medium (น้ำตาลกลูโคส 1.0%(w/v)) ในระดับถังหมัก ไม่ให้อากาศ และควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

Figure 11. Time course of *Bacillus subtilis* MUV4 in Mckeen medium (1.0%(w/v)glucose) in fermenter (working volume 1 liter, no aeration and controlled pH at 7.0).

2. การแยกสารลดแรงตึงผิวให้บริสุทธิ์บางส่วน

2.1 การตกตะกอนและการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

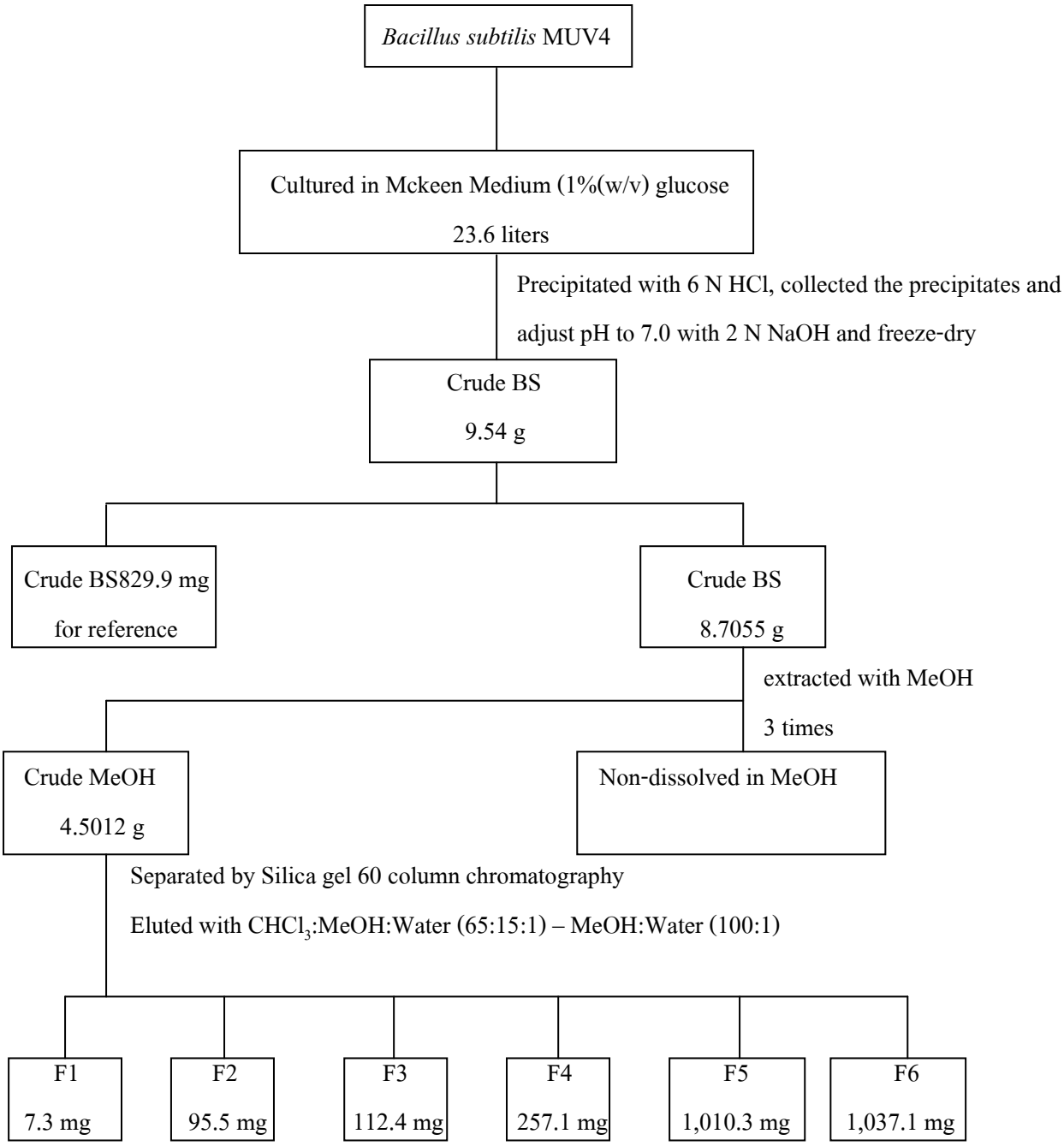
นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในขวดเขย่าตามข้อที่ 1 หน้า 27 จำนวน 23.60 L ตกตะกอนที่ pH 2 ด้วย 6N HCl ได้สารลดแรงตึงผิว 0.404 g/L รวมเป็นสารสกัดหยาบทั้งสิ้น 9.54 g แบ่งสารน้ำหนัก 8.71 g ละลายด้วยเมธานอล แยกเฉพาะส่วนที่ละลายในเมธานอลระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator ได้ส่วนสกัดหยาบเมธานอล คิดเป็นน้ำหนักได้ 4.50 g เพื่อนำไปแยกด้วยวิธี column chromatography ในขั้นต่อไป ในขณะที่ส่วนที่ไม่ละลายในเมธานอลนั้นไม่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการวัดค่าแรงตึงผิวและค่า E24 พบว่าสารสกัดหยาบให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 41.0 mN/m และค่า E24 เท่ากับ 33.33% ในขณะที่สารสกัดหยาบในเมธานอลให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 38.5 mN/m และค่า E24 เท่ากับ 16.67% (ตารางที่ 5)

2.2 ตรวจสอบองค์ประกอบในส่วนสกัดหยาบด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำส่วนสกัดหยาบเมธานอลที่ได้มาตรวจสอบองค์ประกอบอย่างหยาบบน TLC ในตัวเคลื่อนที่ระบบคลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ (65:15:1)โดยปริมาตร และพ่นด้วยสารละลาย Ehrich's reagent เป่าให้แห้ง สามารถสังเกตเห็นแถบของสารกลุ่มลิโปเปปไทด์เป็นสีขาว 3 จุด ซึ่งมีค่า R_f คือ 0.64, 0.16 และ 0.018

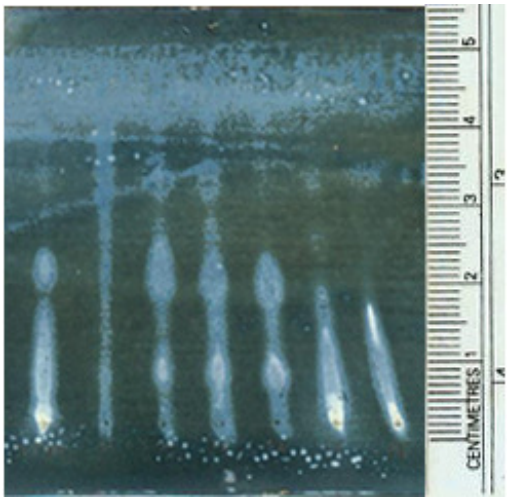
2.3 การแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ

การแยกส่วนสกัดหยาบเมธานอลจากการเลี้ยงในขวดเขย่าน้ำหนัก 4.50 กรัม แสดงขั้นตอนการแยกดังภาพที่ 12 ตรวจสอบลักษณะของสารบนแผ่น TLC และรวมสารที่มีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันเข้าด้วยกัน สามารถแยกสารออกเป็นส่วนๆ ได้ดังตารางที่ 4 พบว่าส่วนสกัดหยาบเมธานอลสามารถแยกส่วนย่อยทั้งหมดได้เป็น 6 ส่วนย่อยด้วยกัน และทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งการวัดแรงตึงผิวและการเกิดอิมัลชั่น ให้ผลดังตารางที่ 5 พบว่าส่วนย่อย F1 น้ำหนักที่แยกได้มีค่าน้อยเกินไป ไม่สามารถนำมาทดสอบกิจกรรมได้ ส่วนย่อย F2, F3 และ F6 มีค่าแรงตึงผิว 48.50, 42.50 และ 35.20 mN/m ตามลำดับ และมีค่า %EA เป็น 38.40%, 69.20% และ 100.00% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า เมื่อพิจารณาค่า E24 นั้น ส่วนย่อย F3 จะให้ค่า E24 ดีที่สุดคือ 65.40% ในขณะที่ส่วนย่อย F2 มีค่า E24 เป็น 15.00% และ ส่วนย่อย F6 มีค่า E24 เป็น 7.14% แต่เกิดอิมัลชั่นเฉพาะที่ผิวของขวด vial เท่านั้น



ภาพที่ 12 ขั้นตอนการแยกสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* MUV4

Figure 12. Isolation diagram of crude biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4.



Cr. MeOH F1 F2 F3 F4 F5 F6

ภาพที่ 13 ลักษณะ TLC chromatogram ของส่วนสกัดหยาบเมธานอล และส่วนย่อย F1 ถึง F6

Figure 13. TLC chromatogram of crude methanol and F1-F6 fractions.

Note : cr. MeOH = crude methanol (R_f = 0.64, 0.40 and 0.35)

F1 (R_f = 0.61 with long tail)

F2 (R_f = 0.61, 0.40 and 0.35)

F3 (R_f = 0.61, 0.40 and 0.35)

F4 (R_f = 0.40 and 0.35)

F5 (R_f = 0.35)

F6 (R_f = 0.35)

Mobile phase as $CHCl_3$:MeOH:Water (65:15:1)

ตารางที่ 4 ส่วนย่อยจากการแยกส่วนสกัดหยาบเมธานอลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4 ด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจล 60

Table 4. Fractions of crude methanol separated by silica gel 60 column chromatography.

Fraction	fraction no.	Mobile phase (by volume)	Weight (mg)	Physical appearance
F1	1-2	$CHCl_3$:MeOH:H_2O 65:15:1	7.3	Yellow liquid
F2	3-4	$CHCl_3$:MeOH:H_2O 65:15:1	95.5	Pale brown liquid
F3	5, 14-20	$CHCl_3$:MeOH:H_2O 65:15:1-$CHCl_3$:MeOH:H_2O 70:30:1	112.4	Brown liquid to gum
F4	6-13	$CHCl_3$:MeOH:H_2O 65:15:1-$CHCl_3$:MeOH:H_2O 70:30:1	257.1	Brown liquid
F5	21-45	$CHCl_3$:MeOH:H_2O 70:30:1-$CHCl_3$:MeOH:H_2O 40:60:1	1,010.3	Brown liquid to gum with a little white solid
F6	46-67	$CHCl_3$:MeOH:H_2O 20:80:1-MeOH:H_2O 100:1	1,037.1	Dark brown gum

ตารางที่ 5 กิจกรรมสารลดแรงตึงผิวของแต่ละส่วนที่แยกด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจล 60

Table 5. Surfactant activity of each fraction separated by silica gel 60 column chromatography.

