



การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม  
 สภาวะที่เหมาะสมและคุณลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก  
 แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

**Screening of Biosurfactant-producing Bacteria Isolated from Palm Oil Mills,  
 Optimization and Characterization of Biosurfactant  
 Produced by Selected Strain**

อรกมล ฤกษ์ดี

Onkamon Rukadee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
 Master of Science in Biotechnology  
 Prince of Songkla University**

2555

๑

เลขที่	TP248. B57 042 2555
Bib Key	361953

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

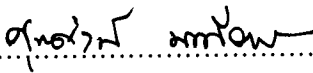
ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากโรงงานสกัด  
น้ำมันปาล์ม สภาวะที่เหมาะสมและคุณลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ  
จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้


ผู้เขียน นางสาวอรกมล ฤคดี

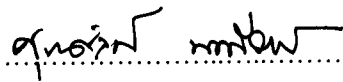
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

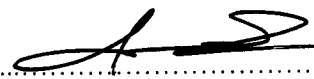
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบ

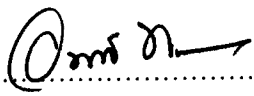
  
.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุกสิลป์ มณีรัตน์)

  
.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงษ์ศักดิ์กุล)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุกสิลป์ มณีรัตน์)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ วงศ์สัตยนนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

  
.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วน  
เกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....ศุภศิลป์ มณีรัตน์.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....อ. น. น.....

(นางสาวอรกมล ฤคดิ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อนและ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวอรกมล ฤทธิ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม สภาวะที่เหมาะสมและคุณลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
ผู้เขียน	นางสาวอรกมล ฤคดี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2554

### บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างของเสียที่มีน้ำมันปาล์มปนเปื้อนซึ่งเก็บจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทยโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal salt agar ที่มีน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 808 ไอโซเลต เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร minimal salt medium (MSM) ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วหรือน้ำตาลกลูโคส วัตถุประสงค์โดยวิธี qualitative drop-collapsing สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 72 ไอโซเลต จากการวัดความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด 14 ไอโซเลต เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แบ่งเป็น 5 สกุล ประกอบด้วย เชื้อในสกุล *Bacillus* spp. 7 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus subtilis* 4 ไอโซเลต, *Bacillus tequilensis* 1 ไอโซเลต และ *Bacillus pumilus* 2 ไอโซเลต เชื้อในสกุล *Pseudomonas* sp. 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อในสกุล *Klebsiella* sp. ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* จำนวน 3 ไอโซเลต เชื้อในสกุล *Serratia* sp. จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Serratia marcescens* และเชื้อในสกุล *Acinetobacter* spp. จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus* และ *Acinetobacter junii* จากการจำแนกเชื้อมี 1 ไอโซเลต คือ *Bacillus tequilensis* Lc9 ซึ่งยังไม่มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยสามารถลดแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใสได้ 8.1 และ 9.3 mN/m เมื่อใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ จึงเลือกเชื้อนี้มาใช้ในการศึกษาต่อไป

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. tequilensis* Lc9 คือ อาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน  $\text{NaNO}_3$  2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีตามลำดับ ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง *B. tequilensis* Lc9 มีค่ากิจกรรมการลดแรงตึง

ผิวดีที่สุด โดยลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดเท่ากับ 44 mN/m การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้  
กลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ได้ผลผลิตสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.39 กรัมต่อ  
ลิตร มีค่า critical micelle concentration (CMC) 0.044 กรัมต่อลิตร สารสกัดหยาบของสารลดแรง  
ตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ในช่วงพีเอช 6-9, อุณหภูมิระหว่าง 25-121  
องศาเซลเซียส, เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-12 โดยน้ำหนัก และแมกนีเซียมคลอ  
ไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก ส่วนแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 0.06  
โดยน้ำหนัก มีผลลบต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิว การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรง  
ตึงผิวชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์โดยวิธีคอัลมันน์โครมาโตกราฟีด้วย Fourier Transform Infrared  
Spectroscopy (FT-IR) พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีไขมันและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ

**Thesis Title** Screening of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil mills, optimization and characterization of biosurfactant produced by selected strain

**Author** Miss Onkamon Rukadee

**Major Program** Biotechnology

**Academic Year** 2011

### ABSTRACT

Biosurfactant-producing bacteria were isolated from soil and water contaminated with palm oil in the south of Thailand. They were grown in minimal salt agar using used palm oil as a sole carbon source. The 808 isolates obtained were screened for biosurfactant production in a minimal salt medium (MSM) containing different carbon sources (glucose and used palm oil). By using qualitative drop-collapsing test, The culture supernatants of 72 selected isolates showed surface tension reduction. Among those isolates, 14 biosurfactant-producing bacterial strains were obtained and the strains were identified by 16S rDNA gene sequence analysis. The production of biosurfactants was obtained by strains representative of 5 different bacterial genera. Seven *Bacillus* spp. including 4 *Bacillus subtilis*, 1 *Bacillus tequilensis* and 2 *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, 3 *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and 2 *Acinetobacter* spp. including *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter junii*. From 16S rDNA gene sequence analysis, *Bacillus tequilensis* Lc9 is the new biosurfactant-producing strain. *B. tequilensis* Lc9 reduced surface tension of culture supernatant to 8.1 and 9.3 mN/m when glucose and used palm oil were used as a carbon source, respectively.

The optimum condition for biosurfactant production by *B. tequilensis* Lc9 was MSM containing 20 (g/l) molasses as carbon source, 2 (g/l) of sodium nitrate as nitrogen source, initial pH of 7.0 and shaking speed 200 rpm, respectively. It showed the maximum surface tension reduction (44 mN/m) after 30 h of cultivation. Crude biosurfactant was recovered from the culture supernatant by chloroform : methanol (2:1) extraction with a yield of 0.39 g/l and had critical micelle concentration (CMC) of 0.044 g/l. The crude 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), MgCl<sub>2</sub> up to 0.1% (w/v) and CaCl<sub>2</sub> up to 0.04% (w/v). The biosurfactant obtained was purified by

using column chromatography. Structure elucidation of partially purified biosurfactant was performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) indicated that biosurfactant produce by *B. tequilensis* Lc9 consist of sugar and lipid.



## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลาปี มณีรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำแนวทางในการทำงานวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงษ์กิตติกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ วงศ์สัตยชนนท์ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่ายังในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (NRU) ที่ให้ทุนในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจรวมทั้งสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด และขอขอบคุณ ดร.อทิพันธ์ เสียมไหม รุ่งพี และเพื่อนนักศึกษา สำหรับความช่วยเหลือต่าง ๆ และกำลังใจที่มีให้เสมอ รวมทั้งเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่มีได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จและสมบูรณ์ด้วยดี

อรกมล ฤคคี

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(10)
LIST OF TABLES.....	(12)
LIST OF FIGURES .....	(14)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	29
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ.....	30
วัสดุและอุปกรณ์.....	30
วิธีการทดลอง.....	36
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	44
การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างของเสียที่เก็บจาก โรงงานแปรรูปน้ำมันปาล์ม.....	44
การจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้.....	47
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ	
<i>Bacillus tequilensis</i> Lc9.....	52
วิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ <i>B. tequilensis</i> Lc9.....	66
คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้.....	70

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้.....	76
4. บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	83
เอกสารอ้างอิง.....	85
ภาคผนวก.....	97
ประวัติผู้เขียน.....	114

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Type and microbial origin of biosurfactants.....	10
2. Emulsification activity (EA), emulsification index ( $E_{24}$ ) and surface tension reduction (STR) of supernatants obtained from bacterial cultures grown in shaken tube in 10 ml MSM supplemented with indicated carbon sources for 48 h at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.....	47
3. Colony morphologies on MSM agar supplemented with used palm oil (1%, w/v) as a carbon source.....	49
4. Identification of selected biosurfactant-producing bacterial isolates by 16S rDNA gene sequence analysis.....	50
5. Effect of different carbon sources on biosurfactant production in shaken flask by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 grown in MSM at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.....	54
6. Effect of molasses concentration on biosurfactant production in shaken flask by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 grown in MSM at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.....	56
7. Effect of different nitrogen sources on biosurfactant production in shaken flask by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v) as a carbon source at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.....	58
8. Effect of sodium nitrate concentration on biosurfactant production in shaken flask by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v) as a carbon source at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.....	60

## LIST OF TABLES (Cont.)

Table		Page
9.	Effect of shaking speed on biosurfactant production in shaken flask by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v) and sodium nitrate (2%, w/v) at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ).....	62
10.	Effect of initial pH on biosurfactant production in shaken flask by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v), sodium nitrate (2%, w/v) at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.....	64
11.	Method for recovery biosurfactant produced by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9.....	69
12.	Critical micelles concentration of biosurfactant produced by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 and chemically synthetic surfactants was evaluated by surface tension measurement.....	69
13.	Effect of seawater on surface tension activity of biosurfactant crude extract from <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 and chemical surfactant (SDS and Triton X-100)	76

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Surface tension, interfacial tension and solubilization as a function of surfactant concentration represents critical micelle concentration (CMC).....	3
2. Structures of the rhamnolipids RL-1, RL-2, RL-3, RL-4, RL-A and RL-B produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	5
3. Structure of the trehalose lipid produced by <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	6
4. Structure of trehalose dinocardiomycolate produced by <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP. The mycolic acid components of carbon number ranging from C-48 to C-54 (n + x + y + z from 37 to 43).....	6
5. Structure of sophorolipid from <i>Candida bombicola</i> .....	7
6. Chemical structure of emulsan produced by <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1 in which fatty acids are linked to a heteropolysaccharide backbone.....	8
7. Structure of surfactin isomers from <i>Bacillus</i> sp.....	9
8. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence of selected biosurfactant-producing bacterial isolates.....	51
9. Time course of growth, culture pH, surface tension, and emulsification index ( $E_{24}$ ) by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 grown in MSM (pH 7) with molasses (2%, w/v), sodium nitrate (0.2%, w/v) and agitation rate 200 rpm at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ).....	66
10. Effect of pHs on surface tension of biosurfactant produced by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 versus chemical surfactant (SDS and Triton X-100). ....	71
11. Effect of temperature on surface tension of biosurfactant produced by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 versus chemical surfactant (SDS and Triton X-100).....	72
12. Effect of NaCl concentration (% w/v) $\text{CaCl}_2$ concentration (% w/v) and $\text{MgCl}_2$ concentration (% w/v) (c) on surface tension of biosurfactant produced by <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 versus chemical surfactant (SDS and Triton X-100).....	75

## LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
13.	TLC chromatogram of crude biosurfactant from <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 using chloroform : methanol (2:1) as mobile phase on a normal-phase silica gel.....	77
14.	TLC chromatogram of crude biosurfactant from <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 using acetonitrile : water (2:1) as mobile phase on a reverse-phase silica gel.....	77
15.	Isolation diagram of crude biosurfactant from <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9.....	79
16.	TLC chromatogram of partially purified biosurfactant from <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 using : Acetonitrile : Water (2:1) as mobile phase on a reverse-phase silica gel.....	80
17.	Biosurfactant activity of partially purified biosurfactant from <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 using used lubricating oil for oil displacement area.....	80
18.	TLC chromatogram of partially purified biosurfactant from <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9 using acetonitrile:water (5:1) as mobile phase on a reverse-phase silica gel.....	81
19.	FT-IR spectrum of partially purified biosurfactant from <i>Bacillus tequilensis</i> Lc9.....	82

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) เป็นสารที่ผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา โดยเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีชั้นเสตรทไม่ละลายน้ำ (water-immiscible substrate) เพื่อใช้ประโยชน์จากสารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและให้พลังงานในการเจริญเติบโต (Karanth *et al.*, 1999) ปัจจุบันมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Deleu and Paquot, 2004) ด้านการเกษตรและการปรับปรุงสิ่งแวดล้อม เช่น การกำจัดโลหะหนักและสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั้งในดินและน้ำ เพิ่มการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (Shepherd *et al.*, 1995; Singh and Cameotra, 2004; Mulligan, 2005) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อได้เปรียบสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ในเรื่องของความสามารถในการย่อยสลายซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ทำให้ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมและเป็นมิตรกับธรรมชาติ (Desai and Banat, 1997) อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งที่ดีในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์มแบคทีเรียจึงสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาเพื่อลดแรงตึงผิวของน้ำมันปาล์มดังกล่าว ทำให้แบคทีเรียสามารถใช้ไขมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์นั้นต้องพยายามลดต้นทุนในการผลิตโดยการเพิ่มผลผลิต อัตราการผลิต ใช้วัตถุดิบราคาถูก ซึ่งอาจเป็นของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมต่างๆ เพื่อให้สามารถแข่งขันกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ได้ ปัจจุบันราคาของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่ขายมีราคาประมาณ 1,467 บาทต่อปอนด์ (48.92\$/1b) (TEKnova, Inc., Hollister, USA.) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม การประยุกต์ใช้วัตถุดิบราคาถูกและหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และศึกษาคุณสมบัติและการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อที่แยกได้เพื่อการประยุกต์ใช้ในโอกาสต่อไป



## ตรวจเอกสาร

### 1. สารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว (surface active agents) สามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthesis biosurfactant) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ผลิตจากสารอินทรีย์ ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งจากแบคทีเรีย ยีสต์และรา (Pornsunthornthawe *et al.*, 2008) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นแบบ amphiphathic molecules ที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างผิวของของเหลว หรือของเหลวกับก๊าซ สารลดแรงตึงผิวมีบทบาทที่สำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ในแต่ละวันมนุษย์ใช้สารลดแรงตึงผิวแทบทุกกิจกรรม เช่น การทำความสะอาดร่างกาย และของใช้ การใช้เครื่องสำอาง การย่อยอาหาร กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรม เป็นต้น นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังมีบทบาทสำคัญในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม เช่น ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ในการกำจัดคราบน้ำมันและสิ่งสกปรก การกำจัดสารแขวนลอยหรือคอลลอยด์ (colloid) ในน้ำ การเลือกประเภทของสารลดแรงตึงผิว ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว รวมถึงสภาวะอื่น ๆ ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการใช้งานต่าง ๆ เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อให้สารลดแรงตึงผิวทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดและไม่สร้างปัญหาให้กับสิ่งแวดล้อม สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่จะสามารถย่อยสลายได้เองในธรรมชาติ ซึ่งความสามารถในการถูกย่อยสลายจะขึ้นกับโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวรวมทั้งปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่เหลืออยู่จากการใช้ การใช้สารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่เหมาะสมนอกจากจะช่วยลดต้นทุนในการบำบัดแล้วยังมีส่วนช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Banat *et al.*, 2000)

#### 1.1 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิวมีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า “surfactant” สารลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ซึ่งส่วนที่ชอบน้ำจะมีทั้งที่มีประจุและไม่มีประจุและประกอบไปด้วยหมู่ของ โมโน (mono-), ได (di-), หรือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide), หมู่คาร์บอกซิลิก, กรดอะมิโนและเปปไทด์ ขณะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำมักจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน คือมีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนใหญ่จะมาจากไขมันและน้ำมันตามธรรมชาติ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมและโพลีเมอร์สังเคราะห์ (Lang, 2002) ลักษณะที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิวคือ เมื่อใส่สารลดแรงตึงผิวเพียงเล็กน้อยลงในน้ำ สารลดแรงตึงผิวจะไปลดแรงตึงผิวของน้ำเพื่อให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ง่ายขึ้น เช่น การเกิดฟอง การทำให้เปียกและกระบวนการทำความสะอาด

สะอาด เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะพยายามหนีน้ำโดยไปเกาะกับพื้นผิวที่ว่าง เช่น อากาศ และส่วนที่ชอบน้ำจะยังคงอยู่ในน้ำ

ค่าแรงตึงผิวมีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวสามารถทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกันได้ เช่น ลดแรงตึงผิวระหว่างของแข็งกับของเหลว ระหว่างของเหลวกับของเหลว และระหว่างของเหลวกับก๊าซ ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นที่ผิวของสารที่สัมผัสกัน เรียกว่า ค่า interfacial tension เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นสูงในตัวทำละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากันด้วยแรงจับกันของสารลดแรงตึงผิว (surfactant self-association) เกิดเป็น โครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ขึ้นซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันนี้เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า critical micelle concentration (CMC) (Fiechter, 1992; Mulligan, 2005) การเกิดไมเซลล์จะมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุด CMC คือค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีกถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย (Fig. 1)

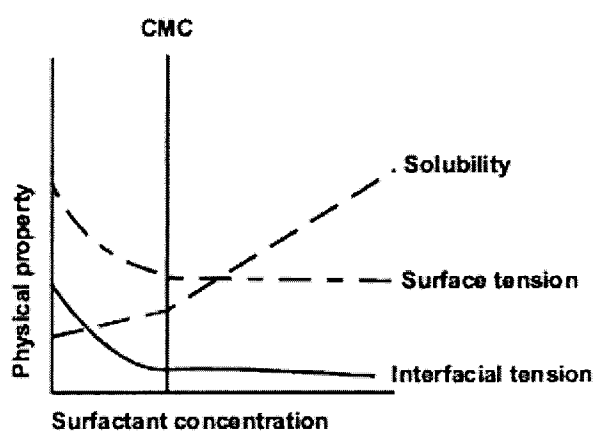


Figure 1. Surface tension, interfacial tension and solubilization as a function of surfactant concentration represents critical micelle concentration (CMC).