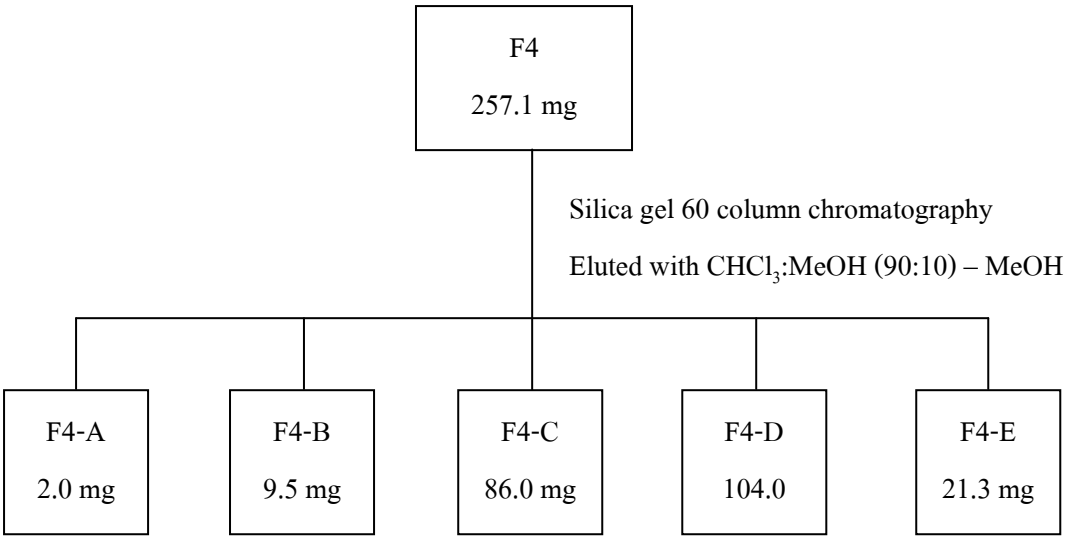
Fraction	Weight (mg)	Surface tension (mN/m)	%EA	E24	Note
Crude BS	9.54	41.00±0.50	66.67±0.29	33.33±0.50	
Crude MeOH	4.50	38.50±0.00	54.50±0.33	16.67±0.29	
F1	7.3	ND	ND	ND	Less weight
F2	95.5	48.50±0.29	38.44±0.50	15.00±0.20	
F3	112.4	42.50±0.29	69.20±0.20	65.40±0.15	
F4	257.1	32.00±0.13	65.40±0.15	0.00±0.50	
F5	1010.3	31.00±0.50	50.00±0.29	0.00±0.50	
F6	1037.1	35.20±0.00	100.00±0.33	7.14±0.29	E24 was only the surface of vial

ND = Not detect

จากตารางที่ 5 ส่วนย่อย F4 และ F5 ให้ค่าแรงตึงผิวดีที่สุดเท่ากับ 32.0 และ 31.0 mN/m ตามลำดับ และมีค่า %EA เป็น 65.40% และ 50.00% แต่สูญเสียกิจกรรมการเกิดอิมัลชั่นเมื่อทิ้งไว้ครบ 24 ชั่วโมง จึงนำ F4 น้ำหนัก 257.1 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยคอลัมน์ Silica gel 60 (70-230 mesh) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร โดยมีตัวเคลื่อนที่ คือ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล (90:10) โดยปริมาตร ปริมาตร 500 mL และเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล 80:20 60:40 40:60 20:80 ปริมาตรที่ใช้ในการชะคอลัมน์ความเข้มข้นละ 200 mL จนกระทั่งถึงเมธานอล 100% ปริมาตร 600 mL จากนั้นตรวจสอบลักษณะของสารบนแผ่น TLC และรวมสารที่มีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันเข้าด้วยกัน (ภาพที่ 14) สามารถแยกสารออกเป็นส่วนๆ ได้ดังตารางที่ 6 และกิจกรรมของส่วนย่อยที่ได้จากการแยกส่วนย่อย F4 นั้นมีทั้งหมด 5 ส่วนย่อยด้วยกัน (ตารางที่ 7) พบว่าส่วนย่อย F4-A และ F4-B มีน้ำหนักสารน้อยเกินไป ไม่สามารถทดสอบกิจกรรมสารลดแรงตึงผิวได้ ส่วนย่อย F4-C, F4-D และ F4-E มีค่าแรงตึงผิว 43.00, 43.50 และ 43.00 mN/m ตามลำดับ และไม่มีกิจกรรมของการเกิดอิมัลชั่น ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 และเนื่องจากส่วนย่อย F4-C, F4-D และ F4-E มีผลของกิจกรรมค่าแรงตึงผิวไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ส่วนย่อย F4-C ค่อนข้างมีความบริสุทธิ์มากกว่าส่วนย่อยอื่นๆ จึงนำไปใช้ในการทดลองในขั้นตอนการประยุกต์ใช้ต่อไป

สาร F5 น้ำหนัก 1.013 g มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง มีตะกอนสีขาวเล็กน้อย นำไปแยกด้วยคอลัมน์ Silica gel 60 (70-230 mesh) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร โดยมีตัวเคลื่อนที่ คือ คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ (65:25:4) โดยปริมาตร ปริมาตร 700 mL เพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็น คลอโรฟอร์ม:เมธานอล:น้ำ เป็น 65:27:4 60:35:4 50:45:4 30:65:4 10:25:4 ความเข้มข้นละ 400 mL จนกระทั่งถึง เมธานอล:น้ำ (100:4) ปริมาตร 400 mL จากนั้นตรวจสอบลักษณะของสารบนแผ่น TLC และรวมสารที่มีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันเข้าด้วยกัน (ภาพที่ 16) สามารถแยกสารออกเป็นส่วนๆ ได้ดังตารางที่ 8 กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวของส่วนย่อยจากการแยกส่วนย่อย F5 ได้ทั้งหมด 2 ส่วนย่อย (ตารางที่ 9) คือ ส่วนย่อย F5-A และ F5-B พบว่าส่วนย่อย F5-A มีน้ำหนักน้อยเกินไปไม่สามารถทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวได้ ในขณะที่ส่วนย่อย F5-B มีเฉพาะกิจกรรมแรงตึงผิวเป็น 30.50 mN/m แต่ไม่มีกิจกรรมของการเกิดอิมัลชั่น

จากนั้นนำส่วนย่อย F2, F3 และ F6 จากตารางที่ 5 ส่วนย่อย F4-C จากตารางที่ 6 และส่วนย่อย F5-B จากตารางที่ 8 ซึ่งมีน้ำหนักมากเพียงพอ ไปทำการทดลองในขั้นตอนการประยุกต์ใช้ต่อไป



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการแยกสารของ F4 ผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล 60

Figure 14. Isolation diagram of F4 through silica gel 60 column chromatography.

ตารางที่ 6 ส่วนย่อยจากการแยกสาร F4 ด้วยคอลัมน์ซิลิการเจล 60 เมื่อเพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลายเคลื่อนที่

Table 6. Subfractions of F4 separated by silica gel 60 column chromatography when increased the polarity of mobile phase.

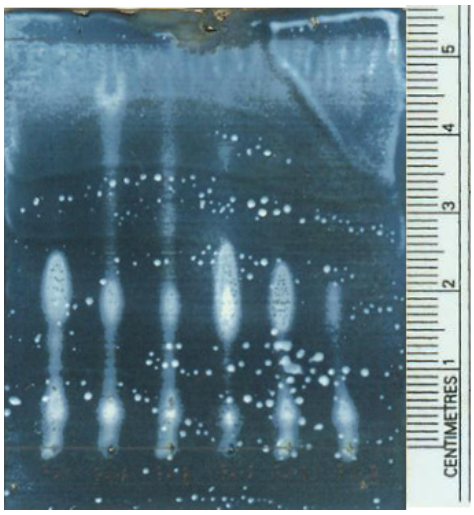
Subfraction	fraction no.	Mobile phase (by volume)	Weight (mg)	Physical appearance
F4-A	1-2	$CHCl_3$:MeOH 90:10	2.0	Pale yellow liquid
F4-B	3-34	$CHCl_3$:MeOH 90:10	9.5	Brown liquid
F4-C	35-61	$CHCl_3$:MeOH 90:10-$CHCl_3$:MeOH 80:20-	86.0	Yellow liquid
F4-D	62-67	$CHCl_3$:MeOH 60:40	104.0	Pale yellow liquid
F4-E	68-83	$CHCl_3$:MeOH 60:40-MeOH 100	21.3	Dark brown liquid

ตารางที่ 7 กิจกรรมสารลดแรงตึงผิวของ F4-subfraction เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจล 60

Table 7. Surfactant activity of F4-subfraction separated by silica gel 60 column chromatography.

Subfraction of F4	Weight (mg)	Surface tension (mN/m)	%EA	E24	Note
F4	257.1	32.00±0.13	65.40±0.15	0.00±0.50	
F4-A	2.0	ND	ND	ND	Less weight
F4-B	9.5	ND	ND	ND	Less weight
F4-C	86.0	43.00±0.50	0.00±0.29	0.00±0.50	
F4-D	104.0	43.50±0.50	0.00±0.15	0.00±0.29	
F4-E	21.3	43.00±0.50	0.00±0.20	0.00±0.29	

ND = Not detect



F4 F4-A F4-B F4-C F4-D F4-E

ภาพที่ 15 ลักษณะ TLC chromatogram ของส่วนย่อย F4 และส่วนย่อย F4-A ถึง F4-E

Figure 15. TLC chromatogram of F4 and F4-A – F4-E subfractions.

Note : F4 (R_f = 0.38 and 0.08)

F4-A (R_f = 0.87, 0.38 and 0.08)

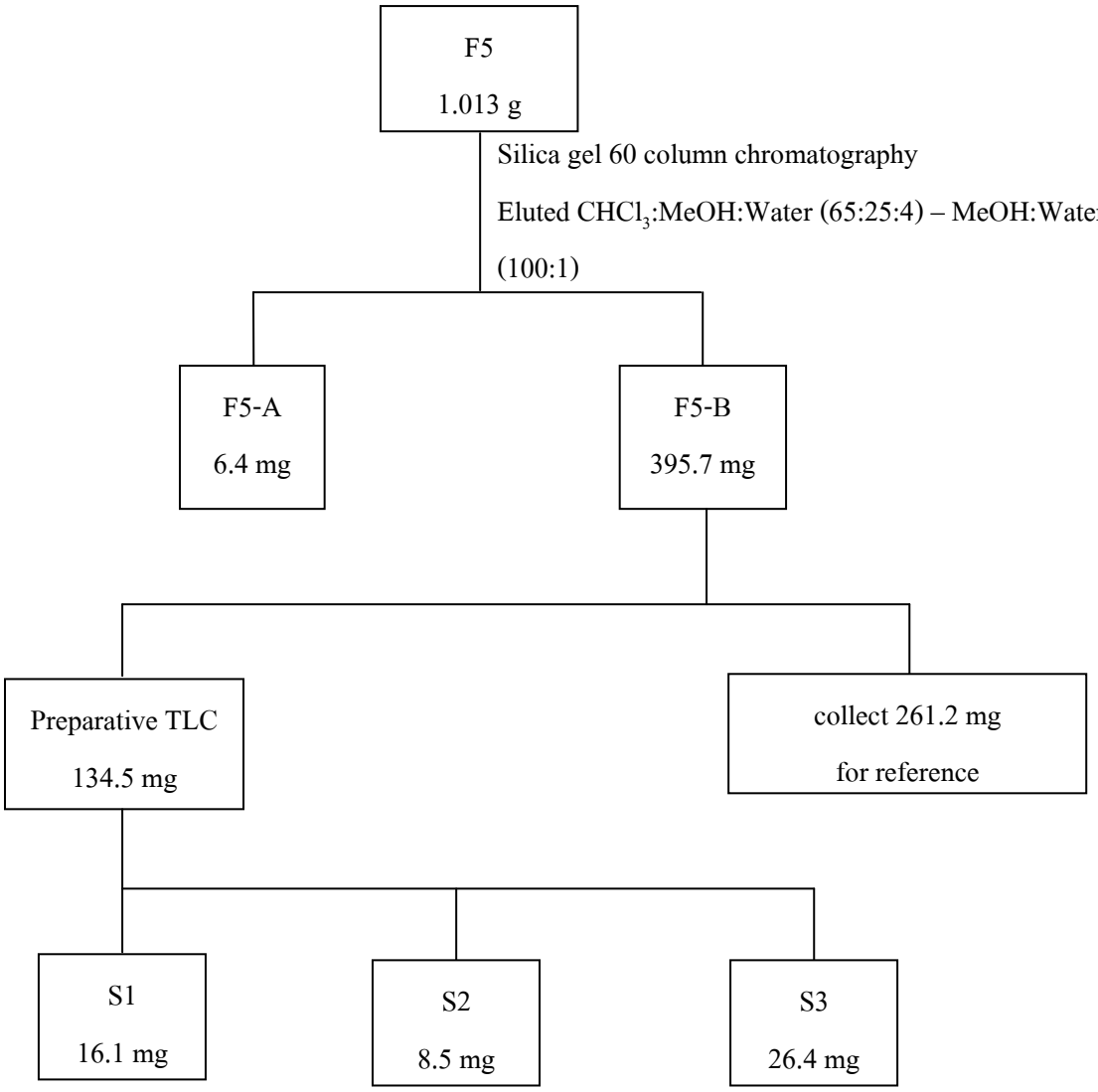
F4-B (R_f = 0.71, 0.56, 0.38 and 0.08)

F4-C (R_f = 0.71, 0.38 and 0.08)

F4-D (R_f = 0.38 and 0.08)

F4-E (R_f = 0.38 and 0.08)

Mobile phase as $CHCl_3$:MeOH (85:15)



ภาพที่ 16 ขั้นตอนการแยกสารของ F5 ผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล 60

Figure 16. Isolation diagram of F5 through silica gel 60 column chromatography.

ตารางที่ 8 ส่วนย่อยจากการแยกสาร F5 ในคอลัมน์ซิลิกาเจล 60 เมื่อเพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลายเคลื่อนที่

Table 8. Subfractions of F5 separated by silica gel 60 column chromatography when increased the polarity of mobile phase.

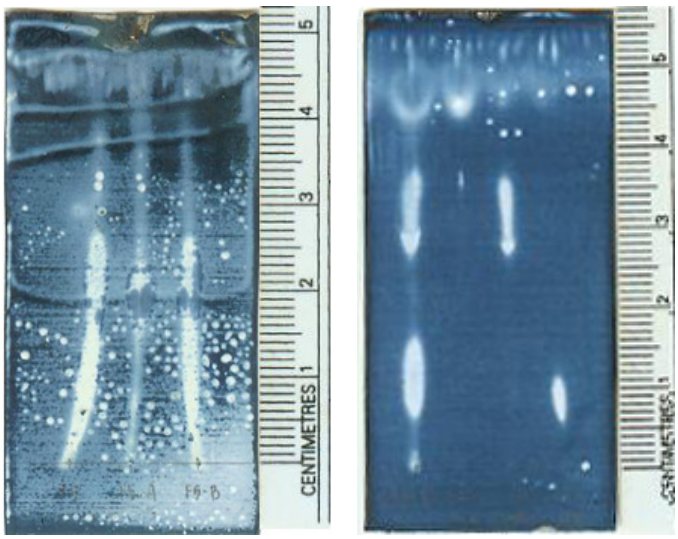
Subfraction	fraction no.	Mobile phase (by volume)	Weight (mg)	Physical appearance
F5-A	1-11	$CHCl_3$:MeOH:H_2O 65:25:4	6.4	Yellow gum with white solid
F5-B	12-152	$CHCl_3$:MeOH:H_2O 65:25:4-$CHCl_3$:MeOH:H_2O 65:27:4-$CHCl_3$:MeOH:H_2O 65:35:4-$CHCl_3$:MeOH:H_2O 50:45:4-$CHCl_3$:MeOH:H_2O 30:65:4-$CHCl_3$:MeOH:H_2O 10:85:4-MeOH:H_2O 100:4	395.7	Yellow mixed orange gum and yellow oily

ตารางที่ 9 กิจกรรมสารลดแรงตึงผิวของ F5-subfraction เมื่อแยกด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจล 60

Table 9. Surfactant activity of F5-subfraction separated by silica gel 60 column chromatography.

Subfraction of F5	Weight (mg)	Surface tension (mN/m)	%EA	E24	Note
F5	1010.3	31.00±0.50	50.00±0.29	0.00±0.50	
F5-A	6.4	ND	ND	ND	Less weight
F5-B	395.7	30.50±0.50	0.00±0.50	0.00±0.50	

ND = Not detect



A B

ภาพที่ 17 ลักษณะ TLC chromatogram ของส่วนย่อย F5 F5-A F5-B และส่วนย่อย S1 ถึง S3

Figure 17. TLC chromatogram of F5 F5-A F5-B and S1-S3 subfractions.

Note : A. Mobile phase as $CHCl_3$:MeOH:Water (65:25:4)

F5 (R_f = 0.68, 0.45 and 0.21)

F5-A (R_f = 0.68, 0.45 and 0.21)

F5-B (R_f = 0.68, 0.45 and 0.21)

B. Mobile phase as $CHCl_3$:MeOH (60:40)

F5-B (R_f = 0.82, 0.58 and 0.16)

S1 (R_f = 0.82)

S2 (R_f = 0.58)

S3 (R_f = 0.18)

ตารางที่ 10 ค่าแรงตึงผิวและ emulsion activity ของสารลดแรงตึงผิวของส่วนย่อยต่างๆ

Table 10. Surface tension and emulsion activity of each fraction.

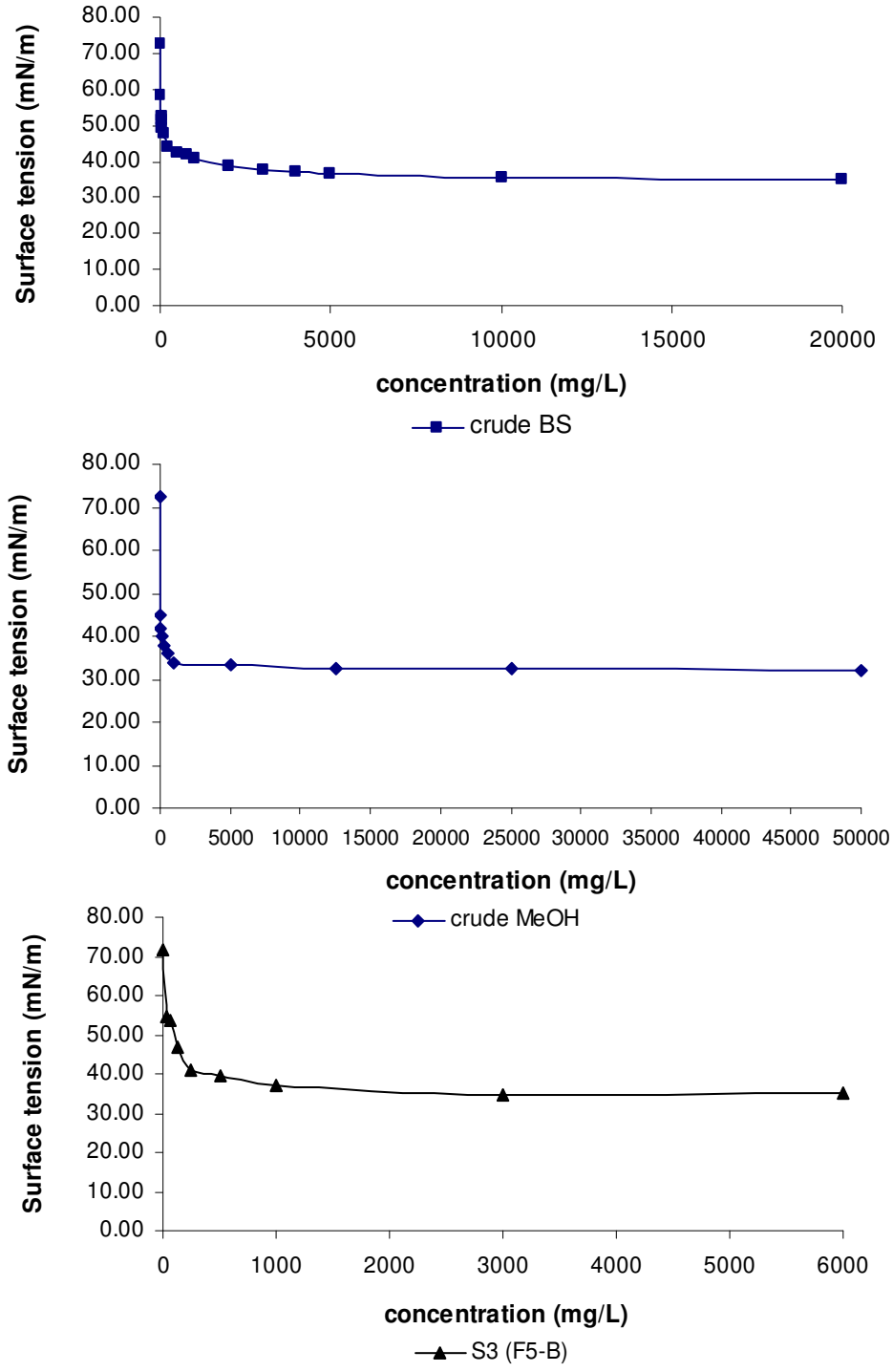
Fraction	Surface tension (mN/m)	%EA	E24	Note
Crude MeOH	38.50±0.00	54.50±0.33	16.67±0.29	
F2	48.50±0.29	38.44±0.50	15.00±0.20	
F3	42.50±0.29	69.20±0.20	65.40±0.15	
F4-C	43.00±0.50	0.00±0.29	0.00±0.50	
F5-B	30.50±0.50	0.00±0.50	0.00±0.50	
F6	35.20±0.00	100.00±0.33	7.14±0.29	E24 was only the surface of vial

จากตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตมาจากเชื้อ *B. subtilis* MUV4 นั้นมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าการทำให้เกิดอิมัลชั่น ซึ่งส่วนย่อย F5-B นั้นสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ดีที่สุด ให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 30.5 mN/m ซึ่งรายงานของ Rosenberg และ Ron (1999) ได้รายงานว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามน้ำหนักโมเลกุล นั่นคือ กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low-molecular mass molecules) สามารถลดค่าแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวได้ดี ในขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งคือ กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high-molecular mass polymers) นั้นจะมีกิจกรรมการเกิดอิมัลชั่นได้ดีกว่า ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จาก *B. subtilis* MUV4 จึงน่าจะเป็นสารในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไกลโคลิปิด เช่น trehalolipids, sophorolipids และ rhamnolipids และลิโปเปปไทด์ เช่น surfactin, gramicidin S และ polymycin เป็นต้น