ที่มา: Mulligan (2005)

## 2. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกตามลักษณะองค์ประกอบเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

2.1 ไกลโคลิปิด (glycolipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคาร์โบไฮเดรตและลิปิดเป็นองค์ประกอบ โดยการเชื่อมหมู่อีเทอร์และเอสเทอร์ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิดที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ rhamnolipid, trehalolipid และ sophorolipid (Bognolo, 1999)

- Rhamnolipid เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไกลโคลิปิดที่มีการศึกษากันมาก ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) 1-2 โมเลกุล เชื่อมต่อกับ  $\beta$ -hydroxy-decanoic acid 1-2 โมเลกุล (Desai and Banat, 1997) ส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* spp. Kitamoto และคณะ (2002) ศึกษาการผลิต rhamnolipid จากเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าสามารถผลิต rhamnolipid หลายชนิด เช่น RL-1, RL-2, RL-3, RL-4, RL-A และ RL-B (Fig. 2) เมื่อเจริญในอาหารที่มี *n*-alkane, น้ำมันพืช และเอทานอล เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นต้น โดย rhamnolipid ที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* สามารถลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำและ *n*-hexadecane จาก 40 mN/m ให้มีค่า 1 mN/m และสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 mN/m ให้มีค่า 25-30 mN/m นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไฮโดรคาร์บอนในกลุ่มของ alkane และส่งเสริมการเจริญของ *P. aeruginosa* ที่เจริญในอาหารที่มี *n*-hexadecane เป็นองค์ประกอบ (Desai and Banat, 1997)

- Sophorolipid เป็นสารในกลุ่มไกลโคลิปิดซึ่งผลิตจากยีสต์ เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่ดีแต่ไม่มีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดอิมัลชัน (Cooper and Paddock, 1984) พบว่าทั้ง lactonic และ acidic sopharolipid สามารถลดแรงตึงผิวระหว่าง *n*-hexadecane และน้ำจาก 40 mN/m ลงมาอยู่ที่ 5 mN/m รวมทั้งทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและอุณหภูมิได้ดีอีกด้วย (Fig. 5)

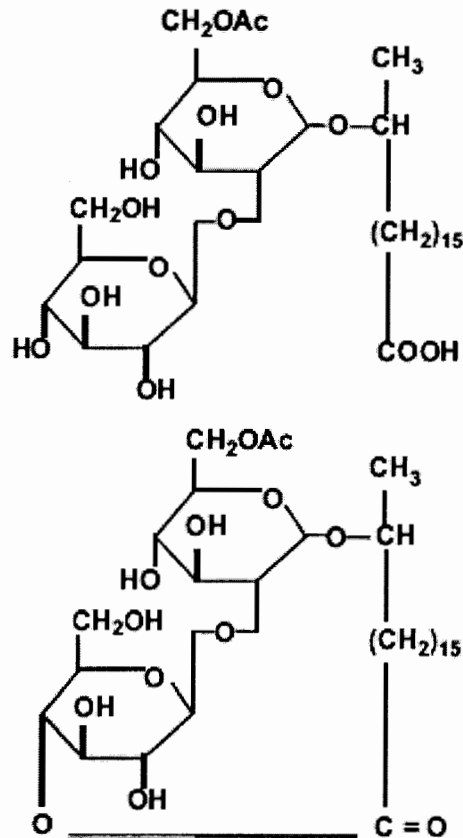


Figure 5. Structure of sophorolipid from *Candida bombicola*.

ที่มา : Cooper และ Paddock (1984)

2.2 ฟอสโฟลิปิด กรดไขมันและนิวทรัลลิปิด (phospholipids, fatty acid and neutral lipid) ฟอสโฟลิปิดมีพันธะเอสเทอร์เกิดขึ้นระหว่างหมู่แอลกอฮอล์ของลิปิดและฟอสเฟต มีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิด แต่มีการสร้างออกมานอกเซลล์เพียงเล็กน้อย สามารถพบได้จาก *Corynebacterium lepus* เช่น ustilagic acid, corymomycolic acid, lipotheichoic acid และ hydrophobic protein (Bognolo, 1999) ซึ่งแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดฟอสโฟลิปิดได้เมื่อใช้ *n*-alkane (Cirigliano and Carman, 1985; Robert *et al.*, 1989)

2.3 สารลดแรงตึงผิวที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactant) เป็นสารที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของหน่วย saccharide และหน่วยของกรดไขมัน มีลักษณะเป็นโพลิเมอร์ในธรรมชาติ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ เช่น emulsan, biodispersan, liposan และชนิดอื่นๆ (Desai and Desai, 1993) เป็นต้น

Rosenberg และคณะ (1979) ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ผลิต emulsan ซึ่งเป็นสารประกอบของ polyanionic amphipathic heteropolysaccharide และโปรตีน (Fig. 6) มีประสิทธิภาพในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดีเพราะใช้ความเข้มข้นต่ำในการทำให้เกิดอิมัลชัน โดยสัดส่วนของ emulsan และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเท่ากับ 1: 100 ถึง 1: 1000 อย่างไรก็ตาม emulsan ไม่สามารถทำให้เกิดอิมัลชันได้ถ้าใช้ aliphatic หรือ aromatic หรือ cyclic hydrocarbon ใดๆ แต่จะเกิดอิมัลชันในกรณีที่เป็นไฮโดรคาร์บอนผสมพบว่า emulsan สามารถอิมัลซิไฟด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Cooper และ Goldenberg (1987) ศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโพลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* พบว่าเป็นโพลิเมอร์ของ D-glucosamine มีสมบัติในการเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีกิจกรรมสูงที่พีเอชต่ำกว่า 7

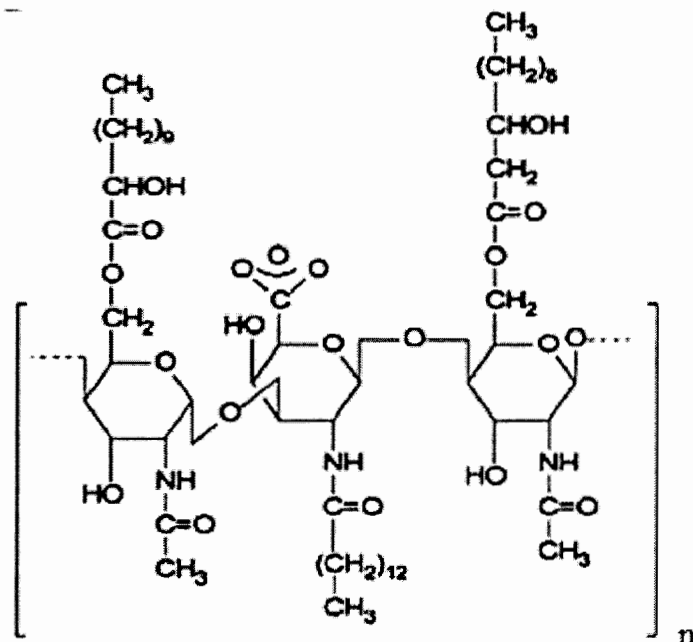


Figure 6. Chemical structure of emulsan produced by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 in which fatty acids are linked to a heteropolysaccharide backbone.

ที่มา : Rosenberg และคณะ (1979)

2.4 ลิโปเปปไทด์และลิโปโปรตีน (lipopeptides and lipoproteins) สารในกลุ่มนี้จะมีไขมันจับอยู่กับสายโพลิเปปไทด์เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Lang, 2002) โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ คือ กรดไขมันและส่วนที่ชอบน้ำ คือ กรดอะมิโนหรือโปรตีน ปกติจะพบกรดอะมิโนประมาณ 5 ถึง 7 โมเลกุลและต่อกันเป็นวงแหวน (cyclic peptide) (Roongsawang *et al.*, 1999) แบบที่เรียกลำดับที่ผลิตสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ผลิต surfactin (Abushady *et al.*, 2005), *Bacillus licheniformis* ผลิต lichenysin C (Li *et al.*, 2008) และ *Thiobacillus thiooxidans* และ *Myroides* sp. SM1 ผลิต ornithine containing lipid (Maneerat *et al.*, 2006) เป็นต้น

Tang และคณะ (2007) ศึกษาโครงสร้างของ surfactin ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณป่าชายเลน โดยใช้วิธี NMR (Nuclear Magnetic Resonance) พบว่าโครงสร้างของ surfactin มี 3 isomers และมีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) แตกต่างกัน 9 แบบ (Fig. 7)

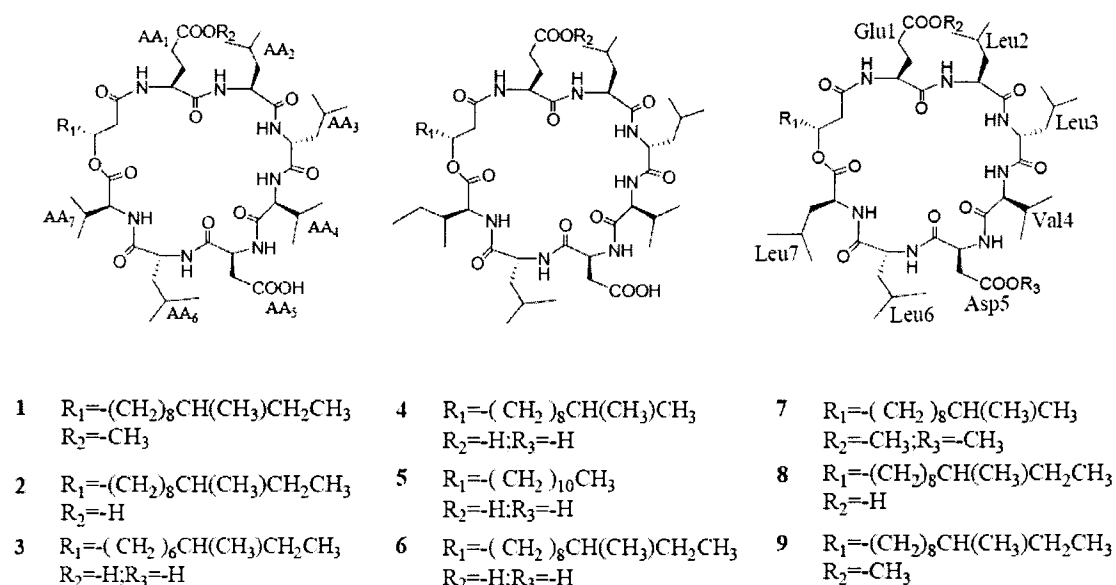


Figure 7. Structure of surfactin isomers from *Bacillus* sp.

ที่มา : Tang และคณะ (2007)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแสดงในตารางที่ 1

Table 1. Type and microbial origin of biosurfactants.

Type of biosurfactant	Microorganism
Trehalose lipids	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia</i> sp.
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serratia rubidea</i>
Sophorose lipids	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>
Glycolipids	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>R. erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Tsukamurella</i> sp.
Cellobiose lipids	<i>Ustilago maydis</i>
Polyol lipids	<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>
Diglycosyl diglycerides	<i>Lactobacillus fermentii</i>
Lipopolysaccharides	<i>Acinetobacter calcoaceticus (RAG-1)</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida lipolytica</i>
Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp.
Lichenysin A, Lichenysin B	<i>Bacillus licheniformis</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ornithine, lysine peptides	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Streptomyces sioyaensis</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i>
Phospholipids	<i>Acinetobacter</i> sp.
Sulfonylipids	<i>T. thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>
Fatty acids (corynomycolic acids, spiculisporic acids, etc.)	<i>Capnocytophaga</i> sp., <i>Penicillium spiculisporem</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Talaromyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Streptofactin	<i>Streptomyces tendae</i>
Particulate surfactant (PM)	<i>Pseudomonas marginalis</i>
Biosur PM	<i>Pseudomonas maltophilia</i>

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mulligan และ Gibbs (1993)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถจำแนกตามน้ำหนักโมเลกุลเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low-molecular-weight biosurfactant) คุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้ คือ การลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว กลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ ไกลโคลิปิด เช่น rhamnolipid, trehalolipid และ sophorolipid โดยเป็นสารพวก disaccharides ซึ่งถูก acylate ด้วย long chain fatty acid หรือ hydroxyl fatty acid และลิโปเปปไทด์ (Ron and Rosenberg, 2001)

2) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง (High-molecular-weight biosurfactant) คุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับความคงตัวของอิมัลชัน แบคทีเรียสามารถติดอยู่กับพื้นผิวที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ได้ดีขึ้นทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารชีวภาพได้ สารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ลิโปโพลีแซคคาไรด์ ลิโปโปรตีนหรือสารละลายเชิงซ้อนจากการรวมตัวของสารโพลีเมอร์ชีวภาพดังกล่าว (Ron and Rosenberg, 2001)

### 3. การสร้างสารลดแรงตึงผิวโดยจุลินทรีย์

ลักษณะการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 รูปแบบดังนี้

3.1 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญของเซลล์ (growth-associated biosurfactant production) ลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการเจริญเติบโตของเซลล์และอัตราการเกิดของผลิตภัณฑ์มีความสัมพันธ์กับจำนวนของจุลินทรีย์ ตัวอย่างการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลักษณะนี้ ได้แก่ การผลิตไกลโคโปรตีนโดย *P. fluorescens* 378 (Robert *et al.*, 1989)

3.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะจำกัดการเจริญ (biosurfactant production by growing cell under growth-limiting condition) ลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นในภาวะที่จำกัดปริมาณของแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ อาหารที่จำเป็นต่อการเจริญโดยทั่วไปจะเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยทั่วไปรูปแบบการจำกัดจะจำกัดแหล่งไนโตรเจนให้หมดในเวลาที่เหมาะสมและควบคุมให้ภาวะการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบมีแหล่งคาร์บอนเพียงพอ

การเพิ่มขึ้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีความสัมพันธ์ทั้งในช่วงที่เชื้อกำลังเจริญเติบโตและช่วงที่เซลล์หยุดการเจริญซึ่งจุลินทรีย์จะซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์ ตัวอย่างเช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P. aeruginosa* เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจนถึงภาวะที่



ปริมาณของไนโตรเจนในอาหารหมักจะมีผลทำให้เซลล์มีอัตราการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงมากขึ้น (Robert *et al.*, 1989) นอกจากนี้จะจำกัดปริมาณของแหล่งไนโตรเจนแล้วยังมีผู้ศึกษาการจำกัดปริมาณของฟอสเฟต พบว่าที่ปริมาณฟอสเฟตน้อย ๆ จะช่วยกระตุ้นให้ *P. aeruginosa* ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมามากขึ้น (Mulligan *et al.*, 1989)

3.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงระยะพักของเซลล์ (biosurfactant production by resting cells) เป็นภาวะการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เซลล์ที่อยู่ในระยะพักเป็นหัวข้อ โดยเชื้อยังสามารถสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หรือกล่าวได้ว่าอัตราการเกิดของผลิตภัณฑ์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของจุลินทรีย์โดยตรง ตัวอย่างที่พบ เช่น การผลิต rhamnolipid โดย *P. aeruginosa* CFTR-6 ที่อยู่ในระยะพัก ค่าของความเข้มข้นของเซลล์ตลอดระยะเวลาที่ทำการเลี้ยงจะมีค่าคงที่ ขณะที่การผลิตไกลโคลิปิดจะเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงด้วยอัตราคงที่ที่ 29.5 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจะหยุดการผลิตไกลโคลิปิดหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของไกลโคลิปิดที่ทำการวัดได้โดยเฉลี่ยมีค่าเป็น 450 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ramana and Karanth, 1989)

3.4 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเติมสารตั้งต้น (biosurfactant production by microbial cell and addition of precursors) เป็นกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดยการเติมสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิว มีผลทำให้ผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและคุณภาพ

#### 4. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Batista และคณะ (2006) แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน แหล่งน้ำ น้ำทะเลและตะกอนป่าชายเลน โดยเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วไป spread plate บนอาหาร R2A agar มีองค์ประกอบ (g/l) คือ yeast extract, 0.5; peptone, 0.5; casamino acids, 0.5; soluble starch, 0.5;  $K_2HPO_4$ , 0.3;  $MgSO_4$ , 0.05; sodium pyruvate, 0.3; agar, 15 ที่มีน้ำมันปิโตรเลียมร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.2 พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 185 ไอโซเลต โดย 155 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop collapse test มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 19 ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตไปทดสอบแรงตึงผิวและการเกิดอิมัลชัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลตสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

Pornsunthorntawe และคณะ (2008) แยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่าง oil sludge ดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม น้ำทะเลและน้ำเสีย โดยเจือจาง

ตัวอย่างแบบ serial dilution นำตัวอย่างที่เจือจางไป spread plate บนอาหาร NA (nutrient agar) ที่มีน้ำมันเคลือบอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีที่เกิดวงใสรอบๆ พบเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าว 26 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวน่าจะมีคุณสมบัติสามารถนำน้ำมันไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้เลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NA และมีน้ำมันปลาต้มร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* PT2 และ *P. aeruginosa* SP4 สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดจาก 47 mN/m เป็น 30 mN/m

Anandaraj และ Thivakaran (2010) แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ โดยนำตัวอย่างดิน 5 กรัม เลี้ยงในอาหาร R2B (Batista *et al.*, 2006) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้เจือจางในน้ำกลั่นให้มีความเจือจาง  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  นำไป spread plate บนอาหาร R2A บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่เจือจาง  $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  สามารถนับโคโลนีได้ทั้งหมด 332 โคโลนี เลี้ยงเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลวตามสภาวะข้างต้น เป็นเวลา 7 วัน พบเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบด้วยวิธี oil displacement area (ODA) จากนั้นจำแนกเชื้อโดยใช้ตามวิธี Bergey's Manual พบว่าเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อ *Pseudomonas* sp.