นำส่วนย่อย F5-B มาตรวจสอบองค์ประกอบหยาบบนแผ่น TLC ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ระบบคลอโรฟอร์ม:เมธานอล (60:40) โดยปริมาตร และจุ่มในสารละลาย ammonium-molybdate perchloric acid ซึ่งเป็น reagent ที่ใช้ตรวจสอบสารในกลุ่มลิโปเปปไทด์ เป่าให้แห้ง สามารถสังเกตเห็นแถบของสารเป็นสีขาว พบว่ามีสาร 3 ชนิดปรากฏบนแผ่น TLC ให้ค่า R_f เป็น 0.8, 0.58 และ 0.16 จึงแยกสารทั้งสามออกจากกันด้วยการขูด spot ทั้งสามออกจากแผ่น TLC และนำไปหาค่ากิจกรรมแรงตึงผิวอีกครั้ง ให้ผลดังนี้คือ

S1 มีค่า R_f เป็น 0.8 มีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 41.50 mN/m S2 มีค่า R_f เป็น 0.58 มีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 44.50 mN/m และ S3 มีค่า R_f เป็น 0.16 มีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 32.50 mN/m นั่นคือ spot ที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวสูงได้แก่ spot S3

นำ S3 มาหาค่า critical micelle concentration (CMC) พบว่ามีค่า CMC ที่ 200 mg/L โดยให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ 34.70 mN/m ดังภาพที่ 18 ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 34.8 mN/m ที่ระดับค่า CMC ประมาณ 500 mg/L และส่วนสกัดหยาบเมธานอลให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 32.5 mN/m ที่ระดับค่า CMC ประมาณ 500 mg/L



ภาพที่ 18 ค่า critical micelle concentration ของส่วนสกัดหยาบ ส่วนสกัดหยาบเมธานอล และส่วนย่อย S3

Figure 18. Critical micelle concentrations of crude BS, crude MeOH and S3.

3. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.1 ความคงตัวต่อความเป็นกรดด่าง (pH stability)

นำตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำกลั่น (1 mL), ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* MUV4 (supernatant) (1 mL), ส่วนสกัดหยาบ (crude BS), ส่วนสกัดหยาบเมธานอล (crude MeOH) และ SDS ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้คือ 1 mg/mL ปรับพีเอชของตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 2-12 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว จากการวัดด้วยเครื่อง ring tensiometer ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หากค่าแรงตึงผิวที่วัดได้นั้นมีค่าต่ำ แสดงว่าค่านั้นเป็นค่าที่ดี

จากภาพที่ 19 พบว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบ 48 ชั่วโมง จะให้ค่าแรงตึงผิวเป็น 35.00 mN/m เมื่อทดสอบความคงตัวต่อพีเอชตั้งแต่ 2-12 พบว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีกิจกรรมของแรงตึงผิวที่พีเอชในช่วงกว้างตั้งแต่ 6-12 ซึ่งให้ค่าแรงตึงผิวในช่วง 35.00-37.50 mN/m ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าแรงตึงผิวที่ได้ในชั่วโมงที่ 48 แต่เมื่อปรับพีเอชให้ลดลงต่ำกว่า 4 จะให้ค่าของแรงตึงผิวที่สูงขึ้น โดยมีค่าแรงตึงผิวเป็น 50.17 และ 56.83 mN/m สำหรับพีเอช 4 และ 2 ตามลำดับ ค่าแรงตึงผิวที่สูงขึ้นเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวในส่วนใสถูกตกตะกอนลงมาเมื่อพีเอชเป็นกรด ทำให้ในส่วนใสนั้นไม่มีสารลดแรงตึงผิวอยู่ จึงให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับในชั่วโมงที่ 0 สำหรับการทดลองของ Sutthivanitchakul และคณะ (1999) พบว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2.2 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 6-12 โดยให้ค่าแรงตึงผิวที่ 45-48 mN/m เมื่อบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ส่วนสกัดหยาบ มีค่าแรงตึงผิวคงตัวที่พีเอชช่วง 7-10 ให้ค่าแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 35.17-35.33 mN/m ซึ่งค่าที่ได้นั้นมีค่าที่อยู่ในช่วงเดียวกับส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ สำหรับส่วนสกัดหยาบเมธานอล มีค่าแรงตึงผิวคงตัวในช่วงพีเอชที่กว้างกว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนสกัดหยาบ นั่นคือในช่วงพีเอช 4-10 โดยค่าแรงตึงผิวที่ได้นั้นอยู่ในช่วง 32.33 – 33.50 mN/m ซึ่งเป็นค่าที่ดี ทั้งนี้เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในส่วนสกัดหยาบถูกละลายออกมาในเมธานอลและสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกกำจัดออกไปกับส่วนที่ไม่ละลายในเมธานอลซึ่งไม่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว ทำให้ส่วนสกัดหยาบเมธานอลนั้นให้ผลของแรงตึงผิวที่ดีกว่า ผลที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของ Roongsawang และคณะ (2003) ที่นำส่วนสกัดเมธานอลจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* BKK-1 มาปรับพีเอชในช่วง 2-12 แล้วนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารลดแรงตึงผิว BKK-1 มีความคงตัวต่อสภาวะที่มีพีเอช 5-10

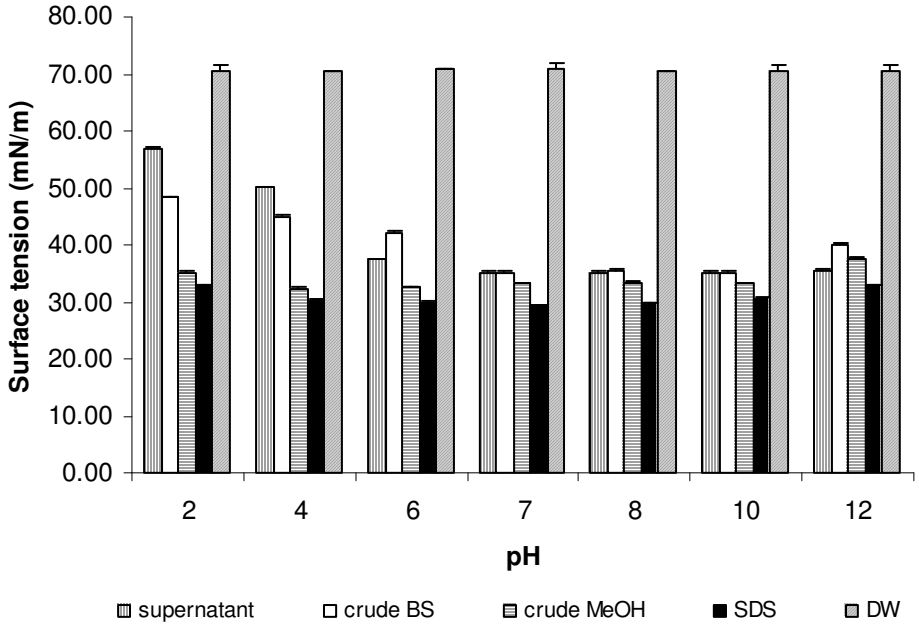
สำหรับ SDS ค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่มีผลต่อค่าแรงตึงผิว โดยค่าแรงตึงผิวที่ได้นั้นมีค่าอยู่ในช่วง 29.33 – 32.83 mN/m

เมื่อพิจารณาค่าความคงตัวของอิมัลชั่นที่พีเอชต่างๆ ดังภาพที่ 13 พบว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่า %EA เป็น 66.67% ที่พีเอช 6-7 และยังคงมีความคงตัวของอิมัลชั่นเท่าเดิม (66.67%) เมื่อทิ้งไว้ครบ 24 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากค่า E24 ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบและส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีความคงตัวที่พีเอช 7 ให้ค่า %EA เป็น 67.00% และ 53.33% แต่ความคงตัวของอิมัลชั่นของทั้งส่วนสกัดหยาบและส่วนสกัดหยาบเมธานอลลดลงเมื่อทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ให้ค่า E24 เป็น 33.33% สำหรับ SDS จะให้ผลดีที่สุด โดยให้ %EA และ E24 ดีที่พีเอช 7 คือ 71.43% ค่า E24 นั้นจะเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในความคงตัวได้ดีกว่าค่า %EA เพราะพิจารณาที่ระยะเวลาความคงตัวที่นานกว่า คือ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ค่า %EA นั้นเป็นความคงตัวของอิมัลชั่นที่ 10 นาที

3.2 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ (Thermal stability)

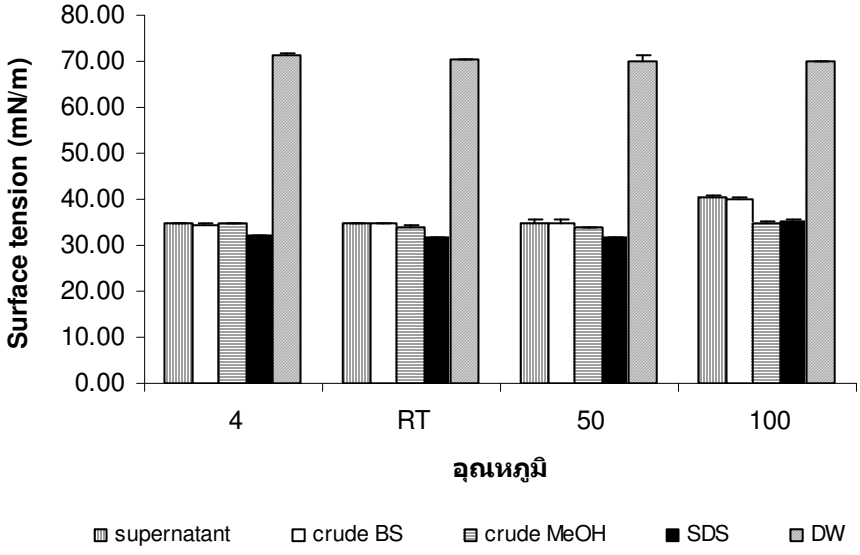
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* MUV4 นำตัวอย่างบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 4°C, อุณหภูมิห้อง (30±2) 50 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความคงตัวของแรงตึงผิว ซึ่งเห็นได้จากเมื่อบ่มส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง (30±2) และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ให้ค่าแรงตึงผิวในช่วง 35.00 mN/m ในขณะที่การบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะมีค่าแรงตึงผิวเป็น 40.50 mN/m (ภาพที่ 20) จะเห็นว่าอุณหภูมิต่างๆ มีผลต่อความคงตัวของแรงตึงผิว นั่นคือเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้สูญเสียกิจกรรมของแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* MUV4 โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีค่าแรงตึงผิวสูงขึ้นเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลการทดลองตรงกับ Sutthivanitchakul และคณะ (1999) ที่ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. lichenisformis* F2.2 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 55 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ 5 ชั่วโมง โดยให้ค่าแรงตึงผิวเป็น 45 mN/m แต่ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่ 5 ชั่วโมงให้ค่าแรงตึงผิว 50 mN/m

ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบนั้นมีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่ 4°C, อุณหภูมิห้อง (30±2) และ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าแรงตึงผิวเป็น 34.50, 35.00 และ 35.00 mN/m สำหรับอุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง (30±2) และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีความคงตัวของแรงตึงผิวต่ออุณหภูมิดีที่ทุกอุณหภูมิของการบ่ม ซึ่งให้ค่าดีกว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนสกัดหยาบ โดยให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนสกัดหยาบเมธานอลอยู่ในช่วง 33.67-34.83 mN/m ซึ่งให้ค่าที่ดีกว่าส่วนสกัดหยาบเมธานอล BKK-1 จากการทดลองของ Roongsawang และคณะ (2003) ที่มีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่ 50, 80 และ 100 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าแรงตึงผิวเป็น 45 mN/m เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 5 ชั่วโมง



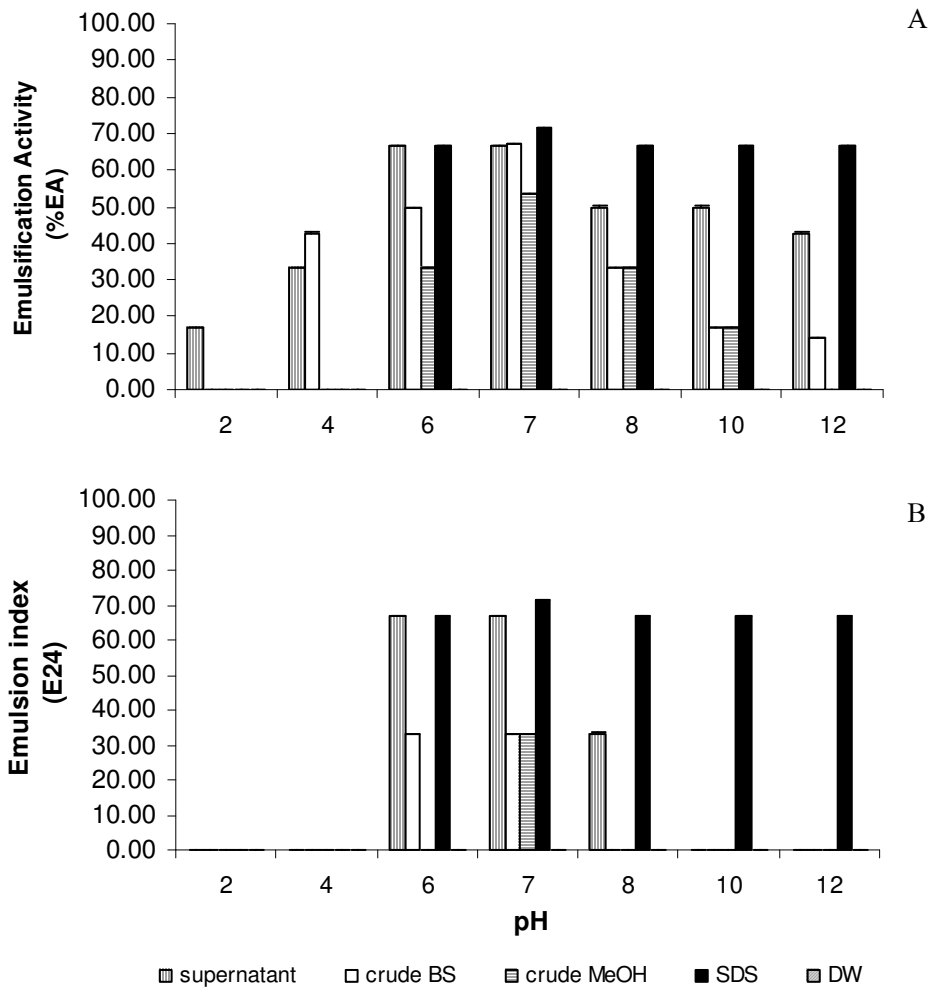
ภาพที่ 19 ผลของพีเอชต่อค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MUV4

Figure 19. Effect of pH on the surface tension of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4.



ภาพที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* MUV4

Figure 20. Effect of temperature on the surface tension of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4.



ภาพที่ 21 ผลของพีเอชต่อความคงตัวต่อการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* MUV4

Figure 21. Effect of pH on emulsion activity and emulsion index of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4.

A. emulsification activity (%EA)

B. emulsion index (E24)

Nitschke และ Pastore (2003) ศึกษาเฉพาะการบ่มส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* LB5a ไว้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่ต่างกัน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงตึงผิว (28 mN/m) เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ซึ่งให้ผลการทดลองตรงกับเชื้อ *B. subtilis* MTCC1427 ของ Makkar และ Cameotra (1998) ที่ส่วนใสมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที ให้ค่าแรงตึงผิว 28 mN/m ซึ่งให้ผลตรงกับเชื้อ *B. subtilis* MTCC2423 (Makkar and Cameotra, 1997)

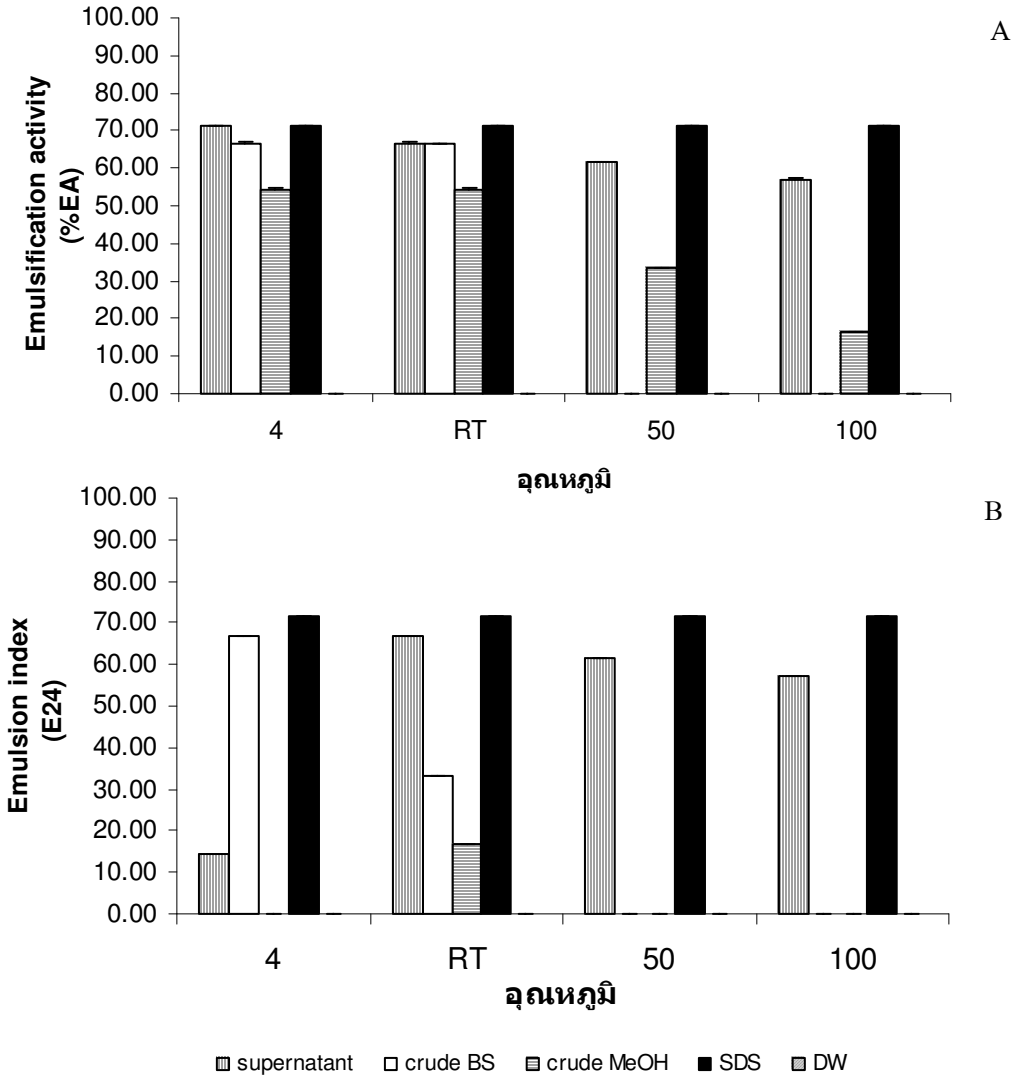
ผลของอุณหภูมิต่อค่าความคงตัวของการเกิดอิมัลชั่นซึ่งพิจารณาจากค่า %EA และ E24 จากภาพที่ 22 จะเห็นว่าส่วนใสมีความคงตัวของอิมัลชั่นดีที่อุณหภูมิห้อง โดยให้ค่า E24 เป็น 66.67 % ซึ่งแตกต่างจากส่วนสกัดหยาบ ที่มีความคงตัวของอิมัลชั่นดีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 ชั่วโมง มีค่า E24 เป็น 50.00% สำหรับส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีความคงตัวของอิมัลชั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า %EA เป็น 54.50% และความคงตัวของอิมัลชั่นลดลงเมื่อทิ้งไว้ครบ 24 ชั่วโมง โดยให้ค่า E24 เป็น 50.00% ในขณะที่ SDS มีความคงตัวของอิมัลชั่นต่ออุณหภูมิต่างๆ ค่อนข้างสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ

3.3 ความทนเกลือ (Resistance to salt)

ในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการจับตัวกับน้ำมันในทะเล เกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำทะเล อาจจะมีผลต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นจึงศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* MUV4 โดยมีการเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-30 %w/v ลงในตัวอย่าง และทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว พบว่า ความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อกิจกรรมสารลดแรงตึงผิว ซึ่งค่าแรงตึงผิวของส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อลดลงตั้งแต่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3-10 %w/v โดยค่าแรงตึงผิวที่ได้อยู่ในช่วง 32.00-33.50 mN/m ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบมีค่าแรงตึงผิวที่ต่ำที่สุดในความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3-10 %w/v เช่นกันและมีค่าแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 30.50-30.67 mN/m ส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีความทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ในช่วงความเข้มข้นที่มากกว่าส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนสกัดหยาบ นั่นคือ ส่วนสกัดหยาบเมธานอลจะทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ตั้งแต่ช่วง 3-20 %w/v มีค่าแรงตึงผิวเป็น 30.50 mN/m (ภาพที่ 23) Thimon และคณะ (1992) รายงานว่าประจุของเกลือมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเฉพาะ surfactin โดยเกลือจะไปจับที่หมู่ carboxylic ทำให้สูญเสียพื้นที่ที่จะลดแรงตึงผิวระหว่างอากาศกับน้ำได้ การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ผิวของสารเกี่ยวเนื่องไปถึงการเกิดไมเซลล์ของ surfactin

การทดลองของ Roongsawang และคณะ (1999) ได้รายงานว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus* sp. strain KP-2 มีความคงตัวที่ 3-8 %NaCl เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์มากขึ้นสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะถูกยับยั้งทำให้ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองตรงกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* BKK-1 ที่ยังให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 3-8 % (Roongsawang *et al*., 2003)