## 5. การวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

วิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้คุณสมบัติด้านความสามารถในการลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว การทดสอบด้วยวิธีการที่จำเพาะ เช่น การทดสอบการย่อยเม็ดเลือด โดยใช้ blood agar method เป็นต้น นอกจากนี้ การทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังทำได้ทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative) และเชิงปริมาณ (quantitative) อีกด้วย (Walter *et al.*, 2010)

### 5.1 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเชิงคุณภาพ (qualitative measurement)

5.1.1. Drop-collapse test เป็นการตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์แบบรวดเร็ว โดยนำ culture supernatant ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาณน้อยๆ ไปทดสอบโดยการหยด culture supernatant ลงบนน้ำมันที่เคลือบผิว polystyrene ของ 96-microwell หากเชื้อมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหยดของ culture supernatant จะแบนราบเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่าง culture supernatant กับผิว

polystyrene ของ 96-microwell แต่ถ้าเชื้อไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รูปร่างของหยด culture supernatant จะไม่เปลี่ยนแปลง (Bodour *et al.*, 2003; Tugrul and Cansunar, 2005)

5.1.2. Oil displacement test เป็นวิธีการทดสอบสารลดแรงตึงผิวหรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยหยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อลงบนผิวของแผ่นฟิล์มน้ำมันหากมีสารลดแรงตึงผิวอยู่ในสารละลาย สารลดแรงตึงผิวจะทำหน้าที่ลดแรงตึงระหว่างสารละลายและน้ำมันทำให้แผ่นฟิล์มของหยดน้ำมันแยกออก โดยหยดน้ำมันปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 40 ไมโครลิตร ซึ่งอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางหยดน้ำมันเบาๆ ถ้ามีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแผ่นฟิล์มของน้ำมันจะแยกออก สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 30 วินาที (Morikawa *et al.*, 1993; Maneerat and Phetrong, 2007)

Safary และคณะ (2010) แยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทะเลจากทะเลสาปแคสเปียนในประเทศอิหร่าน โดยเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันบนอาหาร mineral salt agar ที่มีน้ำมันดิบร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนจำนวน 10 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต สามารถทำให้แผ่นฟิล์มของหยดน้ำมันแยกออกเมื่อนำไปทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี oil displacement test

Thenmozhi และ Nagasathya (2010) แยกเชื้อแบคทีเรียจากดินปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์จำนวน 25 ไอโซเลต โดยเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันบนอาหาร mineral salt agar ที่มีน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลต สามารถทำให้แผ่นฟิล์มของหยดน้ำมันแยกออกเมื่อทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี oil displacement test

## 5.2 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเชิงปริมาณ (quatitative measurement)

5.2.1. การวัดแรงตึงผิว (surface tension) แรงตึงผิว คือ แรงตึงที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของของเหลวเมื่อสัมผัสกับพื้นผิวอื่น เช่น อากาศ หรือกับของแข็ง โดยมีพลังงานเพียงพอต่อการยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลทำให้เกิดเป็นลักษณะคล้ายกับแผ่นบางๆ ที่สามารถต้านแรงตึงได้เล็กน้อย มีทิศขนานกับผิวของเหลวและตั้งฉากกับเส้นขอบที่ของเหลวสัมผัส การเกิดแรงตึงผิวเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ แรง cohesion เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลชนิดเดียวกันและแรง adhesion เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลต่างชนิดกัน ซึ่งมีหน่วยในการวัดเป็น mN/m (International System of Units) หรือ dyne/cm (Metric system) ปกติสารลดแรงตึงผิวสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 mN/m ลงมาต่ำกว่า 30 mN/m และค่า interfacial tension

จะมาก่าต่ำกว่า 1 mN/m (Cooper, 1986; Desai and Banat, 1997; Crosman *et al.*, 2002; Youssef *et al.*, 2004)

Bodour และ Maier (1998) และ Bodour และคณะ (2003) ทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเชิงปริมาณ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงครบ 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปวัดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Tensiomat เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น พบว่าเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 68 dyne/cm ลงมาอยู่ที่ 27-42 dyne/cm

Aparna และคณะ (2012) ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus clausii* 5B ที่แยกได้จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ  $KNO_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดแรงตึงผิว พบว่าเชื้อจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 mN/m ลงมาอยู่ที่ 33.4 mN/m

5.2.2. emulsification measurement จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมาสามารถทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดเป็นอิมัลชันได้ดีขึ้น (Fiechter, 1992) การวัดการเกิดอิมัลชันนิยมวัดค่า emulsification activity (EA) และค่า emulsification index ( $E_{24}$ ) โดยนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับ xylene ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที ( $E_A$ ) และ 24 ชั่วโมง ( $E_{24}$ ) และคำนวณค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ( $E_A$ ) และความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion index,  $E_{24}$ ) ตามลำดับ ดังสมการ (Cooper and Goldenberg, 1987)

$$EA \text{ หรือ } E_{24} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชันที่เกิดขึ้น}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}} \times 100$$

Sahoo และคณะ (2010) ศึกษากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีการวัดแรงตึงผิวโดยใช้ du Nouy ring method และการเกิดอิมัลชันโดยการวัดค่า emulsification index ( $E_{24}$ ) พบว่าเชื้อโอโซเลต OCD1 สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 mN/m เป็น 36.8 mN/m และให้ค่า  $E_{24}$  เท่ากับร้อยละ 47.45

## 6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารที่เหมาะสมแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นพลังงาน ในกิจกรรมต่างๆและใช้ผลิตสารตั้งต้นในกระบวนการสลายพลังงานเพื่อนำไปผลิตสารประกอบที่ เซลล์ต้องการในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สูตรอาหารส่วนใหญ่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ นอกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วยังมีสถานะอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศ เป็นต้น

6.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source) แหล่งคาร์บอนสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แหล่งคาร์บอนที่ใช้มีทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ชนิดที่ละลายน้ำ เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอลและเอทานอล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น *n*-alkanes และ น้ำมันมะกอก แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตจึงมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอย่างมาก (Robert *et al.*, 1989; Panilaitis *et al.*, 2007; Abouseoud *et al.*, 2008)

### 6.1.1 แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ

Kim และคณะ (1997) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* C9 พบว่า แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญมากในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* C9 โดยทดลองใช้กลูโคส, *n*-hexadecane และน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวที่เชื้อสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำหมักได้ สูงสุด จาก 72.8 เป็น 28.2 dyne/cm

Reis และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* ATCC 6633 โดยใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก ได้แก่ น้ำตาลซูโครส กากน้ำตาล น้ำคั้นจากอ้อย น้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อต่ำที่สุดจาก 68.8 dyne/cm เป็น 30.6 dyne/cm

Batista และคณะ (2006) ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการเกิดอิมัลชันโดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม ใช้  $KNO_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจนและใช้กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส และ kerosene เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อเจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้นร้อยละ

2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน โดยลดแรงตึงผิวของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 72 mN/m เป็น 35.8 mN/m

Joshi และคณะ (2008) ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *B. subtilis* 20B ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ กลูโคส, มอลโตส, ฟรุกโตส, ซูโครส, แล็กโตส, กากน้ำตาล, เวย์, เมทานอล, เอทานอลและ โพรพานอล และแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ heptane, kerosene, น้ำมันจากเมล็ดฝ้ายและพาราฟินเหลว พบว่าเชื้อ *B. subtilis* 20B สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนทุกชนิด แต่เจริญได้ดีเมื่อใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถลดค่าแรงตึงผิวลงต่ำที่สุดจาก 55.0 mN/m เป็น 30.5 mN/m การใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* 20B จะเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ไม่ดี เนื่องจากแอลกอฮอล์จะเป็นพิษกับเซลล์และการใช้น้ำมันเมล็ดฝ้ายเชื้อ *B. subtilis* 20B เจริญได้ดีแต่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ไม่ดีเนื่องจากน้ำมันเมล็ดฝ้ายมีสารโพลีฟีนอลซึ่งอาจยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Das และคณะ (2009) ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ กลีเซอรอล แป้ง กลูโคส และซูโครส ที่มีผลในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล คือ *B. circulans* พบว่าการใช้ กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุดในปริมาณใกล้เคียงกัน 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 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน เติบโตเร็ว ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 6.1.2 แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ

Pornsunthontawee และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* PT2 และ *P. aeruginosa* SP4 เลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 2-8 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *B. subtilis* PT2 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ไม่แตกต่างกันเมื่อใช้น้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 2-8 โดยปริมาตร โดยสามารถลดแรงตึงผิวจากอาหารเลี้ยงเชื้อลงมาร้อยละ 43.62 และเชื้อ *P. aeruginosa* SP4 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี

ที่สุดเมื่อใช้น้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร โดยสามารถลดแรงดึงผิวจากอาหารเลี้ยงเชื้อลงมาร้อยละ 39.22

Fagade และคณะ (2009) ศึกษาการใช้ น้ำมันดิบ, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันดีเซลและ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *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 ที่แยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน โดยใช้อาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี  $\text{NH}_4\text{Cl}$  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 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า  $E_{24}$  อยู่ที่ร้อยละ 30-55 และเชื้อ *B. subtilis* BS 58 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันดิบหรือน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า  $E_{24}$  เท่ากับร้อยละ 50

ปัจจุบันมีการตระหนักถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีเพราะสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีสามารถทำลายสิ่งแวดล้อมได้ ถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่ถูกต้องและมีการนำสารลดแรงดึงผิวผิดประเภทมาใช้ ดังนั้นสารลดแรงดึงผิวที่ได้จากแบคทีเรียเป็นสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมส่งผลให้ความต้องการใช้เพิ่มมากขึ้นและอาจสามารถเข้ามาแทนที่สารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีได้ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ด้วยเหตุผลนี้ผลของแหล่งคาร์บอนจึงเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยแบคทีเรีย ซึ่งการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ก็จะผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพได้สูง รวมถึงทำการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเศษเหลือจะทำให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง ซึ่งอาจจะช่วยให้สามารถแข่งขันกับสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีได้

6.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพด้วยเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์

#### 6.2.1 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen)

Gnanamani และคณะ (2010) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ beef extract, ยีสต์สกัดและเปปโตเน เดิมในอาหาร mineral medium ใช้น้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากน้ำทะเล

ตะกอนป่าชายเลน หอยและทรายบริเวณชายหาดในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลต ESW Na12s สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นจาก 72 mN/m เหลือ 25 mN/m

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ ยูเรีย, เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน, 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 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 6.2.2 แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen)

Abushady และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* BBk1 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอช 6.5-7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ประกอบด้วย  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{NH}_4\text{Mo}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$  และ  $\text{NaNO}_3$  และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ประกอบด้วย ยูเรีย, ยีสต์สกัด, beef extract และเคซีนไฮโดรไลเซท เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์และไนโตรเจนอินทรีย์ แต่เชื้อ *B. subtilis* BBk1 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุด 2.75 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$  ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน

Fonseca และคณะ (2007) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ , ยูเรียหรือยีสต์ที่เหลือจากการหมักเบียร์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.14 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีน้ำตาลทราย ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* ปรับพีเอชเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเติม  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุดจาก 66.7 mN/m ลงมาอยู่ที่ 31.5 mN/m ค่าแรงตึงผิวลดลงคิดเป็นร้อยละ 52.8 โดยที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง



Younis และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *B. subtilis* KO เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  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

Aparna และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus clausii* 5B ที่แยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม เลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ยีสต์สกัด, เปปโตน,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ยูเรียหรือ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อ *B. clausii* 5B สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 2.41 กรัมต่อลิตร เมื่อเติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เป็นแหล่งไนโตรเจนและสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 53.56 mN/m ลงมาอยู่ที่ 29.48 mN/m

6.3 แร่ธาตุ (mineral source) ปกติจะมีการเติมแร่ธาตุลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการสร้างหรือเป็นองค์ประกอบของสารที่จำเป็นในการดำรงชีวิต แร่ธาตุสำคัญ เช่น ซัลเฟตและฟอสเฟต จุลินทรีย์ใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน แร่ธาตุนอกจากจะเป็นปัจจัยที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโตแล้วยังมีผลในการยับยั้งหรือกระตุ้นการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

Wei และคณะ (2007) ศึกษาผลของการใช้แร่ธาตุ 5 ชนิดเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  และ  $\text{Ca}^{2+}$  ต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็นอาหารที่มีแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด ทำการทดสอบผลของแร่ธาตุแต่ละตัวต่อการผลิต surfactin โดยไม่เติมแร่ธาตุที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม  $\text{K}^+$  เชื้อมีการเจริญและการผลิต surfactin จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติม  $\text{Mg}^{2+}$  เชื้อจะไม่ผลิต surfactin เลย แสดงว่า  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{K}^+$  ส่งผลต่อการผลิตอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นศึกษาปริมาณและอัตราส่วนระหว่างแร่ธาตุทั้งสองต่อการผลิต surfactin พบว่าเมื่อใช้ปริมาณและอัตราส่วนของ  $\text{Mg}^{2+}$  ต่อ  $\text{K}^+$  3:1 เชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 สามารถผลิต surfactin เพิ่มขึ้นสองเท่า แสดงว่าปริมาณ  $\text{Mg}^{2+}$  ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อควรเป็น 3 เท่าของปริมาณ  $\text{K}^+$  ขณะเดียวกันเมื่อดูผลของอัตราส่วนที่เท่ากันของ  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{K}^+$  เช่นที่อัตราส่วน 1:1, 2:2, 3:3 จะให้ผลผลิตต่างกันแสดงว่าปริมาณเป็นตัวแปรสำคัญในการผลิต surfactin โดยเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 เช่นกัน

6.4 พีเอช พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมและการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลกระทบจากค่าพีเอช โดยทั่วไปค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ราและยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่มีค่าเป็นกลาง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรืออัลคาไลน์อื่นๆ ออกมาทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงขึ้น (Park and Lee, 1998; Nagal and Jain, 2010) แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (Zhao *et al.*, 2009) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์

Abushady และคณะ (2005) ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *B. subtilis* BBk 1 เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักรวมและ  $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5-9 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *B. subtilis* BBk 1 ผลิต surfactin สูงสุดที่พีเอช 6.5 ผลิตได้มากกว่า 2.5 กรัมต่อลิตร และที่พีเอช 6.5-8 ไม่มีผลต่อการผลิต surfactin

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 พบว่าเชื้อเจริญได้ที่พีเอชในช่วง 5-9 และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุดที่พีเอช 7.37 สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดที่ 34 mN/m

El-sersy (2012) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. 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 สูง

ที่สุด เท่ากับร้อยละ 86 แต่เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 6 พบว่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวจะลดลงอย่างรวดเร็ว

6.5 อุณหภูมิ (temperature) จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน ถ้าจุลินทรีย์เจริญในอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเจริญได้เร็วและอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย เชื้อ *B. subtilis* N10 จะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า EA มากกว่าร้อยละ 80 (El-sersy, 2012) เป็นต้น

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

Gogotov และ Miroshnikov (2009) ศึกษาผลของอุณหภูมิตั้งที่ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. licheniformis* VKM B-511 ที่เลี้ยงในอาหาร mineral medium ใช้ kerosene ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักและ  $\text{NaNO}_3$  เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรและให้ค่าความสามารถในการคงตัวของอิมัลชันเท่ากับร้อยละ 41

6.6 การกวนและการให้อากาศ (agitation and aeration) การกวนและการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอยสามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น (Desai and Banat, 1997) ส่วนการกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ช่วยลดขนาดของฟองอากาศให้เล็กลงทำให้มีผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับจุลินทรีย์มากขึ้น

Yeh และคณะ (2006) ศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าการกวนที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่ระดับ 1.5 vvm อัตราการผลิต surfactin สูงสุดที่ระดับ 190 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Fonseca และคณะ (2007) ศึกษาผลของการกวนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด ลิโปเปปไทด์จากเชื้อ *B. subtilis* ในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาลทราย ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เขย่าด้วยความเร็วรอบต่างกันคือ 50, 150 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 และ 150 รอบต่อนาที กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 66 mN/m ลงมาอยู่ที่ 39-40 mN/m แต่เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นเป็น 250 รอบต่อนาที สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้นจาก 66 mN/m ลงมาอยู่ที่ 35 mN/m

## 7. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 7.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Nitschke และ Pastore (2006) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* ที่อุณหภูมิต่างกันคือ 0-121 องศาเซลเซียสตามลำดับ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส โดยค่าแรงตึงผิวค่อนข้างคงที่ที่ 26.6 mN/m นอกจากนี้ยังศึกษาการเก็บรักษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน พบว่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่เปลี่ยนแปลง

Al-Bahry และคณะ (2012) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* B20 ที่อุณหภูมิ 40, 60, 70, 80, 90, 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที โดยวัดการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงในช่วง 40-100 องศาเซลเซียส โดยค่าแรงตึงผิวค่อนข้างคงที่ที่ 27 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวจะคงที่ที่อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 mN/m เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส ค่าแรงตึงระหว่างผิวเพิ่มขึ้นมากกว่า 5 mN/m

Vaz และคณะ (2012) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* EG1 เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ LAS, Findet® 1214N/23, Glucopone® 215 และ Glucopone® 650 ที่อุณหภูมิ 20, 37 และ 46 องศาเซลเซียส โดยดูการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงตึงผิว พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีลดลงเล็กน้อย โดยค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* EG1, LAS, Findet® 1214N/23, Glucopone® 215 และ Glucopone® 650 ลดลงคิดเป็นร้อยละ 3.2, 1.5, 4.0, 2.6 และ 3.5 ตามลำดับ

## 7.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Nitschke และ Pastore (2006) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* ปรับพีเอชในช่วง 2-12 ตามลำดับ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงตึงผิว พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่พีเอชกว้างในช่วง 5-11 มีค่าแรงตึงผิวอยู่ระหว่าง 26-28 mN/m แต่ที่พีเอชต่ำกว่า 5 มีการสูญเสียกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางส่วนเกิดการตกตะกอนทำให้ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจาก 26 mN/m เป็น 40 mN/m

Al-Bahry และคณะ (2012) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* B20 ที่พีเอช 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ โดยวัดการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่พีเอชในช่วง 6-10 โดยค่าแรงตึงผิวอยู่ระหว่าง 30-40 mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยที่พีเอชในช่วง 6-12 โดยมีค่าแรงตึงระหว่างผิวระหว่าง 7.5-12 mN/m