สำหรับกิจกรรมการเกิดอิมัลชั่นนั้นพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 3 %w/v จะทำให้ความสามารถในการเกิดอิมัลชั่นลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทิ้งไว้ครบ 24 ชั่วโมง ค่า E24 ของส่วนสกัดหยาบเมธานอลมีค่าเท่ากับ 0 ในขณะที่ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนสกัดหยาบยังคงเหลือกิจกรรมของการเกิดอิมัลชั่นอยู่โดยมีค่า E24 เป็น 16.67% สำหรับ SDS ค่า E24 ยังคงมีอยู่เป็น 33.33% ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 %w/v อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 5 – 30 %w/v ทำให้สูญเสียความคงตัวของการเกิดอิมัลชั่นในทุกตัวอย่างซึ่งพิจารณาจากค่า %EA และ E24 (ตารางที่ 11) ดังนั้นในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวจาก *B. subtilis* MUV4 ในทะเลนั้น ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนสกัดหยาบยังคงมีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งที่เป็นค่าแรงตึงผิว และกิจกรรมของการเกิดอิมัลชั่นได้ เพราะในน้ำทะเลมีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 3.5%

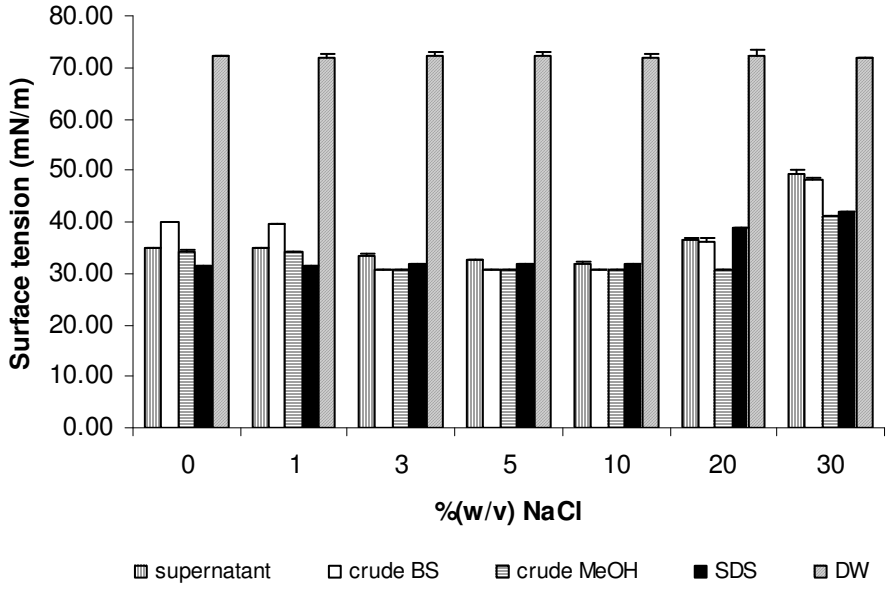


ภาพที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวต่อการเกิดอิมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* MUV4

Figure 22. Effect of temperature on emulsion activity and emulsion index of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4.

A. emulsification activity (%EA)

B. emulsion index (E24)



ภาพที่ 23 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* MUV4

Figure 23. Effect of NaCl on surface tension of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4.

ตารางที่ 11 ความคงตัวของอิมัลชั่นต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

Table 11. Emulsion stability of samples with different concentration of sodium chloride.

A. Emulsification Activity (%EA)

%(w/v)NaCl	%EA				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
0	66.67±0.10	66.67±0.06	54.55±0.06	71.43±0.06	0.00±0.06
1	66.67±0.10	66.67±0.06	50.00±0.06	72.00±0.06	0.00±0.06
3	50.00±0.06	33.33±0.10	50.00±0.06	71.43±0.10	0.00±0.10
5	33.33±0.10	33.33±0.06	16.67±0.06	50.00±0.10	0.00±0.06
10	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06
20	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.10
30	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.06

B. Emulsion Index (E24)

%(w/v)NaCl	E24				
	supernatant	crude BS	crude MeOH	SDS	DW
0	66.67±0.06	33.33±0.10	16.67±0.06	71.43±0.10	0.00±0.06
1	33.33±0.06	16.67±0.00	16.67±0.06	50.00±0.06	0.00±0.06
3	16.67±0.10	16.67±0.06	0.00±0.06	33.33±0.10	0.00±0.10
5	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.06
10	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.06
20	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.10
30	0.00±0.06	0.00±0.06	0.00±0.10	0.00±0.06	0.00±0.06

4. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.1 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลายชนิดมีความสามารถในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ทั้งการเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือไวรัส ซึ่งสารในกลุ่มของลิโปเปปไทด์หลายชนิดมีกิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น iturin A หรือ surfactin (Singh and Cameotra, 2004)

สำหรับการทดสอบด้วยวิธี Alamar blue assay นั้นจำเป็นต้องหาปริมาณเชื้อทดสอบเริ่มต้นที่เหมาะสมที่เชื้อทดสอบสามารถเปลี่ยนสี Alamar blue ได้ในช่วงเวลา 8-12 ชั่วโมง เพื่อง่ายต่อการติดตามผลการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังทำการทดสอบยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งสามชนิดด้วย ซึ่งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ระยะเวลาในการเปลี่ยนสี Alamar blue และความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบแสดงดังตารางที่ 12 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดนั้น มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเริ่มต้นแตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดนั้นมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกัน จึงเข้าสู่ช่วง log phase ที่เวลาแตกต่างกัน แต่เนื่องจากต้องการให้เชื้อสามารถเปลี่ยนสี Alamar blue ที่เวลาเดียวกัน ปริมาณเชื้อทดสอบเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 5.48×10^4, 1.42×10^7 และ 8.78×10^4 CFU/mL สำหรับเชื้อ *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923 และ *B. cereus* ATCC11778 ตามลำดับ สำหรับยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสามชนิดได้แก่ vancomycin

เมื่อนำส่วนย่อยที่แยกได้ทั้ง 5 ส่วนย่อย ได้แก่ F2, F3, F4-C, F5-B และ F6 มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งสามชนิด จะใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบเริ่มต้น 1,250 µg/mL สำหรับการทดสอบต่อเชื้อ *E. coli* ATCC25922 และ *S. aureus* ATCC25923 และความเข้มข้นของสารทดสอบเริ่มต้นเท่ากับ 300 µg/mL สำหรับการทดสอบต่อเชื้อ *B. cereus* ATCC11778 พบว่าไม่มีส่วนย่อยใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC25922 และ *S. aureus* ATCC25923 ได้

ในขณะที่ส่วนย่อย F2, F3, F4-C, F5-B และ F6 นั้นสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC11778 ได้ ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นเป็นแบบ bacteriocidal โดยสังเกตจากการที่นำอาหารเลี้ยงเชื้อหลุมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของ Alamar blue หลังจากบ่มทิ้งไว้จนครบ 8 ชั่วโมง มาทำการ streak บนอาหารแข็ง TSA และสังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า ส่วนย่อยทั้งหมดที่ทำการทดสอบนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบบทำลายเซลล์จุลินทรีย์จนเซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งส่วนย่อย F4-C ให้ค่า MIC ที่ต่ำที่สุดคือ 37.5 µg/mL เมื่อใช้ยาปฏิชีวนะ vancomycin พบว่ามีค่า MIC ต่อเชื้อทดสอบทั้งสามชนิดคือ 10, 1.25 และ 2.5 µg/mL สำหรับเชื้อ *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923 และ *B. cereus* ATCC11778 ตามลำดับ ผลการยับยั้งเชื้อด้วยสารทดสอบแสดงดังตารางที่ 13

จากการทดลองของ Prommachan (2002) พบว่าสารลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* MUV4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus anthracis, B. subtilis, Shigella* sp. และ *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 แต่ไม่ยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. และ *S. aureus* ATCC 25923

Yakimov และคณะ (1995) ได้ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์ ด้วยสาร surfactin และ lichenysin A ปริมาณ 15 µg ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าสาร surfactin มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้หลายชนิด ซึ่งให้วงใสที่เกิดขึ้นมากกว่า 11 มิลลิเมตร ได้แก่เชื้อ *B. lichenisformis* BAS50, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus globerulus* และ *S. aureus*

สำหรับการทดลองของ Jenny และคณะ (1991) ได้นำสารลิโปเปปไทด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 20 µL ต่อ disc และทดสอบด้วยวิธี agar diffusion ต่อเชื้อทดสอบ 18 ชนิด พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa และ E. coli* ถูกยับยั้งได้ที่ค่า MIC 1 mg/mL นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อยีสต์และราได้อีกด้วย นั่นคือ *Candida utilis*, *C. tropicalis* และ *Pencillium oxalicum* ที่ค่า MIC คือ 1.0, 1.0 และ 0.1 mg/mL ตามลำดับ

He และคณะ (2001) พบว่าสารลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. circulans* J2154 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ Streptococci ซึ่งเป็นเชื้อที่ทนต่อยา piperacillin และเชื้อ Enterococci ที่ทนต่อยา vancomycin ได้ ซึ่งค่า MIC ที่ต่ำที่สุดคือ 0.5-1 µg/mL ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* แต่สารลิโปเปปไทด์ที่ได้นี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบคือ *E. coli* ได้น้อย ที่ค่า MIC มากกว่า 64 µg/mL

4.2 การละลายสาร Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* MUV4 เมื่อแยกด้วยคอลัมน์แบบดูดซับได้ส่วนย่อยที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งหมด 5 ส่วนย่อยด้วยกัน จากตารางที่ 8 คือ ส่วนย่อย F2, F3, F4-C, F5-B และ F6 การทดสอบการละลายของสาร PAHs นั้น ได้ทำการทดสอบกับส่วนสกัดหยาบ ส่วนสกัดหยาบเมธานอล ส่วนย่อยทั้ง 5 ส่วน และ SDS โดยสาร PAHs ที่นำมาทดสอบการละลายได้แก่ Naphthalene และ Phenanthrene ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำมันดิบ (Kanga *et al*., 1997 อ้างโดย Banat *et al*., 2000) มีความสามารถในการละลายในน้ำได้แตกต่างกันดังในตารางที่ 14

ตารางที่12 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม และระยะเวลาในการเปลี่ยนสีของ Alamar blue

Table 12. Amount of cell and reduction time of bacteria pathogen.

Bacteria	Amount of cell (CFU/mL)	Reduction time (Hour)	Antibiotic concentration (μg/mL)
E. coli ATCC25922	$5.48x10^4$	8	Vancomycin (10)
S. aureus ATCC25923	$1.42x10^7$	8-10	Vancomycin (1.25)
B. cereus ATCC11778	$8.78x10^4$	8	Vancomycin (2.5)

ตารางที่ 13 ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยส่วนย่อยของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* MUV4

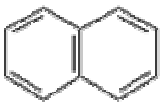
Table 13. Minimal inhibitory concentration of different fractions of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4 against pathogens.

Fractions	MIC (μg/mL)		
	E. coli ATCC25922 ($5.48x10^4$ CFU/mL)	*S. aureus* ATCC25923 ($1.42x10^7$ CFU/mL)	*B. cereus* ATCC11778 ($8.78x10^4$ CFU/mL)
Crude BS	-	-	150
Crude MeOH	-	-	75
F2	-	-	75
F3	-	-	75
F4-C	-	-	37.5
F5-B	-	-	300
F6	-	-	300
Vancomycin	10	1.25	2.5

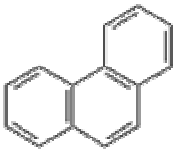
ตารางที่ 14 สมบัติทางเคมีของสารประกอบ PAHs

Table 14. Chemical characteristics of PAHs.