Vaz และคณะ (2012) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* EG1 โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงตึงผิวที่พีเอช 3-10 ตามลำดับ พบว่า ค่าแรงตึงผิวลดลงมากที่สุดเท่ากับ 29.9 mN/m ที่พีเอชระหว่าง 5.5-6.0 และที่พีเอช 5-10 ค่าแรงตึงผิวค่อนข้างคงที่ที่ 30 mN/m แต่เมื่อค่าพีเอชต่ำกว่า 5 เริ่มสูญเสียกิจกรรมการลดแรงตึงผิวอย่างรวดเร็ว เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางส่วนเกิดการตกตะกอน จนกระทั่งค่าพีเอชเป็น 2 ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นเป็น 53 mN/m

## 7.3 ความเข้มข้นของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Nitschke และ Pastore (2006) ศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* โดยเติมเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-25 ตามลำดับ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวต่อเกลือที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20 มีค่าแรงตึงผิวอยู่ระหว่าง 26-27 mN/m และเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงกว่าร้อยละ 20 มีการสูญเสียกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจาก 26 mN/m อยู่ที่ประมาณ 40 mN/m

Al-Bahry และคณะ (2012) ศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* B20 เติม NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0-20 โดยน้ำหนักตามลำดับ วัดการเปลี่ยนแปลงค่าแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว พบว่าค่าแรงตึงผิวเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น โดยค่าแรงตึงผิวของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่เติม NaCl อยู่ที่ประมาณ 30 mN/m เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl เป็นร้อยละ 1 ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นอยู่ที่ประมาณ 34 mN/m และที่ความเข้มข้นของเกลือมากกว่าร้อยละ 6 ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นมากกว่า 40

mN/m และค่าแรงตึงระหว่างผิวจะคงที่ที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 1-4 อยู่ที่ประมาณ 7.5 mN/m แต่เมื่อความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 4 ค่าแรงตึงระหว่างผิวค่อย ๆ เพิ่มขึ้นทีละน้อย

## 8. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

8.1 การตกตะกอนด้วยกรด หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ตามระยะเวลาที่เหมาะสม นำ culture supernatant มาตกตะกอนด้วยกรด ซึ่งอาจจะใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Priya and Usharani, 2009) หรือที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ (Salehizadeh and Mohammadizad, 2009; Zhi-feng *et al.*, 2010) แล้วตกตะกอนซ้ำครั้งที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนและนำตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีการปรับพีเอชให้เท่ากับพีเอชที่ใช้ตกตะกอน ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย 2 N NaOH จากนั้นอาจสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Priya and Usharani, 2009; Salehizadeh and Mohammadizad, 2009; Zhi-feng *et al.*, 2010)

8.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ตามระยะเวลาที่เหมาะสม นำ culture supernatant ไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น การใช้คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (65:15) สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* CCTCC (Zhi-feng *et al.*, 2010) หรือใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Rhodococcus* sp. (Kuyukina *et al.*, 2001) หรือใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* 27 และ *Bordetella hinizi* DAFI (Bayoumi *et al.*, 2010) แล้วแยกชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์นำไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกเพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป (Kuyukina *et al.*, 2001; Bayoumi *et al.*, 2010)

8.3 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ตามระยะเวลาที่เหมาะสม นำ culture supernatant ไปตกตะกอนโดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 45-65 ตั้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนไปกำจัดเกลือโดยใช้วิธี dialysis จากนั้นนำมาทำแห้งด้วยวิธี lyophilized หรือ freeze dry (Rosenberg *et al.*, 1979; Kaplan and Rosenberg, 1982; Rosenberg *et al.*, 1988; Navon-Venezia *et al.*, 1995) แล้วนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

## 9. การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ประโยชน์

เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตออกมาจึงมีความหลากหลาย โดยมีโครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป จึงสามารถเลือกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ประโยชน์ตามความเหมาะสมได้

9.1 ส่งเสริมการย่อยสลายและการเกิดอิมัลชันของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารประกอบไฮโดรคาร์บอนส่วนใหญ่เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย โดยเฉพาะสาร polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) มีการดูดซับกับอนุภาคดินค่อนข้างสูงซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ การเพิ่มการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ง่ายขึ้น โดยการทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดเป็น droplet หรืออิมัลชัน ทำให้มีพื้นที่ผิวเพิ่มมากขึ้น จุลินทรีย์จะไปเกาะบริเวณพื้นผิวของไฮโดรคาร์บอนได้มากขึ้นทำให้จุลินทรีย์นำสารดังกล่าวเข้าสู่เซลล์และกระบวนการเกิดเมตาบอลิซึมได้ง่ายขึ้น

9.2 การกำจัดโลหะหนัก (bioremediation) rhamnolipid มีความสามารถในการกำจัดสารแคดเมียม, ตะกั่วและสังกะสีจากดิน (Herman *et al.*, 1995) ซึ่งกลไกในการกำจัดโลหะหนักของ rhamnolipid คือ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ rhamnolipid กับแคดเมียมและการทำปฏิกิริยาของ rhamnolipid ต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์นำโลหะหนักเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้โพลีแซกคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactant) สามารถจับกับโลหะหนักและทำให้เกิดการตกตะกอนของโลหะหนัก เช่น การจับกับยูเรเนียมของ emulsan (Zosim *et al.*, 1983)

9.3 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มลิโปเปปไทด์ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

He และคณะ (2001) พบว่า circulocins ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. circulans* J2154 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อราปฏิชีวนะโดยใช้วิธี agar dilution method พบว่า circulocins ที่ความเข้มข้น 2-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี (*Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus* GC 4546, *Enterococcus faecalis*, *Ent. faecium*, *Micrococcus luteus* GC 4562) รวมถึงแบคทีเรียที่คือคือราปฏิชีวนะ นอกจากนี้ circulocins ที่ความเข้มข้นมากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*) และยีสต์บางสายพันธุ์ (*Candida albicans* GC 3066) ได้

Yu และคณะ (2002) ศึกษาผลของ iturin A ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion test พบว่า iturin A มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และเชื้อราก่อโรคในพืชได้

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

9.4 การกำจัดน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน กระบวนการสำคัญที่ช่วยให้สารลดแรงตึงผิวสามารถกำจัดน้ำมันที่ปนเปื้อนในดินได้มี 2 กระบวนการ คือ mobilization mechanism เกิดขึ้นเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าค่า CMC โดยสารลดแรงตึงผิวสามารถลดค่าแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิว ลดค่า capillary force และค่า contact angle ระหว่าง air/water, oil/water และ soil/water ได้ ทำให้น้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกาะติด (adsorbed) อยู่กับอนุภาคดินหลุดออกมาได้ อีกกระบวนการ คือ solubilization mechanism การละลายของน้ำมันเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากการเกิดเป็นไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิว โดยส่วนที่เป็น hydrophobic ของสารลดแรงตึงผิวจะจับกับส่วนที่เป็นน้ำมันและส่วนที่เป็น hydrophilic จะหันออกไปยัง aqueous phase ซึ่งอยู่ด้านนอก ทำให้เกิดลักษณะที่เป็นไมเซลล์หรือเกิดการละลายมากขึ้น (Urum *et al.*, 2006)

Lai และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดน้ำมันปนเปื้อนในดิน ได้แก่ rhamnolipid ผลิตจาก *P. aeruginosa*, surfactin ผลิตจาก *B. subtilis*, serrawettin ผลิตจาก *S. marcescens* และ novel bioemulsifier ผลิตจาก *Agrobacterium* sp. พบว่าความสามารถในการกำจัดน้ำมันของ rhamnolipid และ surfactin ดีกว่า serrawettin และ novel bioemulsifier เมื่อเปรียบเทียบกับ rhamnolipid และ surfactin กับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ได้แก่ Tween 80 และ Triton X-100 ในดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน 2 ชุด ได้แก่ ดินชุดที่มีน้ำมันปนเปื้อนประมาณ 3,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กิโลกรัม (LTC) และดินชุดที่มีน้ำมันปนเปื้อนประมาณ 9,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กิโลกรัม (HTC) พบว่าความสามารถในการกำจัดน้ำมันของ rhamnolipid และ surfactin ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทั้งสองชนิด



จากคุณสมบัติในการกำจัดน้ำมันปนเปื้อนในดินของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บเกี่ยวน้ำมันที่เหลืออยู่ในถังเก็บน้ำมัน ทำให้เก็บเกี่ยวออกมาใช้ประโยชน์ได้โดยการใช้เทคโนโลยีที่เรียกว่า microbially-enhanced oil recovery (MEOR) เนื่องจากน้ำมันที่เหลืออยู่ในถังเก็บน้ำมันมีความหนืดสูงและมีแรงตึงผิวระหว่างชั้นน้ำและน้ำมันสูง ส่งผลให้มีการเคลื่อนที่ต่ำ การเก็บเกี่ยวน้ำมันส่วนที่เหลือต้องใช้วิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกัน เช่น pressurization หรือ waterflooding หรือ steaming หรือการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ แต่การใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์อาจจะเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและมีราคาแพง

Pornsunthorntawe และคณะ (2008) ศึกษาการใช้วิธี MEOR ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้วิธี sand-pack columns พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* PT2 และ *P. aeruginosa* SP4 สามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันได้ร้อยละ 61.62 และ 57.01 ตามลำดับ ซึ่งเก็บเกี่ยวน้ำมันได้สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ Tween 80, sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS) และ Alfoterra 145-5PO ที่สามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันได้ร้อยละ 52.74, 51.27 และ 55.12 ตามลำดับ

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างดินและน้ำซึ่งเก็บมาจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
2. เพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
4. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
5. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้
6. เพื่อศึกษาโครงสร้างบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

### ขอบเขตงานวิจัย

เก็บตัวอย่างดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์มจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีที่สุดมา 1 สายพันธุ์ เพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับฟลาสก์ โดยศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน สภาวะการเขย่า ความเข้มข้นของกล้ำเชื้อ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นศึกษาวิธีในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คุณลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ตลอดจนศึกษาโครงสร้างบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

#### วัสดุและอุปกรณ์

##### 1. ตัวอย่างเพื่อใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างตัวอย่างดิน น้ำทิ้งและกากของเสียในบริเวณที่มีน้ำมันปาล์มปนเปื้อน เพื่อใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย โดยคาดหวังว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มี น้ำมันปาล์มปนเปื้อนน่าจะมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของน้ำมันปาล์ม ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียนำน้ำมันปาล์มที่ใช่แล้วไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่ายขึ้น ดังนั้นจึงเก็บตัวอย่างจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ใต้อุบลราชธานี หนึ่งจุดต่อหนึ่งตัวอย่าง จำนวน 54 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

ตัวอย่างจากบริษัททักษิณปาล์ม (2521) จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 31 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม 20 ตัวอย่าง น้ำเสียจากบ่อบำบัด 3 ตัวอย่าง กากตะกอนคิเลนเตอร์ 3 ตัวอย่างและดินตะกอนขอบบ่อบำบัดน้ำเสีย 5 ตัวอย่าง

ตัวอย่างจากบริษัทท่าชนะน้ำมันปาล์ม จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 7 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม 3 ตัวอย่าง น้ำเสียจากบ่อบำบัด 1 ตัวอย่าง และกากตะกอนคิเลนเตอร์ 3 ตัวอย่าง

ตัวอย่างจากบริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม จำกัด จังหวัดตรัง จำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างน้ำเสียจากบ่อบำบัด 2 ตัวอย่างและกากตะกอนคิเลนเตอร์ 1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างจากบริษัทปาล์มไทยพัฒนา จำกัด จังหวัดสตูล จำนวน 6 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม 3 ตัวอย่างและกากตะกอนคิเลนเตอร์ 3 ตัวอย่าง

ตัวอย่างจากบริษัทลาภทวีปาล์มออยล์ จำกัด จังหวัดสตูล จำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม 2 ตัวอย่างและน้ำเสียจากบ่อบำบัด 1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างจากบริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด จังหวัดสตูล จำนวน 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม 2 ตัวอย่างและดินตะกอนขอบบ่อบำบัดน้ำเสีย 2 ตัวอย่าง

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับแยกเชื้อและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย คือ mineral salt medium (MSM) โดยมีองค์ประกอบ (g/l) คือ  $K_2HPO_4$ , 0.8;  $KH_2PO_4$ , 0.2;  $CaCl_2$ , 0.05;  $MgCl_2$ , 0.5;  $FeCl_2$ , 0.01;  $(NH_4)_2SO_4$ , 1; NaCl, 5 และน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนักหรือน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ปรับ pH เท่ากับ 7.0 โดยใช้ 1M HCl หรือ 1 M NaOH (ดัดแปลงจาก Yin *et al.*, 2005)

อาหารสำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้นและเก็บรักษาเชื้อ คือ nutrient broth และ nutrient agar

3. น้ำมันปาล์มใช้แล้วจากการทอดปลาซึ่งเก็บมาจากร้านค้าในตลาดศรีตรัง ข้างมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเก็บน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ปริมาตร 2 ลิตร เพื่อใช้ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง

## 4. สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการย้อมแกรม; คริสตัลไวโอเลต, สารละลายไอโอดีน, เอทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 และซาฟรานิน
- สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสปอร์; มาลาไคท์กรีนและซาฟรานิน
- Glucose ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)
- Hexane ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)
- Xylene ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd. (Bankok, Thailand)
- Sodium nitrate ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)
- Ammonium sulfate ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)
- Sodium chloride ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)
- Methanol ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)
- Chloroform ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)
- Acetonitrile ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)

- Water ยี่ห้อ Lab-Scan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd (Bankok, Thailand)
- Glycerol ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Finechem Pty, Ltd (Bankok, Thailand)
- Calcium chloride ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Finechem Pty, Ltd (Bankok, Thailand)
- Magnesium chloride ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Finechem Pty, Ltd (Bankok, Thailand)
- Sodium dodecyl sulfate ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Finechem Pty, Ltd (Bankok, Thailand)
- Triton<sup>®</sup> X-100 ยี่ห้อ Aldrich บริษัท Sigma-Aldrich Chemic GmbH, Riedstv. (Steinheim, Germany)
- Rhodamine บริษัท Fluka Chemical Co., Ltd (Bushs, Switzerland)
- Ninhydrin บริษัท Fluka Chemical Co., Ltd (Bushs, Switzerland)
- Anisaldehyde บริษัท Nacalai Tesque Inc. (Tokyo, Japan)
- Ethanol 95% บริษัท Labscan Asia Co., Ltd. (Bankok, Thailand)
- น้ำตาลทราย ยี่ห้อมิตรผล บริษัทน้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด ประเทศไทย
- น้ำมันปาล์มโอดีน บริษัท โอดีน จำกัด ประเทศไทย

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นสารเคมีเกรด HPLC

## 5. อุปกรณ์

- pH meter ยี่ห้อ Orion บริษัท Orion Research, Inc, USA
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Finepcr บริษัทไปโอแอลทีพี จำกัด (Bangkok, Thailand)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SX-700 บริษัท เค.เอส.พี. อ็อกต้าเทค จำกัด ประเทศไทย
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น 527044 Hotpack บริษัท Scientific Promotion Co., Ltd, Thailand
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D company, Ltd ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius บริษัท S.V. Medico Co., Ltd ประเทศไทย

- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Hettich บริษัท Hettich Asia Pacific Pty, Ltd (Germany)
- Vortex mixer รุ่น MS 1 บริษัท IKA-Works, Inc, USA
- Ring tensiometer รุ่น Torsion balance Model OS บริษัท Torsion Balance Supplies ประเทศอังกฤษ
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง รุ่น YS100 บริษัท Nikon Corporation ประเทศญี่ปุ่น
- Hot air oven รุ่น UM 200 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

## 6. วัสดุ

- แผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) aluminum sheets silica gel 60 RP-18 F<sub>254S</sub> ขนาด 20×20 cm layer thickness 0.2 mm บริษัท MERCK
- แผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) aluminum sheets silica gel 60 F<sub>254</sub> ขนาด 20×20 cm layer thickness 0.2 mm บริษัท MERCK
- ถัง dialysis ขนาด molecular weight cut-off 1,000 คาลตัน บริษัท Viskase
- SEP-PAK C18 ยี่ห้อ Milipore บริษัท Waters Associates ประเทศสหรัฐอเมริกา
- PCR purification kit บริษัท QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA
- PCR purification kit บริษัท QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA

## วิธีการวิเคราะห์

หลังจากการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในอาหาร MSM เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา

- เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ นำไปสกัดน้ำมันออกด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 แล้วแยก culture broth ออกจากเฮกเซนโดยใช้กรวยแยก จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1

## 1. การทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 1.1 Qualitative drop-collapsing test

หยดน้ำมันปาล์มใช้แล้ว 2 ไมโครลิตร ลงในฝาของ 96-microwell plate วางพักไว้ นาน 2 ชั่วโมง เติมตัวอย่างส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งผ่านการสกัดด้วยเฮกเซนแล้ว 5 ไมโครลิตร ลงบนหยดน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่เคลือบอยู่ บ่มนาน 1 นาที สังเกตลักษณะของหยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางการแผ่ออกของสารละลายซุดควบคุม (หยดน้ำกลั่นและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ) กับตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ หากเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีค่ามากกว่าซุดควบคุมแสดงถึงการมีสารลดแรงตึงผิวในตัวอย่าง (Bodour and Maier, 1998)

### 1.2 การวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว (surface tension) และค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration, CMC)

วัดค่าแรงตึงผิวโดยใช้เครื่อง Ring Tensiometer โดยนำตัวอย่างส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน plate วางวงแหวน platinum ลงในสารละลาย จากนั้นเลื่อนวงแหวน platinum ขึ้นจากสารละลายช้าๆ จนวงแหวน platinum หลุดจากส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ อ่านค่าแรงตึงผิวที่ได้ (mN/m) (Kim *et al.*, 2002) คำนวณค่าการลดแรงตึงผิว (Surface tension reduction, STR) ดังสมการ

ค่าการลดแรงตึงผิว = ค่าแรงตึงผิวของสารละลายซุดควบคุม - ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสน้ำเลี้ยงเชื้อ