PAHs	Chemical formula	Molecular weight	Water solubility (mg/L)
Naphthalene	$C_{10}H_8$	128	31.69
Phenanthrene	$C_{14}H_{10}$	178.2	1-1.6



naphthalene

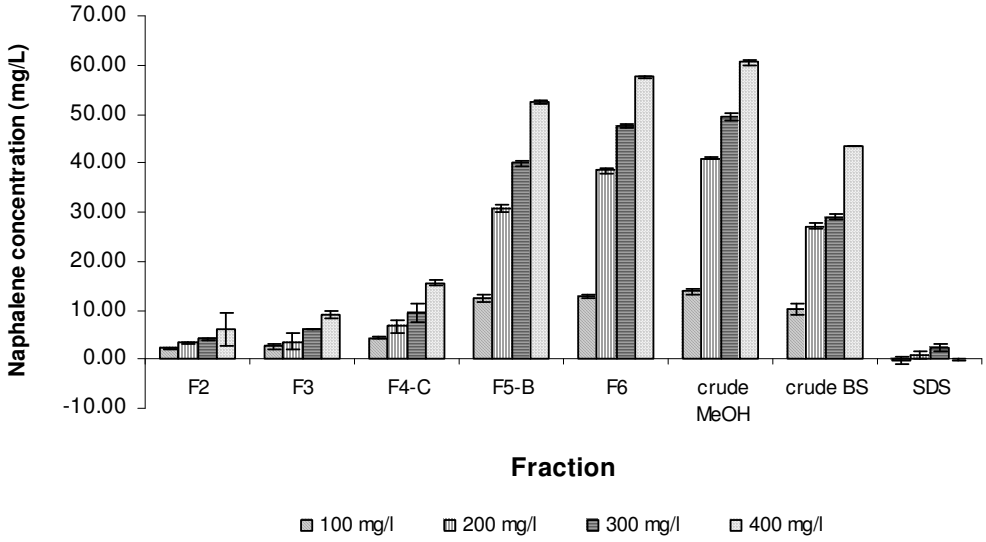


phenanthrene

ที่มา : Elliott (2001)

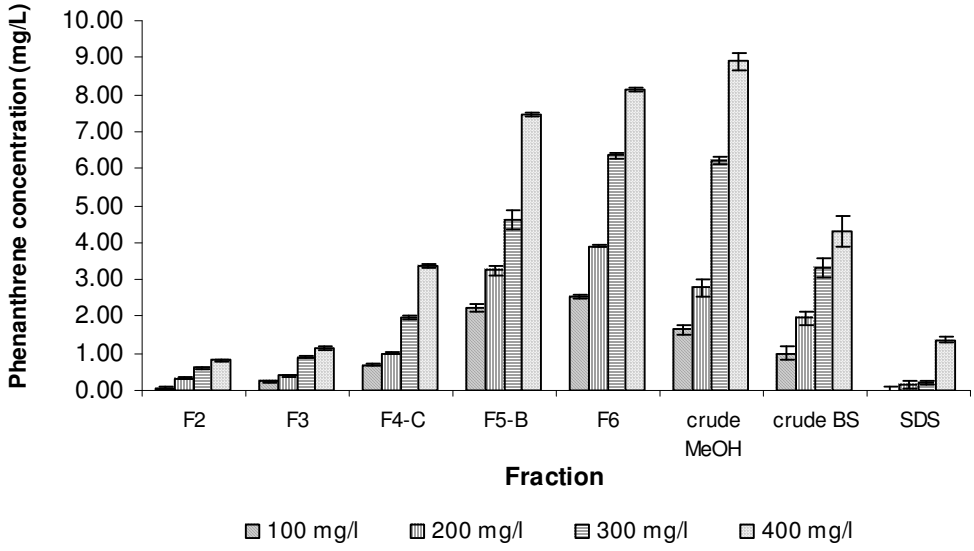
จากโครงสร้างและสมบัติทางเคมีของสารประกอบทั้งสองชนิดนั้น พบว่าเมื่อสารมีโครงสร้างที่ซับซ้อนยิ่งขึ้นความสามารถในการละลายน้ำน้อยลง เมื่อนำส่วนย่อยทั้ง 5 ส่วนมาละลายสารประกอบ PAHs ทั้งสองชนิด พบว่า ส่วนสกัดหยาบ ส่วนสกัดหยาบเมธานอล ส่วนย่อย F5-B และส่วนย่อย F6 ให้ค่าการละลายสาร naphthalene และ phenanthrene ได้ดีกว่า SDS ซึ่งการละลายของสารประกอบ PAHs จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีสารลดแรงตึงผิวในความเข้มข้นที่ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์ได้ หรือถึงจุดที่เรียกว่า critical micelle concentration (CMC) (Prak and Pritchard, 2002) นอกจากนี้การละลายของสาร PAHs นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวด้วย (Zhou and Rhue, 2000)

Barkay และคณะ (1999) รายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของ alasan เป็น 500 µg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากกว่าค่า CMC และค่าแรงตึงผิวไม่ลดลง ณ ความเข้มข้นดังกล่าวนี้ จึงส่งผลให้มีการละลาย phenanthrene เพิ่มขึ้นเป็น 6.6 เท่า ดังนั้นการละลายของสารประกอบ PAHs จึงเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้เกิดไมเซลล์ได้ ความสามารถในการลดแรงตึงผิว และการเกิดอิมัลชั่น จากการทดลองนั้นพบว่าส่วนสกัดหยาบเมธานอล F5-B และ F6 มีค่าแรงตึงผิวเป็น 38.5, 30.5 และ 35.2 mN/m ตามลำดับ และมีค่า %EA เป็น 54.5, 63.9 และ 100% ตามลำดับ จึงส่งผลให้มีการละลายสาร naphthalene และ phenanthrene ได้มากกว่าส่วนย่อย F2, F3 และ F4-C ดังภาพที่ 24 และ 25 และจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้การละลายสาร naphthalene และ phenanthrene เพิ่มขึ้นเช่นกัน



ภาพที่ 24 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่อการละลาย naphthalene

Figure 24. Effect of biosurfactant concentration on naphthalene solubilization.



ภาพที่ 25 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่อการละลาย phenanthrene

Figure 25. Effect of biosurfactant concentration on phenanthrene solubilization.

4.3 การเก็บเกี่ยวน้ำมันโดยวิธี Sand Pack Column

การเก็บเกี่ยวน้ำมันโดยวิธี sand pack column เป็นการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านสิ่งแวดล้อมในระดับห้องปฏิบัติการ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นำมาใช้นั้นไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์มาก ทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนในการประยุกต์ใช้

จากผลการศึกษาการเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบที่ปนเปื้อนบนทรายด้วยส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนสกัดหยาบ ส่วนสกัดหยาบเมธานอล และ SDS (ตารางที่ 15) พบว่ามีความสามารถในการชะน้ำมันดิบได้ในประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการชะ SDS ให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุดคือสามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบได้ร้อยละ 100 ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 3 mL ส่วนสกัดหยาบ และส่วนสกัดหยาบเมธานอล ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 3 mL และ ให้ค่าการเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบได้ร้อยละ 25.11, 28.56 และ 41.85 ตามลำดับ ในขณะที่การใช้น้ำจะเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบได้ร้อยละ 12.64 และส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนสกัดหยาบ และส่วนสกัดหยาบเมธานอล เก็บเกี่ยวน้ำมันก๊าดได้ร้อยละ 42.85, 50.00 และ 75.00 ตามลำดับ และเมื่อใช้น้ำสามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันก๊าดได้ร้อยละ 18.56 แม้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นำมาใช้ในการเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบจะให้ค่าในการเก็บเกี่ยวน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวทางการค้า แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และย่อยสลายได้ง่าย (Banat *et al*., 2000)

ผลจากการทดลองพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* MUV4 เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วจะมีความสามารถในการชะน้ำมันได้มากขึ้นทั้งการชะน้ำมันดิบ และน้ำมันก๊าด โดยชะน้ำมันก๊าดได้มากกว่าน้ำมันดิบ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันดิบมีความหนืดมาก และมีองค์ประกอบซับซ้อนกว่า เนื่องจากในน้ำมันดิบมีองค์ประกอบทั้งที่เป็น aliphatic hydrocarbons, aromatic hydrocarbons และ non-hydrocarbons (Tong *et al*., 1999) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Prommachan (2002) ซึ่งรายงานว่า ส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้น 1.0 mg/mL จาก *B. subtilis* MUV4 สามารถชะน้ำมันก๊าดได้ 44.41 และ 50.04% ตามลำดับ

Makkar และ Cameotra (1997) พบว่าเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิว 1 mg/mL ปริมาตร 100 ml ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* MTCC2423 สามารถชะน้ำมันก๊าดได้ 62% และสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* MTCC1427 ชะน้ำมันก๊าดได้ 56% (Makkar and Cameotra,1998) และในการทดลองของ Banat (1993) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus* sp. AB-2 สามารถชะน้ำมันก๊าดได้ 90-100%

ตารางที่ 15 ความสามารถในการเก็บเกี่ยวน้ำมันดิบและน้ำมันก๊าดโดยส่วนใส ส่วนสกัดหยาบ ส่วนสกัดหยาบเมธานอลของสารลดแรงตึงผิวจาก *Bacillus subtilis* MUV4

Table 15. Oil recovery of supernatant, crude BS, crude MeOH of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4.

Sample	% crude oil recovery ± S.D.	% kerosene oil recovery± S.D.
Supernatant	25.11±0.75	42.85±1.75
Crude BS	28.56±1.08	50.00±0.34
Crude MeOH	41.85±2.25	75.00±0.43
SDS	100.00±0.58	100.00±0.81
Distilled water	12.64±0.90	18.56±1.10

4.4 การเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ

การย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเป็นวิธีการดั้งเดิมในการกำจัดสารไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนน้ำมัน การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถช่วยเพิ่มให้เกิดอิมัลชั่นของน้ำมันและเพิ่มการละลายของสารปนเปื้อนที่มีการละลายต่ำได้ ดังนั้นเพื่อให้การเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในอาหารที่มีน้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนจึงมีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Lang and Wagner, 1993 อ้างโดย Banat *et al*., 2000)