การหาค่า critical micelle concentration (CMC) หรือความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์หรือลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุดในหน่วย กรัมต่อลิตร (g/L) โดยนำสารลดแรงตึงผิวที่ได้ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ไม่สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้อีกต่อไป ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง (Yakimov *et al.*, 1995)

### 1.3 Emulsification activity (EA) และค่า Emulsion index (E<sub>24</sub>)

นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ 2 มิลลิลิตร ผสมกับ xylene ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที (EA) และ 24 ชั่วโมง (E<sub>24</sub>) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) และความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion index, E<sub>24</sub>) ตามลำดับ ดังสมการ (Cooper and Goldenberg, 1987)

$$EA \text{ หรือ } E_{24} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชันที่เกิดขึ้น}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}} \times 100$$

#### 1.4 Oil displacement area (ODA)

นำงานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร บรรจุน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร หยดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าของน้ำ จากนั้นจึงหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าของหยดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางการแผ่อกของสารละลายชุดควบคุม (หยดน้ำกลั่น) กับตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ หากเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีค่ามากกว่าชุดควบคุม แสดงถึงการมีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวในตัวอย่าง (คัดแปลงจาก Morikawa *et al.*, 1993)

## 2. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ

### การวัดค่าการดูดกลืนแสง

- เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นำ culture broth ไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ( $OD_{660}$ ) ใช้อาหาร MSM ปราศจากเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็น blank และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (คัดแปลงจาก Kim *et al.*, 1997)

- เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน สกัดน้ำมันปาล์มใช้แล้วออกด้วยเฮกเซน อัตราส่วน 1:1 แล้วแยก culture broth ออกจากเฮกเซนโดยใช้กรวยแยก จากนั้นนำ culture broth ไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ( $OD_{660}$ ) ใช้อาหาร MSM ปราศจากเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนเป็น blank และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (คัดแปลงจาก Kim *et al.*, 1997)



## วิธีการทดลอง

### 1. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานแปรรูปน้ำมันปาล์ม

ใส่ตัวอย่างดิน/กากของเสีย 1 กรัม หรือน้ำเสีย ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 วินาที จากนั้น pipette ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread plate บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าวมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยว ๆ นำเชื้อแบคทีเรียที่เลือกได้เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อที่ได้ในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้ายคือร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตรร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2 และปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่า  $OD_{660}$  เท่ากับ 0.5

#### 1.2 การทำ primary screening

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1.1 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและอาหาร MSM ที่มี glucose ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันโดยแบ่งเป็น

1.2.1 เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำนำไปสกัดน้ำมันออกด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 แล้วปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Urum, 2003; Binazadeh *et al.*, 2009)

1.2.2 เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ ทดสอบ drop-collapsing test ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1.1 เลือกเชื้อที่พบกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่มีความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-7 มิลลิเมตร เพื่อคัดเลือกในขั้นต่อไป

### 1.3 การทำ secondary screening

ถ่ายกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จากการทำ primary screening ในข้อ 1.2 ที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1.1 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและอาหาร MSM ที่มี glucose ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ โดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิว, emulsification activity (EA) และ emulsification index ( $E_{24}$ ) ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ เลือกเชื้อที่มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่ดีที่สุดจำนวน 14 ไอโซเลตเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 2. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 ย้อมสีแกรมและย้อมสปอร์ และเทียบเคียงสายพันธุ์โดยใช้ 16S rDNA ดังนี้

### 2.1 การสกัด chromosomal DNA

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 ในอาหาร NB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปสกัดดีเอ็นเอด้วย Blood and Cell Culture DNA Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

### 2.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA

ใช้ primer 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยจะได้ PCR product ความยาวประมาณ 1500 bp เดิมสารสำหรับ PCR ดังนี้ สารละลาย TopTaq Master Mix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, Primer 1492R และ Primer 8F อย่างละ 5 ไมโครลิตร Coraload ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, RNase-free water ปริมาตร 8 ไมโครลิตรและ DNA template ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำการ denaturation ครั้งแรกที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ PCR 25 รอบ (อุณหภูมิที่ใส่ต่อรอบ: 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 1.5 นาที) ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วที่

### 1.3 การทำ secondary screening

ถ่ายกล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จากการทำ primary screening ในข้อ 1.2 ที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1.1 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและอาหาร MSM ที่มี glucose ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา บั่นเหวียงแยกเซลล์ โดยใช้ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิว, emulsification activity (EA) และ emulsification index ( $E_{24}$ ) ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ เลือกเชื้อที่มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวที่ดีที่สุดจำนวน 14 ไอโซเลตเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 2. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 ย้อมสีแกรมและย้อมสปอร์ และเทียบเคียงสายพันธุ์โดยใช้ 16S rDNA ดังนี้

### 2.1 การสกัด chromosomal DNA

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.3 ในอาหาร NB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาย้ายเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ไปบั่นเหวียงโดยใช้ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไปสกัดดีเอ็นเอด้วย Blood and Cell Culture DNA Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

### 2.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA

ใช้ primer 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT) เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยจะได้ PCR product ความยาวประมาณ 1500 bp เดิมสารสำหรับ PCR ดังนี้ สารละลาย TopTaq Master Mix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, Primer 1492R และ Primer 8F อย่างละ 5 ไมโครลิตร Coraload ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, RNase-free water ปริมาตร 8 ไมโครลิตรและ DNA template ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำการ denaturation ครั้งแรกที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ PCR 25 รอบ (อุณหภูมิที่ใช้ต่อรอบ: 95 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 1.5 นาที) ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis เพื่อหาขนาด โดยเปรียบเทียบกับ molecular marker

### 2.3 การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วและการหาลำดับเบส

นำ PCR product มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis ก่อนส่งไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer ส่งวิเคราะห์โดยบริษัท 1<sup>st</sup> BASE จำกัด ประเทศสิงคโปร์ นำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบเคียงกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

## 3. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus tequilensis* Lc9

ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อศึกษาสถานะหนึ่ง ๆ จะควบคุมให้สถานะอื่นคงที่ โดยถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหาร NB ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.5 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมกล้ำเชื้อและใช้สภาวะเดียวกันกับชุดทดลอง เมื่อครบเวลานำ culture broth ไปวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียตามวิธีการวิเคราะห์การเจริญข้อ 2 และวัดค่า pH โดยใช้ pH meter แล้วนำ culture broth ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิวและความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ

### 3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหาร NB ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.5 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในน้ำเสียจากบ่อรวมซึ่งเก็บมาจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และอาหาร MSM ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทรายและกากน้ำตาล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำมันปาล์มทางการค้าและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

เปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM และน้ำเสียจากบ่อรวม โดยเลือกสถานะในการเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุด ถ้าการเลี้ยงเชื้อให้ค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุดในอาหาร MSM ทำการทดลองในข้อ 3.2 ต่อไปตามลำดับ ถ้าการเลี้ยงเชื้อมีค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุดในน้ำเสียจากบ่อรวม ทำการทดลองต่อในข้อ 3.5 ตามลำดับ

### 3.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหาร NB ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่  $OD_{660}$  เท่ากับ 0.5 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้มีค่าเท่ากับร้อยละ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 โดยน้ำหนักตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุด เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

### 3.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหาร NB ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่  $OD_{660}$  เท่ากับ 0.5 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ  $NaNO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , ยูเรียและเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุด เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

### 3.4 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหาร NB ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่  $OD_{660}$  เท่ากับ 0.5 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1, 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนให้มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 เลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุด เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

### 3.5 ผลของการเขย่าต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหาร NB ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่  $OD_{660}$  เท่ากับ 0.5 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในน้ำเสียจากบ่อรวมหรืออาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1, 3.2, 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 เลือกความเร็วรอบที่ให้ค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุด เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

### 3.6 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหาร NB ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่  $OD_{660}$  เท่ากับ 0.5 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในน้ำเสียจากบ่อรวมหรืออาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ จากนั้นปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 เลือกพีเอชเริ่มต้นที่ให้ค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุด เพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

### 3.7 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้ในอาหาร NB ที่ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่  $OD_{660}$  เท่ากับ 0.5 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในน้ำเสียจากบ่อรวมหรืออาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน การเขย่า และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 และ 3.6 ตามลำดับ โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60, และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 เลือกช่วงเวลาที่ให้ค่าแรงดึงผิวต่ำที่สุด เพื่อใช้ในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงดึงผิวชีวภาพต่อไป

## 4. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมการลดแรงดึงผิวดีที่สุดตามวิธีการทดลองข้อ 3 นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

#### 4.1 ตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช

นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช โดยใช้ 6 M HCl ปรับพีเอช เป็น 2, 3 หรือ 4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน จากนั้นเก็บตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ปรับพีเอชด้วย 100 mM HCl ที่มีพีเอชเท่ากับพีเอชที่ตกตะกอน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 2 N NaOH และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization

#### 4.2 สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อสกัด 2 ครั้งด้วย chloroform/methanol ในอัตราส่วน 2:1 (ดัดแปลงจาก Mercade *et al.*, 1996) โดยใช้กรวยแยก (separation funnel) แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในเครื่อง rotary evaporator

#### 4.3 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 40 ถึง 60 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนในน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือโดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 1,000 คาลตัน ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ข้ามคืน และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization

จากวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 3 วิธี เลือกวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบค่า CMC และน้ำหนักตะกอนที่ได้ โดยเลือกวิธีการตกตะกอนที่ได้ตะกอนมากที่สุดและ/หรือมีค่า CMC ต่ำที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่อไป

### 5. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวดีที่สุดตามวิธีการทดลองข้อ 3 นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพวิธีที่ดีที่สุดที่เลือกได้จากข้อ 4 นำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 5.1 การหาค่า critical micelle concentration (CMC)

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการที่เลือกได้จากข้อ 4 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Triton X-100 ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดค่าแรงตึงผิวตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1.2 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

### 5.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดข้อ 4 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ละลายในน้ำกลั่น โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่ได้จากข้อ 5.1 ที่ผ่านการปรับพีเอชด้วย 1N HCl หรือ 1 N NaOH ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ แล้ววัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ

### 5.3 ความคงตัวของอณูภูมิของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดข้อ 4 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ละลายด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่ได้จากข้อ 5.1 นำตัวอย่างบ่มที่อณูภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและบ่มที่อณูภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อณูภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว เช่นเดียวกับข้อ 5.2

### 5.4 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดข้อ 4 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ ละลายด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่ได้จากข้อ 5.1 นำมาทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเกลือชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทะเล โดยทดสอบความเข้มข้นของเกลือชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกันกับน้ำทะเล โดยเติม NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 ตามลำดับ หรือ  $\text{CaCl}_2$  หรือ  $\text{MgCl}_2$  ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 ตามลำดับ หรือละลายสารสกัดหยาบที่ได้ในน้ำทะเล จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว เช่นเดียวกับข้อ 5.2

## 6. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวดีที่สุดตามวิธีการทดลองข้อ 3 นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อณูภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพวิธีที่ดีที่สุดที่เลือกได้จากข้อ 4 นำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาองค์ประกอบและโครงสร้างบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



### 6.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

ตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการข้อ 4 ด้วย TLC ที่มี silica gel 60 F<sub>254</sub> เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล ในอัตราส่วนต่างกันเพื่อหา mobile phase ที่ดีที่สุด หรือตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบด้วย TLC RP-18 F<sub>254s</sub> เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ acetonitrile :น้ำ ในอัตราส่วนต่างกันเพื่อหา mobile phase ที่ดีที่สุด จากนั้นเป่าให้แห้ง แล้วใช้ spraying reagent ต่างๆ (ภาคผนวก ข) ในการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ rhodamine B เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกรดไขมัน (McInerney *et al.*, 1990) ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ (Wilkinson, 1972) ใช้ anisaldehyde ในการวิเคราะห์น้ำตาล (Schulz *et al.*, 1991) เลือก mobile phase ที่สามารถแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป

### 6.2 การแยกสารโดย Column Chromatography

ใช้คอลัมน์ SEP-PAK (C<sub>18</sub>) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ด้วยเมทานอล 100% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาดคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย acetonitrile 100% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการข้อ 4 มาละลายด้วย acetonitrile:น้ำ (1:1) และใส่ในคอลัมน์ จากนั้นชะด้วย acetonitrile:น้ำ (1:1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และลดความเข้มข้นของตัวเคลื่อนที่โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile:น้ำ เป็น 2:1, 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ ปริมาตรที่ใช้ชะคอลัมน์อัตราส่วนละ 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนที่แยกได้จากโครมาโตกราฟีแบบดูดซับแต่ละส่วนตรวจสอบองค์ประกอบด้วยวิธี TLC ตามวิธีการข้อ 6.1 นำส่วนที่มีโครมาโตแกรมเหมือนกันรวมเข้าด้วยกัน ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวตามวิธีการข้อ 1.4 และเก็บเฉพาะส่วนที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวสูงที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นต่อไป

### 6.3 Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

ตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของสารที่พบกิจกรรมการลดแรงตึงผิวในข้อ 6.2 โดยใช้ FT-IR ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### บทที่ 3

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างของเสียที่เก็บจากโรงงานแปรรูปน้ำมันปาล์ม

การศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพบว่ายังมีรายงานน้อยมาก ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไปได้ว่าจะพบเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ หรือพบเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่ดีในการลดแรงตึงผิวเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการชะล้างคราบน้ำมันปาล์มที่ตกค้างในกระบวนการแปรรูปน้ำมันปาล์มและใช้ในการกระบวนการเก็บเกี่ยวน้ำมันปาล์มที่เหลืออยู่ในวัตถุดิบเพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำมันปาล์มในปริมาณมากขึ้น

แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างดิน น้ำทิ้ง และกากของเสียจากบริษัททักษิณปาล์ม (2521) จังหวัดสุราษฎร์ธานี, บริษัทปาล์มไทยพัฒนา จำกัด, บริษัทลาททวิ ปาล์ม ออยล์ จำกัด, บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์ม จำกัด จังหวัดสตูล และบริษัทตรงอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม จังหวัดตรัง โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 54 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม จำนวน 30 ตัวอย่าง, น้ำเสียจากบ่อบำบัด จำนวน 7 ตัวอย่าง กากตะกอนดีแคนเตอร์ จำนวน 10 ตัวอย่าง และดินตะกอนขอบบ่อบำบัดน้ำเสีย จำนวน 7 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาแยกเชื้อโดยเจือจางใน NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จากนั้นเปิดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมา spread plate บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนีมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว เลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน และสุ่มเลือกเชื้อให้มากที่สุดเพื่อเป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่าง ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 808 ไอโซเลต จากตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อจะมีกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติหลากหลาย การใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เชื้อที่มีความสามารถในการใช้น้ำมันปาล์มในการเจริญเติบโตเจริญได้ก่อน ในขณะที่เชื้ออื่น ๆ ไม่สามารถใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนจะไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อที่เจริญในน้ำมันปาล์มใช้แล้วได้ ซึ่งเชื้อที่สามารถใช้น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วในการเจริญเติบโตได้น่าจะมีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของน้ำมันปาล์ม ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่ายขึ้น (Providenti *et al.*, 1995; Rahman *et al.*, 2002; Wai *et al.*, 2005)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 808 ไอโซเลต มาทำ primary screening โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสความ

เข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยวิธี qualitative drop collapsing test ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1.1 พบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวจำนวน 72 ไอโซเลต การวัดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยวิธี qualitative drop collapsing test ทำได้รวดเร็ว ไม่ซับซ้อน ใช้สารในปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ (Ron and Rosenberg, 2001; Bodour *et al.*, 2003; Youssef *et al.*, 2004; Tugrul and Cansunar, 2005; Plaza *et al.*, 2006; Walter *et al.*, 2010) แต่วิธีนี้มีข้อด้อยคือมีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ ถ้าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อแบคทีเรียผลิตมีความเข้มข้นต่ำจะไม่สามารถวัดกิจกรรมด้วยวิธีนี้ได้ (Walter *et al.*, 2010) แต่ข้อดีคือจะสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณมากได้ดี

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 72 ไอโซเลตมาทำ secondary screening โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง ที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดค่าแรงตึงผิวความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) และค่าความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน ( $E_{24}$ ) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดจำนวน 14 ไอโซเลต (Table 2) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ไอโซเลต Tf19 และ Sb7 มีค่าการลดแรงตึงผิวเท่ากับ 13 mN/m และ 10.8 mN/m ตามลำดับ จากการทดสอบค่า EA พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Tf19 และ Tg9 มีค่า EA สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ อยู่ที่ร้อยละ 42.8 และ 41.6 ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ค่า  $E_{24}$  ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตลดลงมาที่ร้อยละ 36.9 และ 28.5 ตามลำดับ

เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ไอโซเลต Lc16 มีค่าการลดแรงตึงผิวสูงที่สุดเท่ากับ 13.8 mN/m และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต Lc12, Sb7, Sb8 และ Tg9 มีค่าการลดแรงตึงผิวเท่ากับ 12.3 mN/m จากการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชัน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 7/17b, Tg9 และ 0/15 มีค่า EA สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ อยู่ที่ร้อยละ 60.7, 53.5 และ 49.9 ตามลำดับและเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ค่า  $E_{24}$  ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ลดลงมาที่ร้อยละ 58.3, 0 และ 35.7 ตามลำดับ จากผลของค่าการลดแรงตึงผิวเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน พบว่าเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีอาจจะมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันได้ไม่ดี

แสดงว่าการใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตจะแตกต่างกันด้วย จากรายงานของ Ron และ Rosenberg (2001) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ได้แก่ ไกลโคลิปิดและลิโปเปปไทด์ สารในกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว (surface tension) และแรงตึงระหว่างผิว (interfacial tension) ได้ดีกว่าการทำให้เกิดอิมัลชันและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ โปรตีน ลิโปโพลีแซคคาไรด์ ลิโปโปรตีน คุณสมบัติของสารในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับความคงตัวของอิมัลชันมากกว่าการลดแรงตึงผิว นอกจากนี้ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ผลิตด้วย (Singer, 1985) เช่น การผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนไม่ละลายน้ำเชื่อดังกล่าวจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ (Thavasi *et al.*, 2011) แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* LBM10 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนละลายน้ำ ได้แก่ กลีเซอรอล เชื่อดังกล่าวจะผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด (da Rosa *et al.*, 2010) เป็นต้น

Table 2. Emulsification activity (EA), emulsification index ( $E_{24}$ ) and surface tension reduction (STR) of supernatants obtained from bacterial cultures grown in shaken tube in 10 ml MSM supplemented with indicated carbon sources for 48 h at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.

Isolate	Used palm oil			Glucose		
	STR* (mN/m)	EA* (%)	$E_{24}$ * (%)	STR* (mN/m)	EA* (%)	$E_{24}$ * (%)
0/15	$1.0 \pm 10.1$	$12.0 \pm 0.0$	0	$1.6 \pm 1.1$	$49.9 \pm 0.0$	$35.7 \pm 0.1$
7/17b	$9.8 \pm 1.4$	$14.0 \pm 0.0$	$3.0 \pm 0.0$	$10.0 \pm 1.3$	$60.7 \pm 0.0$	$58.3 \pm 0.0$
7/18a	$4.0 \pm 0.8$	$22.0 \pm 0.1$	$10.0 \pm 0.0$	$8.0 \pm 1.2$	$51.1 \pm 0.0$	$41.6 \pm 0.1$
7/18b	$8.6 \pm 0.5$	$21.0 \pm 0.0$	$17.0 \pm 0.1$	$8.1 \pm 2.5$	$30.9 \pm 0.0$	$17.8 \pm 0.0$
7/18r	$8.5 \pm 0.5$	$5.0 \pm 0.0$	0	$6.1 \pm 1.2$	$25.0 \pm 0.0$	$20.2 \pm 0.0$
Lc9	$8.1 \pm 1.6$	0	0	$9.3 \pm 0.5$	0	0
Lc10	$7.8 \pm 1.6$	$27.0 \pm 0.0$	0	$8.6 \pm 0.5$	$20.2 \pm 0.1$	$8.3 \pm 0.0$
Lc12	$5.8 \pm 5.6$	$15.4 \pm 0.2$	$4.7 \pm 0.1$	$12.3 \pm 2.3$	0	0
Lc16	$5.3 \pm 1.0$	0	0	$13.8 \pm 1.8$	0	0
Sb7	$10.8 \pm 0.7$	0	0	$12.3 \pm 0.5$	0	0
Sb8	$5.0 \pm 1.0$	0	0	$12.3 \pm 3.0$	0	0
Td4	$5.0 \pm 2.0$	0	0	$10.6 \pm 2.8$	0	0
Tf19	$13.0 \pm 1.5$	$42.8 \pm 0.0$	$36.9 \pm 0.0$	$11.6 \pm 1.0$	0	0
Tg9	$0.1 \pm 1.2$	$41.6 \pm 0.0$	$28.5 \pm 0.0$	$12.3 \pm 0.5$	$53.5 \pm 0.0$	0.0 0.0

\* Values are given as mean  $\pm$  SD from triplicate determinations.

## 2. การจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลตมาข้อมสีกแกรมและข้อมสปอร์ โดยใช้เชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อควบคุมของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ตามลำดับ (Table 3) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ จำนวน 7 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ จำนวน 7 ไอโซเลต

จากการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี 16S rDNA โดยนำลำดับเบสที่ได้ประมาณ 500-1000 bp ไปเทียบเคียงกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank (Table 4, Fig. 8) ผลการ

เทียบเคียงพบเชื้อที่แตกต่างกัน 5 สกุล ประกอบด้วย เชื้อในสกุล *Bacillus* spp. จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus subtilis* 4 ไอโซเลต, *Bacillus tequilensis* 1 ไอโซเลต และ *Bacillus pumilus* 2 ไอโซเลต เชื้อในสกุล *Pseudomonas* spp. จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อในสกุล *Klebsiella* spp. ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* จำนวน 3 ไอโซเลต เชื้อในสกุล *Serratia* spp. จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Serratia marcescens* และเชื้อในสกุล *Acinetobacter* spp. จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus* และ *Acinetobacter junii* เชื้อทั้ง 5 สกุลเป็นเชื้อที่มีรายงานว่าสามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทั้งดินและน้ำ จากการแยกเชื้อในบริเวณที่มีน้ำมันปล้ำปนเปื้อน จึงพบเชื้อในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อช่วยในการนำน้ำมันปล้ำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ (Atlas 1992; Sugiura *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 2003; Okoh and Trejo-Hernandez, 2006; Das and Mukherjee, 2007)

จากผลการเทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อสกุล *Bacillus* spp. พบมากที่สุด เนื่องจากสามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายและเชื้อสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาวะไม่เหมาะสมได้ โดยสปอร์จะทนต่อความร้อนสูงและยังช่วยให้แบคทีเรียสามารถแพร่กระจายไปกับดิน น้ำและอากาศได้ดีขึ้น (Nicholson *et al.*, 2000) จากการจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่าเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 เป็นเชื้อที่ยังไม่พบการรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาก่อน โดยเชื้อในสกุล *Bacillus* spp. ที่มีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* (Fagade *et al.*, 2009) *B. circulans* (Das *et al.*, 2009; Saimmai *et al.*, 2011) เป็นต้น และจากการคัดเลือกเชื้อพบว่าเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 มีค่าการลดแรงตึงผิวเท่ากับ 13.8 mN/m เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงเลือกเชื้อสายพันธุ์ *B. tequilensis* Lc9 มาใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ยังไม่มีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาก่อน จึงศึกษากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวและคุณสมบัติในการเป็นสารอิมัลซิไฟด์ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

Table 3. Colony morphologies on MSM agar supplemented with used palm oil (1%, w/v) as a carbon source.

Isolate (Gram stain)	Colony morphology
0/15, 7/17b and 7/18a (-)	Small (diameter, 2 to 5 mm) colonies, circular form, convex elevation, smooth surface, entire edge, opaque optical character and yellow colonies
7/18b (-)	Small (diameter, 2 to 5 mm) colonies, circular form, flat elevation, smooth surface, translucent optical character and light green colonies
7/18r (-)	Small (diameter, 2 to 5 mm) colonies, circular form, convex elevation, rugose surface, undulate edge, dull optical character and red colonies
Td4, Lc10, Lc12 and Lc16 (+)	Medium (diameter, 5 to 8 mm) colonies, irregular form, pulvinate elevation, contoured surface, lobate edge, dull optical character and white colonies
Lc9 (+)	Very small (diameter, < 2 mm) colonies, circular form, convex elevation, smooth surface, entire edge, glistening optical character and white colonies
Sb7 and Sb8 (+)	Small (diameter, 2 to 5 mm) colonies, circular form, convex elevation, smooth surface, dull optical character and white colonies
Tg9 (-)	Very small (diameter, < 2 mm) colonies, circular form, convex elevation, smooth surface, entire edge, glistening optical character and white colonies
Tf19 (-)	Very small (diameter, < 2 mm) colonies, circular form, convex elevation, smooth surface, entire edge, dull optical character and white colonies

Table 4. Identification of selected biosurfactant-producing bacterial isolates by 16S rDNA gene sequence analysis.

Isolate	16S rDNA sequence comparison	Accession no.	Identity (%)
	Species as close relatives		
Surat Thani Province			
0/15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AB647205	96
7/17b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AB647209	98
7/18a	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AB647208	98
7/18b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB647206	95
7/18r	<i>Serratia marcescens</i>	AB647207	98
Td4	<i>Bacillus subtilis</i>	AB647203	98
Tg9	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	AB647204	99
Tf19	<i>Acinetobacter junii</i>	AB647197	99
Satun Province			
Lc9	<i>Bacillus tequilensis</i>	AB647198	98
Lc10	<i>Bacillus subtilis</i>	AB647210	91
Lc12	<i>Bacillus subtilis</i>	AB647199	98
Lc16	<i>Bacillus subtilis</i>	AB647200	99
Sb7	<i>Bacillus pumilus</i>	AB647201	99
Sb8	<i>Bacillus pumilus</i>	AB647202	99



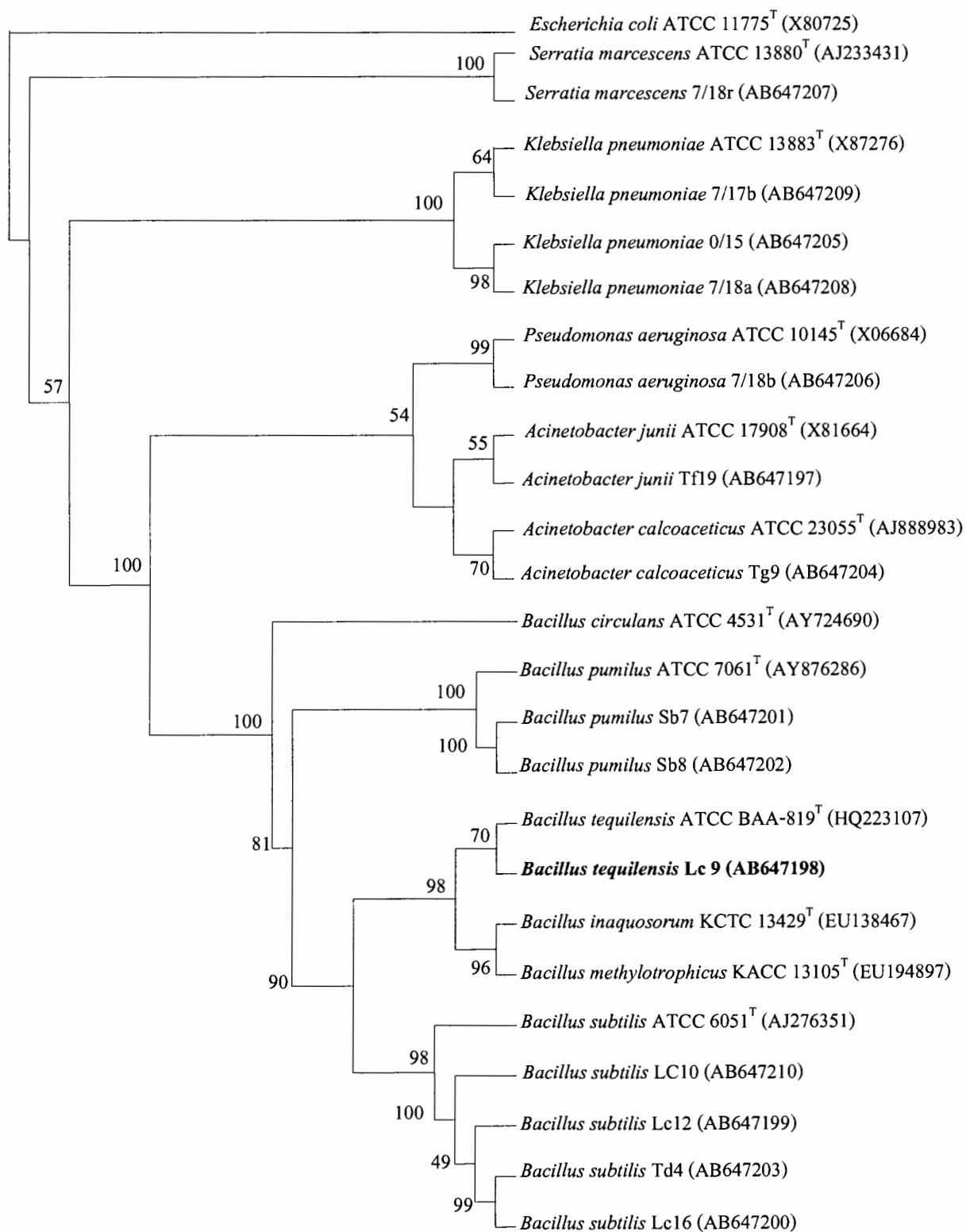


Figure 8. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence of selected biosurfactant-producing bacterial isolates.

### 3. สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus tequilensis* Lc9

#### 3.1 แหล่งคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในน้ำเสียบ่อรวมซึ่งเก็บจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อเพิ่มทางเลือกในการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดน้ำมันปาล์มที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำเพื่อแก้ปัญหาล้างแควล้น ถ้าเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 สามารถเจริญในน้ำเสียบ่อรวมได้ก็น่าจะนำเชื้อไปใช้ในรูปของตัวเซลล์ซึ่งสามารถลดต้นทุนในการเลี้ยงเชื้อและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทรายกากน้ำตาลและแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ คือ น้ำมันปาล์มทางการค้าและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก โดยมี  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเชื้อไม่เจริญในน้ำเสียบ่อรวม แต่เจริญในอาหาร MSM (Table 5) จากผลการทดลองน้ำเสียบ่อรวมไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 อาจจะเป็นเนื่องจากในน้ำเสียบ่อรวมมีสาร phenolic compounds ซึ่งเหลือจากกระบวนการแปรรูปปาล์มน้ำมันเป็นองค์ประกอบ สาร phenolic compounds จะเป็นพิษกับเซลล์และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (Joshi *et al.*, 2008; Niaounakis and Halvadakis, 2004) ดังนั้นหากจะนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดน้ำมันปาล์มที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำจะไม่สามารถนำเซลล์เชื้อไปประยุกต์ใช้ได้

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลหรือน้ำมันปาล์มทางการค้าหรือน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนการเจริญเติบโตของเชื้อจะใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าการลดแรงตึงผิวของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยมีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดที่สุด ( $P < 0.05$ ) โดยการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่าการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดเท่ากับ 17.8 และ 15.8 mN/m ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) และความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน ( $E_{24}$ ) พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เวลา 24 ชั่วโมง ค่า EA และ  $E_{24}$  เท่ากับร้อยละ 45.8 และ 39.5 ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่า EA และ  $E_{24}$  เท่ากับร้อยละ 41.17 และ 14.58 ตามลำดับ การใช้สารอื่น ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนไม่มีความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชัน จึงเลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในขั้นตอนต่อไป

การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อค่าพีเอชจะต่ำกว่าอาหาร MSM ที่ใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งในระหว่างการเจริญเติบโตเชื้อจะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว (Loncar *et al.*, 2000) และจากการวิเคราะห์ค่า EA และ E<sub>24</sub> พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 จะมีคุณสมบัติทั้งการลดแรงตึงผิวและการเกิดอิมัลชัน ซึ่งชนิดของแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อคุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิต (Sarubbo *et al.*, 2001)

จากผลการศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตจึงมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอย่างมาก (Robert *et al.*, 1989; Panilaitis *et al.*, 2007; Abouseoud *et al.*, 2008; Saharan *et al.*, 2011) Joshi และคณะ (2008) ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อ *B. subtilis* 20B ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ กลูโคส, มอลโตส, ฟรุคโตส, ซูโครส, แลคโตส, กากน้ำตาล, หางนม, เมทานอล, เอทานอลและโพรพานอล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ เฮปแทน, คีโรซีน, น้ำมันเมล็ดฝ้ายและน้ำมันพาราฟิน พบว่าเชื้อ *B. subtilis* 20B สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนทุกชนิด แต่การเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อ *B. subtilis* 20B สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีที่สุดโดยลดค่าแรงตึงผิวจาก 55.0 mN/m เป็น 30.5 mN/m

Table 5. Effect of different carbon sources on biosurfactant production in shaken flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MSM at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.

C-source (2%, w/v)	Final pH*	STR* (mN/m)	EA* (%)	E <sub>24</sub> * (%)	Growth* (OD <sub>660</sub> )
<u>24 h</u>					
Palm oil wastewater	6.9 ± 0.0	0 <sup>f**</sup>	0 <sup>b**</sup>	0 <sup>b**</sup>	ND
Glucose	4.3 ± 0.0	10.5 ± 1.3 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.1
CS	4.3 ± 0.0	10.1 ± 1.6 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.0
Molasses	4.4 ± 0.0	17.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	45.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	39.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.0
Palm oil	7.1 ± 0.0	6.0 ± 1.0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.3
Used palm oil	7.1 ± 0.0	7.6 ± 1.1 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.2
<u>48 h</u>					
Palm oil wastewater	6.9 ± 0.0	0 <sup>f</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	ND
Glucose	4.4 ± 0.0	10.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.0
CS	4.4 ± 0.0	4.0 ± 0.5 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.0
Molasses	4.3 ± 0.0	15.8 ± 2.7 <sup>a</sup>	41.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	14.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.0
Palm oil	7.1 ± 0.0	9.6 ± 0.7 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.4
Used palm oil	7.1 ± 0.0	9.3 ± 1.1 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.0

ND: Non-detectable.

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.2 ความเข้มข้นของกากน้ำตาล

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 โดยน้ำหนักตามลำดับ และมี  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็น แหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการใช้กากน้ำตาลที่ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดและมีค่าการลดแรงดึงผิว สูงที่สุดเท่ากับ 18.5 mN/m และ 16.3 mN/m ตามลำดับ (Table 6) วิเคราะห์ค่า EA และ  $E_{24}$  เมื่อเลี้ยง เชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ค่า EA มากที่สุดเมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่ง คาร์บอน เท่ากับร้อยละ 52.0 ค่า  $E_{24}$  สูงที่สุดเมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่ง คาร์บอน เท่ากับร้อยละ 34.1 ( $P > 0.01$ ) และเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่าการลดแรงดึง ผิว ค่า EA และค่า  $E_{24}$  มีแนวโน้มลดลง อาจจะเนื่องมาจากสารอาหารที่จะใช้ในการเจริญเติบโตของ เชื้อหมดลง ดังนั้นจึงใช้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สร้างขึ้นมาเป็นแหล่งอาหารทำให้ปริมาณสาร ลดแรงดึงผิวชีวภาพลดลง ค่าต่าง ๆ จึงลดลงไปด้วย (Das *et al.*, 2007)

เมื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช พบว่า ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ใช้ต่างกัน แต่ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แตกต่างกันมากนักโดยอยู่ระหว่าง 4.2-4.5 จากผลการทดลอง พบว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 มีคุณสมบัติในการลดแรงดึงผิวได้ดี ที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ร้อยละ 2 ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ ร้อยละ 2 ในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะกากน้ำตาลมีผลต่อการผลิตสารลดแรง ดึงผิวชีวภาพ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของนักวิจัยอื่น ๆ เช่น Saimmai และคณะ (2011) ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. licheniformis* TR7 และ *B. subtilis* SA9 โดยใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2-10 โดยน้ำหนัก เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อ ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก เชื้อ *B. licheniformis* TR7 มีกิจกรรมของสารลด แรงดึงผิวชีวภาพดีที่สุด โดยลดแรงดึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 29.5 mN/m และให้ค่า  $E_{24}$  สูงที่สุด ร้อยละ 71.91 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้กากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 4-8 และเชื้อ *B. subtilis* SA9 มีกิจกรรมการลดแรงดึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แตกต่างกัน ( $P < 0.05$ ) อยู่ระหว่าง 28.05-29.75 mN/m เมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 4-10 และให้ค่า  $E_{24}$  สูงที่สุด

ร้อยละ 71.28 เมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 6 จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการผลิตและคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย

Table 6. Effect of molasses concentration on biosurfactant production in shaken flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MSM at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.