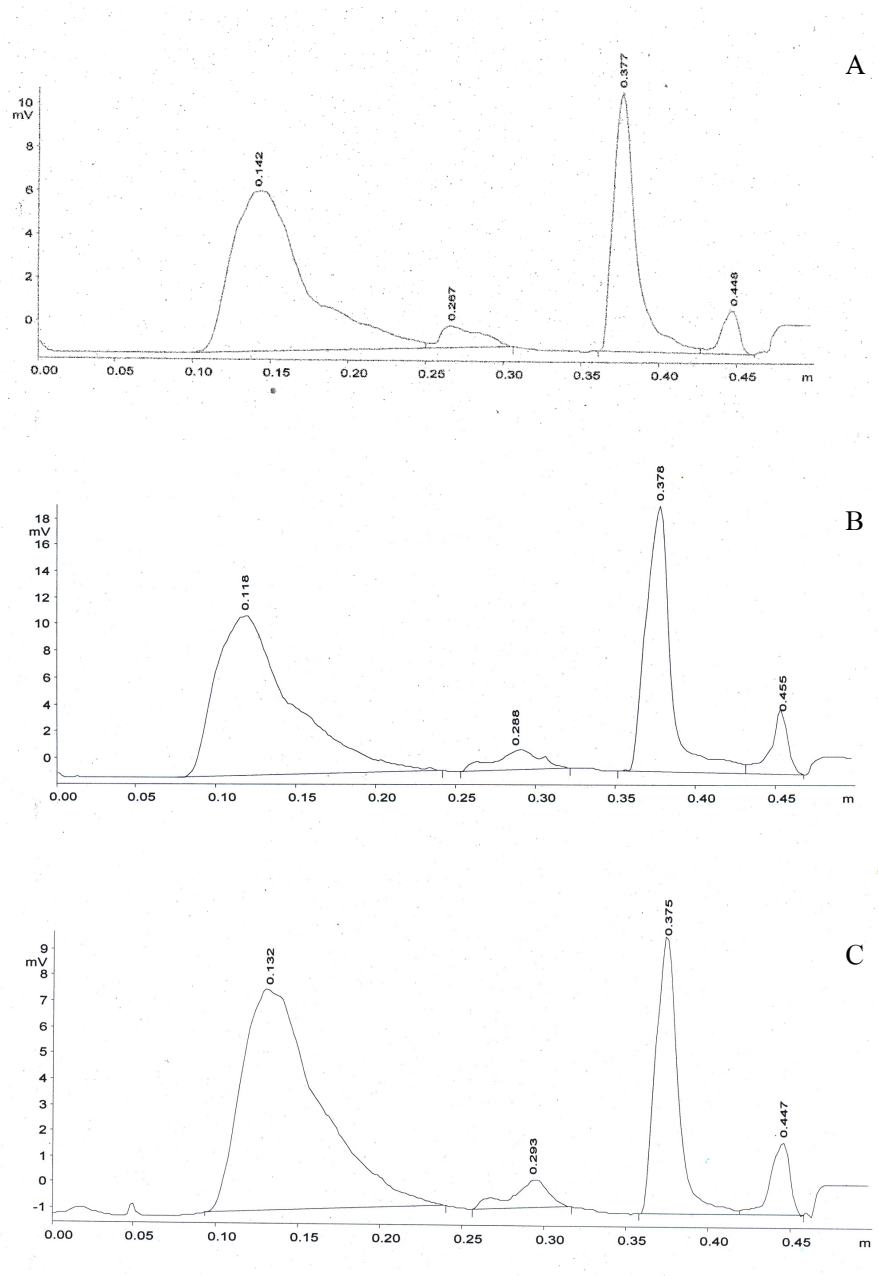
สำหรับวิธีการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ วิเคราะห์โดยวิธี SARA method โดยเครื่อง Thin-layer chromatography/flame ionization detector (TLC/FID) ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว และวัดค่าในเชิงปริมาณได้ (Goto *et al*., 1994)

จากการทดลอง นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันตามวิธีการทดลองข้อ 4.4 หน้า 32 มาเลี้ยงในอาหาร Mineral Salt Yeast extract Medium (MSYM) ที่มีการเติมและไม่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป และมีน้ำมันดิบ 0.3% เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3 และ 7 วิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันดิบด้วยวิธี TLC/FID ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 4 หน้า 27 จากรายงานของบริษัท Iatron laboratories พบว่าสารประกอบในน้ำมันดิบมี 4 ชนิด คือ saturated hydrocarbon (SA), aromatic hydrocarbon (AR), resin (RE) และ asphaltene (AS) ซึ่งมี retention time คือ 0.156, 0.315, 0.403 และ 0.471 สำหรับสารทั้ง 4 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของน้ำมันดิบ ในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไปนั้น สาร SA มีปริมาณลดลงคิดเป็น 3.91% และ 19.96% สำหรับวันที่ 3 และ 7 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 และในชุดการทดลองที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป พบว่า กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำสารประกอบในน้ำมันดิบไปใช้ได้ง่ายกว่า เนื่องจากลักษณะของน้ำมันดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดเป็นอิมัลชั่น หรือ droplet เล็กๆ และเมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันดิบด้วยวิธี TLC/FID แล้ว พบว่า ปริมาณ SA มีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด นั่นคือลดลง 66.43% ในวันที่ 3 และลดลงเป็น 96.63% ในวันที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของสาร AR ในวันที่ 7 มีปริมาณลดลงเป็น 27.54% และ 33.78% สำหรับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และชุดการทดลองที่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป ตามลำดับ (ภาพที่ 26 และ 27) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณของ AR นั้นถูกย่อยสลายได้น้อยกว่า SA เช่นเดียวกับการทดลองของ Goto และคณะ (1994) ได้ใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากทะเล (SM-8) ในการย่อยสลายน้ำมันดิบ พบว่ามี SA คงเหลืออยู่ 52% และ AR คงเหลืออยู่ 87% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงไป อย่างไรก็ตาม

พบว่าเชื้อ SM-8 นั้นย่อยสลายสาร AR ได้น้อย และ Verma และคณะ (2006) ที่พบว่าเชื้อ *Acinetobacter* สามารถย่อยสลายสาร aliphatic hydrocarbon ได้ดีกว่าสาร aromatic hydrocarbon ทำนองเดียวกับ Mishra และคณะ (2004) พบว่า สายพันธุ์กลายของ *A. baumannii* สามารถย่อยสลายสาร aliphatic hydrocarbon ได้ดีกว่า aromatic hydrocarbon เช่นกัน

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร SA อาจเกิดขึ้นได้จากความสามารถของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์เองที่สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเองได้ ดังการทดลองของ Palittapongarnpim และคณะ (1998) ได้ใช้เชื้อ *Candida tropicalis* strain 15Y ซึ่งแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน พบว่า ปริมาณของน้ำมันดิบ (Tapis crude oil) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณของ total petroleum ลดลง 87.3% และปริมาณของ n-alkane ลดลง 99.6% เมื่อทำการเลี้ยงไว้ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C)

Das และ Mukherjee (2006) รายงานว่า *P. aeruginosa* ที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ M และ NM สามารถย่อยสลายสาร alkane และ aromatic hydrocarbon ได้ภายใน 120 วัน ซึ่งในชุดก่อนเริ่มการทดลองมีปริมาณ alkane อยู่ 47.0 g/kg ดิน เมื่อผ่านไป 120 วันของการทดลอง ปริมาณ alkane คงเหลืออยู่ 9.0 g/kg ดิน และปริมาณ aromatic จาก 17.0 g/kg ดิน คงเหลือ 6.0 g/kg ดิน ในวันที่ 120 ของการทดลอง



ภาพที่ 26 ลักษณะ TLC/FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันดิบในชุดที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

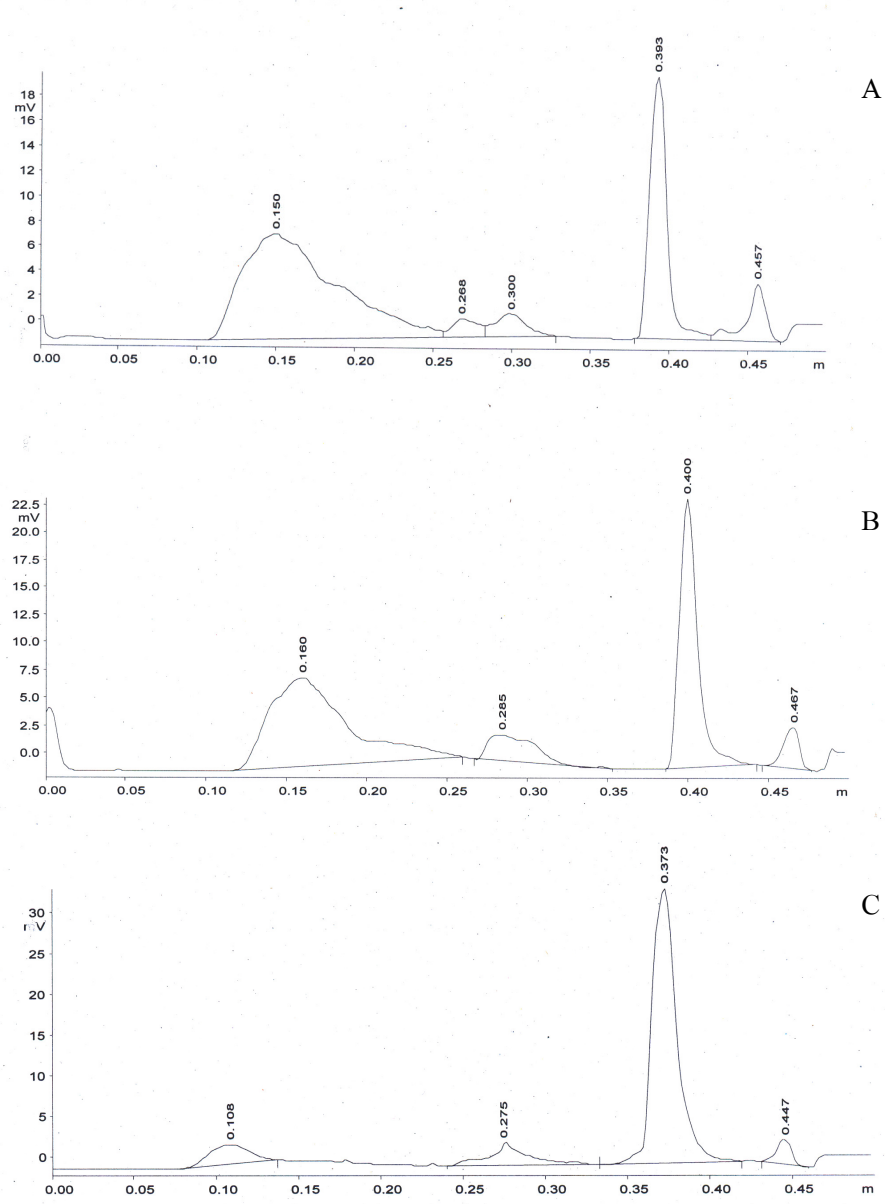
Figure 26. TLC/FID chromatogram of crude oil when cultured in MSYM and no biosurfactant.

A = 0 day of cultivation

B = 3 days of cultivation

C = 7 days of cultivation

Note : Saturated hydrocarbon (RT=0.154±0.02), Aromatic hydrocarbon (RT=0.291±0.01) Resin (RT=0.386±0.00) and Asphaltene (RT=0.463±0.00) analyzed by TLC/FID method.



ภาพที่ 27 ลักษณะ TLC/FID โครมาโตแกรมของสารประกอบในน้ำมันดิบในชุดที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Figure 27. TLC/FID chromatogram of crude oil when cultured in MSYM and added biosurfactant.

A = 0 day of cultivation

B = 3 days of cultivation

C = 7 days of cultivation

Note : Saturated hydrocarbon (RT=0.150±0.01), Aromatic hydrocarbon (RT=0.288±0.01) Resin (RT=0.403±0.00) and Asphaltene (RT=0.472±0.01) analyzed by TLC/FID method.