Molasses concentration (% w/v)	Final pH	STR (mN/m)	EA (%)	E <sub>24</sub> (%)	Growth (OD <sub>660</sub> )
<b>24 h</b>					
1.0	4.2 ± 0.0	8.6 ± 1.1 <sup>d**</sup>	52.0 ± 0.0 <sup>a**</sup>	4.1 ± 0.0 <sup>d**</sup>	2.8 ± 0.0
1.5	4.2 ± 0.0	12.5 ± 1.8 <sup>c</sup>	40.6 ± 0.0 <sup>c</sup>	15.6 ± 0.0 <sup>c</sup>	3.0 ± 0.0
2.0	4.3 ± 0.0	18.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	43.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	34.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.0
2.5	4.4 ± 0.0	16.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	37.5 ± 0.1 <sup>d</sup>	16.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.0
3.0	4.5 ± 0.0	8.3 ± 1.1 <sup>d</sup>	46.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	15.6 ± 0.0 <sup>c</sup>	3.1 ± 0.0
<b>48 h</b>					
1.0	4.3 ± 0.0	4.1 ± 0.7 <sup>d</sup>	43.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.0 <sup>c</sup>	3.0 ± 0.0
1.5	4.3 ± 0.0	13.5 ± 0.5 <sup>b</sup>	38.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	10.4 ± 0.0 <sup>d</sup>	3.6 ± 0.2
2.0	4.3 ± 0.0	16.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	44.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	11.2 ± 0.0 <sup>c</sup>	3.8 ± 0.0
2.5	4.4 ± 0.0	14.5 ± 2.1 <sup>b</sup>	35.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	17.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.0
3.0	4.5 ± 0.0	11.3 ± 1.1 <sup>c</sup>	40.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	15.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.0

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.3 แหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก โดยมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตนและยูเรีย แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และ

NaNO<sub>3</sub> ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเมื่อใช้ NaNO<sub>3</sub> เป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เชื้อสามารถลดแรงดึงผิวได้มากที่สุดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ( $P < 0.05$ ) ให้ค่าการลดแรงดึงผิวเท่ากับ 19.8 และ 18.8 mN/m ตามลำดับ (Table 7) แต่เมื่อวิเคราะห์ค่า EA พบว่าการเลี้ยงเชื้อโดยใช้เปปโตเนและ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> เป็นแหล่งไนโตรเจน สารลดแรงดึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติในการเกิดอิมัลชันได้ดีโดยเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า EA และ E<sub>24</sub> มากที่สุดเมื่อใช้ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> เป็นแหล่งไนโตรเจน เท่ากับร้อยละ 43.7 และ 34.1 ตามลำดับและเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่า EA และ E<sub>24</sub> มากที่สุดเมื่อใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน เท่ากับร้อยละ 52.0 และ 38.3 ตามลำดับ

เมื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช พบว่าค่าพีเอชจะแตกต่างกันเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน การเลี้ยงเชื้อโดยใช้ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเวลาผ่านไปค่าพีเอชจะลดลงอยู่ที่ 4.3 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ NaNO<sub>3</sub>, เปปโตเนและยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเวลาผ่านไปค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้น อยู่ที่ 7.3-8 เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหาร ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบไนเตรท ไนไตรท์ เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนียหรืออัลคาไลน์อื่น ๆ ออกมาทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Silva และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *P. aeruginosa* UCP0992 โดยมี glycerol ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและ NaNO<sub>3</sub> ร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจากพีเอช 7 เป็น 8.5 นอกจากนี้พบว่าการใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อไม่มีความสามารถในการลดแรงดึงผิว แต่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ ดังนั้นชนิด ปริมาณและคุณภาพของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ผลิตจะขึ้นอยู่กับสถานะในการเลี้ยง เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เป็นต้น ซึ่งจะมีผลต่อคุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ (Sarubbo *et al.*, 2001) สอดคล้องกับการทดลองของ Fagade และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. licheniformis* BS102 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันดิบความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันคือ NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub> และเปปโตเน ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* BS102 สามารถผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพโดยให้ค่า E<sub>24</sub> สูงที่สุดร้อยละ 96.2 เมื่อใช้ NH<sub>4</sub>Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน จากผลการทดลองที่ได้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ให้ค่าการลดแรงดึงผิวสูงที่สุดเมื่อใช้

NaNO<sub>3</sub> เป็นแหล่งไนโตรเจน จึงเลือกใช้ NaNO<sub>3</sub> เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นต่อไป

Table 7. Effect of different nitrogen sources on biosurfactant production in shaken flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v) as a carbon source at room temperature (30 ± 2°C) and 200 rpm.

N-source (0.1%, w/v)	Final pH*	STR* (mN/m)	EA* (%)	E <sub>24</sub> * (%)	Growth* (OD <sub>660</sub> )
<u>24 h</u>					
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.3 ± 0.0	17.6 ± 0.5 <sup>b**</sup>	43.7 ± 0.1 <sup>a**</sup>	34.1 ± 0.0 <sup>a**</sup>	3.5 ± 0.0
NaNO <sub>3</sub>	7.3 ± 0.0	19.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	3.7 ± 0.0
Urea	7.3 ± 0.0	17.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.0
Peptone	6.4 ± 0.0	0 <sup>c</sup>	33.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.0
<u>48 h</u>					
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.3 ± 0.0	15.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	44.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	11.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.0
NaNO <sub>3</sub>	8.0 ± 0.0	18.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	3.9 ± 0.0
Urea	8.2 ± 0.0	13.5 ± 0.5 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	3.8 ± 0.0
Peptone	6.8 ± 0.0	0 <sup>d</sup>	52.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	38.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.0

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.4 ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ NaNO<sub>3</sub> ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเติม NaNO<sub>3</sub> ความเข้มข้น ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก มีค่าการลดแรงตึงผิวสูงที่สุดเท่ากับ 21.1 mN/m โดยมีความแตกต่างอย่างมี



นัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) (Table 8) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่ดี แต่ไม่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันและเมื่อความเข้มข้นของ  $\text{NaNO}_3$  เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 0.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลง สังเกตได้จากค่าความสามารถในการลดแรงตึงผิวลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของ แหล่งไนโตรเจนลดลงหรือหมดไป (depletion) (Robert *et al.*, 1989; Benincasa *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Davis และคณะ (1999) ศึกษาการผลิต surfactin จากเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ในสถานะที่ขาดแคลนไนโตรเจน โดยเติม  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 ใช้  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$  หมดไปในชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ วัดปริมาณ surfactin ได้สูงสุด 45.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 จากผลการทดลองจึงเลือกใช้  $\text{NaNO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในขั้นตอนต่อไป

Table 8. Effect of sodium nitrate concentration on biosurfactant production in shaken flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v) as a carbon source at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.

NaNO <sub>3</sub> concentration (% w/v)	Final pH*	STR*(mN/m)	EA*(%)	E <sub>24</sub> *(%)	Growth*(OD <sub>660</sub> )
<u>24 h</u>					
0.1	7.3 ± 0.0	19.8 ± 0.2 <sup>b**</sup>	0 <sup>c**</sup>	0 <sup>c**</sup>	3.7 ± 0.0
0.2	7.6 ± 0.0	21.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	3.6 ± 0.0
0.3	8.0 ± 0.0	9.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	67.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	43.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.0
0.4	8.2 ± 0.0	8.8 ± 0.7 <sup>d</sup>	53.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	46.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.0
0.5	8.2 ± 0.0	3.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	67.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	46.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.0
<u>48 h</u>					
0.1	8.0 ± 0.0	14.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.0
0.2	8.3 ± 0.0	14.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.0
0.3	8.7 ± 0.0	3.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	43.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	37.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.0
0.4	8.7 ± 0.0	5.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	18.7 ± 0.0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.1
0.5	8.8 ± 0.0	3.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	51.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	37.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.0

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.5 การให้อากาศ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ NaNO<sub>3</sub> ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ความเร็วรอบแตกต่างกันที่ 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการเพิ่มความเร็วยรอบในการเขย่ามีแนวโน้มเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพราะการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณ

Table 8. Effect of sodium nitrate concentration on biosurfactant production in shaken flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v) as a carbon source at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.

NaNO <sub>3</sub> concentration (% w/v)	Final pH*	STR*(mN/m)	EA*(%)	E <sub>24</sub> *(%)	Growth*(OD <sub>660</sub> )
<u>24 h</u>					
0.1	7.3 ± 0.0	19.8 ± 0.2 <sup>b**</sup>	0 <sup>c**</sup>	0 <sup>c**</sup>	3.7 ± 0.0
0.2	7.6 ± 0.0	21.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	3.6 ± 0.0
0.3	8.0 ± 0.0	9.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	67.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	43.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.0
0.4	8.2 ± 0.0	8.8 ± 0.7 <sup>d</sup>	53.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	46.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.0
0.5	8.2 ± 0.0	3.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	67.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	46.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.0
<u>48 h</u>					
0.1	8.0 ± 0.0	14.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.0
0.2	8.3 ± 0.0	14.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.0
0.3	8.7 ± 0.0	3.0 ± 0.0 <sup>d</sup>	43.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	37.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.0
0.4	8.7 ± 0.0	5.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	18.7 ± 0.0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.1
0.5	8.8 ± 0.0	3.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	51.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	37.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.0

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.5 การให้อากาศ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ NaNO<sub>3</sub> ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ความเร็วรอบแตกต่างกันที่ 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการเพิ่มความเร็วยรอบในการเขย่ามีแนวโน้มเพิ่มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพราะการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณ

ออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอย สามารถดูดซึมออกซิเจนและสารอาหารเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น (Cameotra and Makkar, 1998; Fonseca *et al.*, 2007) การเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด เท่ากับ 22.1 mN/m ( $P < 0.05$ ) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลง (Table 9) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Yeh และคณะ (2006) ศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21332 โดยใช้กลูโคสและ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าการกวนที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่ระดับ 1.5 vvm อัตราการผลิต surfactin สูงสุดที่ระดับ 190 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นตอนนี้ต่อไป

Table 9. Effect of shaking speed on biosurfactant production in shaken flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v) and sodium nitrate (2%, w/v) at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Shaking speed (rpm)	Final pH*	STR* (mN/m)	EA* (%)	E <sub>24</sub> * (%)	Growth* (OD <sub>660</sub> )
<u>24 h</u>					
100	7.4 ± 0.0	10.8 ± 0.2 <sup>c**</sup>	39.5 ± 0.0 <sup>a**</sup>	19.7 ± 0.1 <sup>a**</sup>	2.3 ± 0.0
150	7.5 ± 0.0	8.1 ± 0.2 <sup>c</sup>	39.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.0
200	7.6 ± 0.0	22.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.0
250	7.7 ± 0.0	15.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.0
<u>48 h</u>					
100	8.0 ± 0.1	10.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	59.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	45.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.0
150	8.2 ± 0.0	9.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	68.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	16.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.0
200	8.3 ± 0.0	14.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	3.8 ± 0.0
250	8.4 ± 0.0	15.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	3.9 ± 0.0

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.6 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่ง ไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ  $\text{NaNO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของ อาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ เขย่าโดยใช้ความเร็วรอบที่เหมาะสม คือ 200 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7 มีค่าการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด เท่ากับ 22.7 mN/m ( $P < 0.05$ ) (Table 10) รองลงมาที่พีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 8 มีค่าการลดแรงตึงผิวเท่ากับ 12.8 mN/m เมื่อวิเคราะห์ค่า EA และ E<sub>24</sub> พบว่าการ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 8 ค่า EA และ E<sub>24</sub> ดีที่สุด

เท่ากับร้อยละ 65.6 และ 28.1 ตามลำดับ การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เนื่องจากในระหว่างการเจริญเติบโตเชื้อจะย่อยสลายสารอาหารทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงมากขึ้นส่งผลให้สภาวะในการเจริญของเชื้อไม่เหมาะสม (Cooper and Goldenberg, 1987) สอดคล้องกับการศึกษาของ Reis และคณะ (2004) ศึกษาพีเอชเริ่มต้น (พีเอช 5-8) ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยมีน้ำตาลทรายและ  $\text{NaNO}_3$  เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชเริ่มต้น 5 มีน้ำหนักแห้ง 3.6 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวได้มากที่สุดที่พีเอชเริ่มต้น 7 โดยลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 62.5 dyne/cm ลงมาอยู่ที่ 30.1 dyne/cm และให้ค่า  $E_{24}$  มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้น 8 โดยมีความคงตัวของอิมัลชันในคีโรซีนร้อยละ 57.9 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโต การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ผลิตได้มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมแตกต่างกัน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยทั่วไปค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอชที่เป็นกลาง (Cooper and Goldenberg, 1987; Abu-Ruwaida *et al.*, 1991; Robbins and Levy, 2004) ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นตอนต่อไป

Table 10. Effect of initial pH on biosurfactant production in shaken flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MSM with molasses (2%, w/v), sodium nitrate (2%, w/v) at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 200 rpm.

Initial pH	Final pH	STR (mN/m)	EA (%)	E <sub>24</sub> (%)	Growth* (OD <sub>660</sub> )
<u>24 h</u>					
5	7.4 ± 0.0	7.0 ± 0.8 <sup>d**</sup>	0 <sup>b**</sup>	0 <sup>a**</sup>	3.7 ± 0.0
6	7.5 ± 0.0	12.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.0
7	7.6 ± 0.0	22.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.0
8	7.7 ± 0.0	10.8 ± 1.0 <sup>c</sup>	36.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.0
<u>48 h</u>					
5	8.4 ± 0.0	10.7 ± 1.5 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.0
6	8.5 ± 0.0	10.3 ± 1.0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.0
7	8.5 ± 0.0	18.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.0
8	8.6 ± 0.0	8.3 ± 1.0 <sup>c</sup>	65.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	28.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.0

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3.7 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Bacillus tequilensis* Lc9

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน NaNO<sub>3</sub> ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บ culture broth ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำ culture broth ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที นำส่วนใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 น่าจะมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากกว่า 1 ชนิด โดยผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรกในชั่วโมงที่ 3 ของ

การเลี้ยงเชื้อทำให้ค่าแรงดึงผิวของอาหาร MSM เริ่มลดลงจนกระทั่งมีค่าแรงดึงผิวดำที่สุดในช่วงเวลาที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 44 mN/m แต่สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตในระยะเวลา 30 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อไม่พบความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชัน จากนั้นค่าแรงดึงผิวเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง เป็น 57.6 mN/m การเพิ่มขึ้นของค่าแรงดึงผิวหลังจาก 30 ชั่วโมงแรกเป็นไปได้ว่าสารอาหารต่าง ๆ เริ่มลดลง เชื้อจึงนำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมาใช้เพื่อการเจริญเติบโต (Das *et al.*, 2007) ซึ่งสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมีการผลิตแบบ growth associated (Gudina *et al.*, 2010) และหลังจากการเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 30 เชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพตัวที่สองซึ่งมีคุณสมบัติในการทำให้เกิดอิมัลชัน สามารถตรวจสอบคุณสมบัติในการทำให้อิมัลชันคงตัวสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 54.1 ในช่วงเวลาที่ 60 ของการเลี้ยงเชื้อ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Thaniyavarn และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ ในอาหาร Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) และอาหาร DF ที่ไม่มีกรดอะมิโน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 ในอาหาร YPD พบการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ 2 ตัว คือ RT-32G และ RT-27G เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบด้วย FT-IR, HPLC และตรวจวิเคราะห์หา กรดอะมิโน พบว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพทั้งสองตัวคือ surfactin ซึ่งเป็นสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร DF พบการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ 3 ตัว คือ RT-8I, RT-11I และ BL1193 ผลจากการวิเคราะห์ พบว่า RT-8I และ RT-11I คือ surfactin ส่วนสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ BL1193 ที่เชื้อผลิตไม่พบการมีอยู่ของกรดอะมิโนภายในโครงสร้าง แสดงให้เห็นว่านอกจากเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 จะผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์แล้ว ยังมีการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพชนิดอื่นอีกด้วย



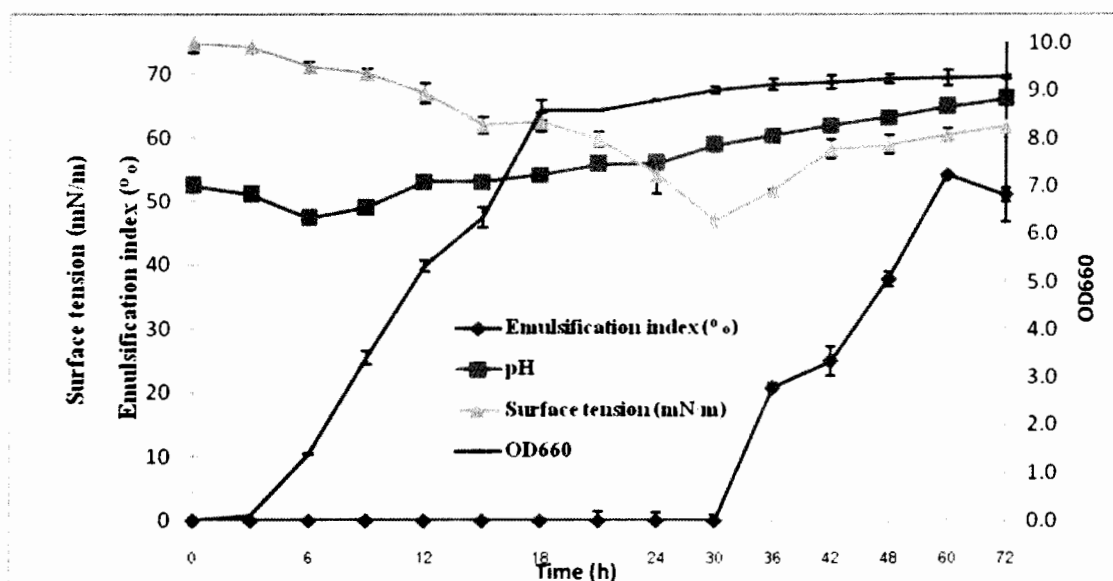


Figure 9. Time course of growth, culture pH, surface tension, and emulsification index ( $E_{24}$ ) by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MSM (pH 7) with molasses (2%, w/v), sodium nitrate (0.2%, w/v) and agitation rate 200 rpm at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

#### 4. วิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เพื่อเลือกช่วงเวลาที่มียาค่าแรงตึงผิวดำต่ำที่สุด ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมาเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เนื่องจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่พบการรายงานว่ามี ความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการเก็บเกี่ยว 3 วิธี ได้แก่ การ ตกตะกอนด้วยกรด, การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและการสกัดด้วยตัวทำละลาย เพื่อให้ได้วิธีการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของสารที่เก็บเกี่ยวได้และค่า CMC จากวิธีการเก็บเกี่ยวทั้ง 3 วิธี เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของสารที่เก็บเกี่ยวได้ พบว่าการ ตกตะกอนด้วยกรดที่พีเอช 2 ได้น้ำหนักตะกอนมากกว่าที่พีเอช 3 และพีเอช 4 เท่ากับ 3.56, 1.58, และ 0.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 11) การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความ เข้มข้นร้อยละ 60 ได้น้ำหนักตะกอนมากกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 และ 40 เท่ากับ 1.201, 0.869, และ 0.635 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ได้น้ำหนักสารสกัดหยาบ เท่ากับ 0.39 กรัมต่อลิตร จากการตกตะกอนด้วยการปรับพีเอชเมื่อพีเอชเป็น

กรดมากขึ้นและการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นสูงมากขึ้น โมเลกุลของสารต่าง ๆ นอกจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น เอนไซม์ที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตและปลดปล่อยออกมาออกเซลล์จะตกตะกอนลงมาด้วยทำให้มีน้ำหนักของสารที่เก็บเกี่ยวได้มากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า CMC ของสารที่เก็บเกี่ยวได้ทั้ง 3 วิธี พบว่าค่า CMC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (2:1) เท่ากับ 0.044 กรัมต่อลิตร ต่ำกว่าค่า CMC ของวิธีอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีความบริสุทธิ์ของสารมากกว่าวิธีอื่น

การผสมตัวทำละลายอินทรีย์โดยการปรับความเป็นขั้วของสารละลายอินทรีย์เป็นวิธีการทั่วไปที่นิยมใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Kuyukina *et al.*, 2005) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic moieties) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic moieties) ทำให้ง่ายต่อการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ คือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) เนื่องจากเป็นการผสมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้ว (คลอโรฟอร์ม,  $\text{Log P} = 1.97$ ) และส่วนที่มีขั้ว (เมทานอล,  $\text{Log P} = -0.74$ ) (Sangster, 1989) ดังนั้นการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม: เมทานอลเป็นวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เหมาะสม

เมื่อเปรียบเทียบค่า CMC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) และสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Triton X-100 ซึ่งเป็นตัวแทนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มมีประจุลบและไม่มีประจุ ตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทั้งสองกลุ่มนี้ กลุ่มมีประจุลบเป็นกลุ่มที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบในผงซักฟอก และกลุ่มที่ไม่มีประจุเป็นกลุ่มที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการซักรีดและผลิตภัณฑ์ซักล้าง (Sarney and Vulfson, 1995; Cameotra and Makkar, 1998) จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวแทนที่ดีเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการชะล้างน้ำมันปาล์มที่ตกค้างในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม จากการเปรียบเทียบค่า CMC พบว่าสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (2:1) มีค่า CMC เท่ากับ 0.044 กรัมต่อลิตร ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์โดย SDS มีค่า CMC เท่ากับ 0.218 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุด 49 mN/m และ Triton X-100 มีค่า CMC เท่ากับ 1.75 กรัมต่อลิตร สามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุด 45 mN/m ตามลำดับ ค่า CMC เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิว สารลดแรงตึงผิวที่ดีควรมีค่า CMC ต่ำ (Kim *et al.*, 2000) ซึ่งค่า CMC มีผลต่อต้นทุนในการนำไปประยุกต์ใช้ หากค่า CMC ต่ำแสดงว่าจะใช้สารลดแรงตึงผิวในปริมาณน้อยด้วย จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากการใช้คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ในการสกัด มีค่า CMC ต่ำที่สุดและสามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดด้วย (Table 12) ดังนั้นจึงเลือกใช้การเก็บเกี่ยวสารลดแรง

ตั้งผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ด้วย กลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) เพื่อใช้ในการศึกษาชั้นต่อไป

Table 11. Method for recovery biosurfactant produced by *Bacillus tequilensis* Lc9.

Method of recovery		Biosurfactant production* (g/L)	CMC (g/L)
Acid precipitation	pH 2	3.56 ± 0.1 <sup>a**</sup>	1.750 <sup>a</sup>
	pH 3	1.58 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.875 <sup>b</sup>
	pH 4	0.84 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.438 <sup>c</sup>
Ammonium sulfate precipitation	40 %	0.635 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.219 <sup>b</sup>
	50 %	0.869 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.219 <sup>b</sup>
	60 %	1.201 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.438 <sup>a</sup>
Chloroform : methanol (2:1) extraction		0.390 ± 0.0	0.044

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

Table 12. Critical micelles concentration of biosurfactant produced by *Bacillus tequilensis* Lc9 and chemically synthetic surfactants was evaluated by surface tension measurement.

Surfactant	Critical micelles concentration (g/L)	Surface tension* (mN/m)
Crude extract	0.044	44.00 ± 0.00 <sup>c**</sup>
SDS	1.750	49.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
Triton X-100	0.219	45.00 ± 0.00 <sup>b</sup>

\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

\*\* Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

## 5. คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

### 5.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC คือ 0.044, 0.218, และ 1.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับพีเอชของตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 2-12 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl แล้วทดสอบกิจกรรมในการลดแรงตึงผิว พบว่าค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 เพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชลดลงต่ำกว่า 5 และมากกว่า 10 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเกิดการตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรดสูงและด่างสูง (Sutthivanitchakul *et al.*, 1999) แต่กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงพีเอช 6-9 ในขณะที่ SDS และ Triton X-100 มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวคงตัวในช่วงพีเอช 3-8 และพีเอช 5-8 ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *B. tequilensis* Lc9 ไม่เหมาะสมในช่วงพีเอชเป็นกรดและค่าแรงตึงผิวจะคงตัวเมื่อมีพีเอชเป็นกลางถึงเป็นด่าง เนื่องจากเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น NaOH ทำให้ความคงตัวของไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีขึ้น โดย  $\text{Na}^+$  จะจับกับโครงสร้างของกรดไขมันในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทำให้เกิดไมเซลล์ดีขึ้น (Li *et al.*, 2009) แต่จากรายงานของ Bai และคณะ (1998) ศึกษาผลของอออนบวก ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) ต่อคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด พบว่าเมื่อความเข้มข้นของอออนบวกสูงมากเกินไปจะมีผลทำให้กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวลดลง เนื่องจากอออนบวกจะเหนี่ยวนำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการตกตะกอน ซึ่งผลของพีเอชต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย (Klein and Wagner, 1987; Abouscoud *et al.*, 2008) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Vaz และคณะ (2012) ศึกษาพีเอชต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางการค้า ได้แก่ Glucopone<sup>®</sup> 215, Glucopone<sup>®</sup> 650, Findet<sup>®</sup> 1214N/23 และ linear alkylbenzene sulfonates (LAS) พบว่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวทางการค้าอยู่ในพีเอชช่วงกว้าง 3-10 แต่กิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเหมาะสมที่พีเอช 5-10 และลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางส่วนจะตกตะกอนทำให้ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น (Nitschke and Pastore, 2006)

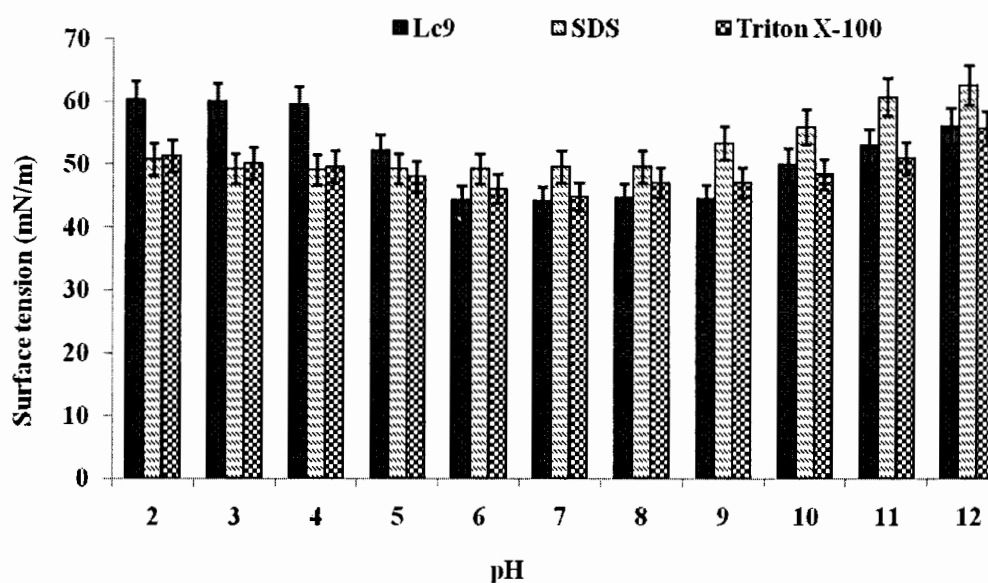


Figure 10. Effect of pHs on surface tension of biosurfactant produced by *Bacillus tequilensis* Lc9 versus chemical surfactant (SDS and Triton X-100). Bars represent the standard deviation from three determinations.

## 5.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

เมื่อนำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *B. tequilensis* Lc9 และสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC คือ 0.044, 0.218, และ 1.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วตั้งไว้ให้อุณหภูมิกลับลงมาที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบกิจกรรมในการลดแรงดึงผิว พบว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ซึ่งเห็นได้จากค่าแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25-110 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ค่าแรงดึงผิวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ยังคงต่ำกว่า 50 mN/m ซึ่งแตกต่างกับผลของอุณหภูมิต่อสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ SDS และ Triton X-100 ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25-80 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมในการลดแรงดึงผิวน้อยกว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *B. tequilensis* Lc9 เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สายของไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล SDS และ Triton X-100 จากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (autoclave) ทำให้กิจกรรมการลดแรงดึงผิวลดลง (Pornsunthorntawe et al., 2008; Zhang et al., 2008) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษา Wang และคณะ (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก

เชื้อ *Bacillus subtilis* strain JA-1 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 4-121 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแรงตึงผิวต่ำกว่า 35 mN/m

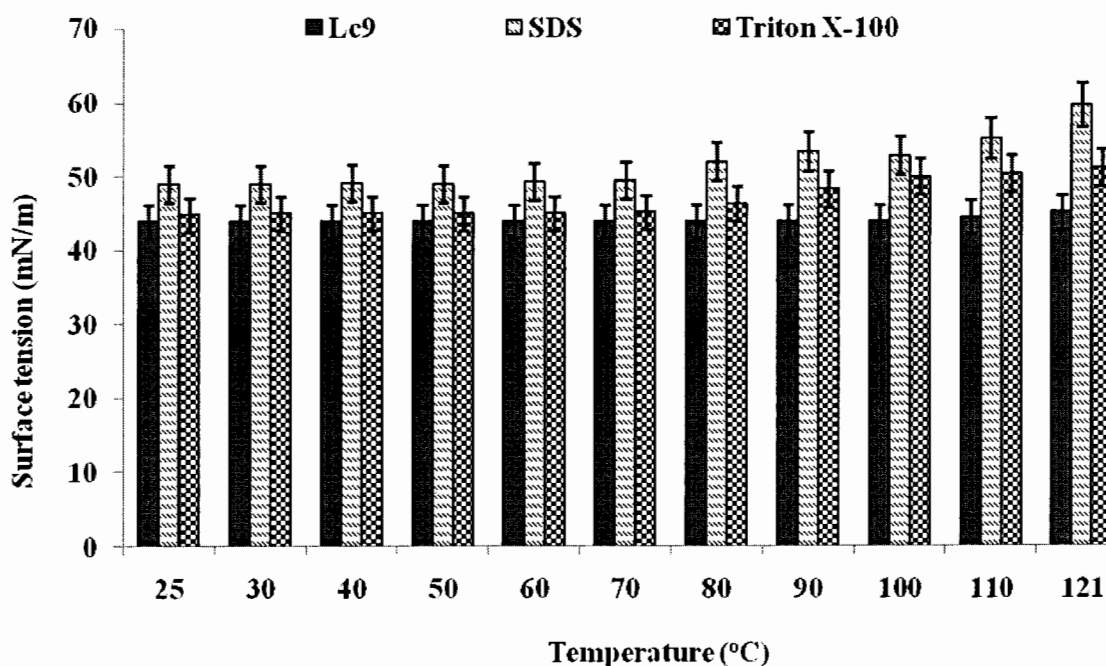


Figure 11. Effect of temperature on surface tension of biosurfactant produced by *Bacillus tequilensis* Lc9 versus chemical surfactant (SDS and Triton X-100). Bars represent the standard deviation from three determinations.

### 5.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเล โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำทะเลอาจมีผลต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นจึงต้องศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ซึ่งในน้ำทะเลจะมีเกลือเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 3.1-3.8 ซึ่งประกอบด้วย โซเดียมร้อยละ 1.0, คลอไรด์ร้อยละ 1.9, แมกนีเซียมร้อยละ 0.1 และแคลเซียมร้อยละ 0.04 (Millero *et al.*, 2008)

ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. tequilensis* Lc9 พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1-6 ไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ แต่กิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียม

คลอไรด์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 9 และ 12 โดยค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจาก 44 mN/m เป็น 48.66 และ 50.00 mN/m ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าระดับของโซเดียมคลอไรด์ในน้ำทะเล 6 เท่า และที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมการลดแรงตึงผิวมีประสิทธิภาพลดลง สำหรับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีก็ให้ผลสอดคล้องในทิศทางเดียวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้โดยพบว่ากิจกรรมในการลดแรงตึงผิวของ SDS และ Triton X-100 มีประสิทธิภาพลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น จากรายงานของ Thimon และคณะ (1992) ไอออนของเกลือจะมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากไอออนของเกลือจะจับหมู่คาร์บอกซิลิกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ส่งผลให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวมีประสิทธิภาพลดลง (Fig. 12a) ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Li และคณะ (2009) ศึกษาผลของ  $\text{Na}^+$  (monovalent ions) ต่อการเกิดไมเซลล์ของ surfactin พบว่า  $\text{Na}^+$  มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย  $\text{Na}^+$  จะจับกับสายของกรดไขมันที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ มีผลต่อประจุไฟฟ้าสถิต (electrostatic repulsions) ของ surfactin ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์ได้ง่ายขึ้น ค่า CMC ของ surfactin จึงลดลง เมื่อความเข้มข้นของอิออนบวกสูงมากเกินไปจะมีผลทำให้กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวลดลง เนื่องจากอิออนบวกจะเหนี่ยวนำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการตกตะกอน (Bai *et al.*, 1998)

ผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. tequilensis* Lc9 (Fig. 12b) แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี SDS และ Triton X-100 โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 44-46 mN/m เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ในน้ำทะเล พบว่าสารลดแรงตึงผิวทั้ง 3 ชนิดมีความคงตัวต่อแมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าในน้ำทะเล โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีกิจกรรมดีที่สุดและมีค่าแรงตึงผิวต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ จากภาพที่ 12c ศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก พบว่าที่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.04 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี SDS และ Triton X 100 แต่เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 0.06 ค่าแรงตึงผิวค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวต่อแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 เท่ากับแคลเซียมคลอไรด์ในน้ำทะเล สอดคล้องกับผลการทดลองของ Manecrat และ Phetrong (2007) ศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว



ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ซึ่งแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากเชื้อ *Myroides* sp. SM1 มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-9 และการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้เพียงเล็กน้อย แต่การเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4-18 มิลลิโมล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูญเสียกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน

นอกจากการทดสอบผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้วยังมีการศึกษาการใช้ น้ำทะเล ในการทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. tequilensis* Lc9 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ด้วย เพื่อดูผลโดยรวมขององค์ประกอบต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งสามชนิด ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังคงมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวในน้ำทะเล โดยให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 44.3 mN/m กิจกรรมสูงกว่า Triton X-100 และ SDS ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 48.3 และ 50.0 mN/m ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวในสภาวะปกติ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด คือ 44.0 mN/m จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. tequilensis* Lc9 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเลได้ (Table 13)

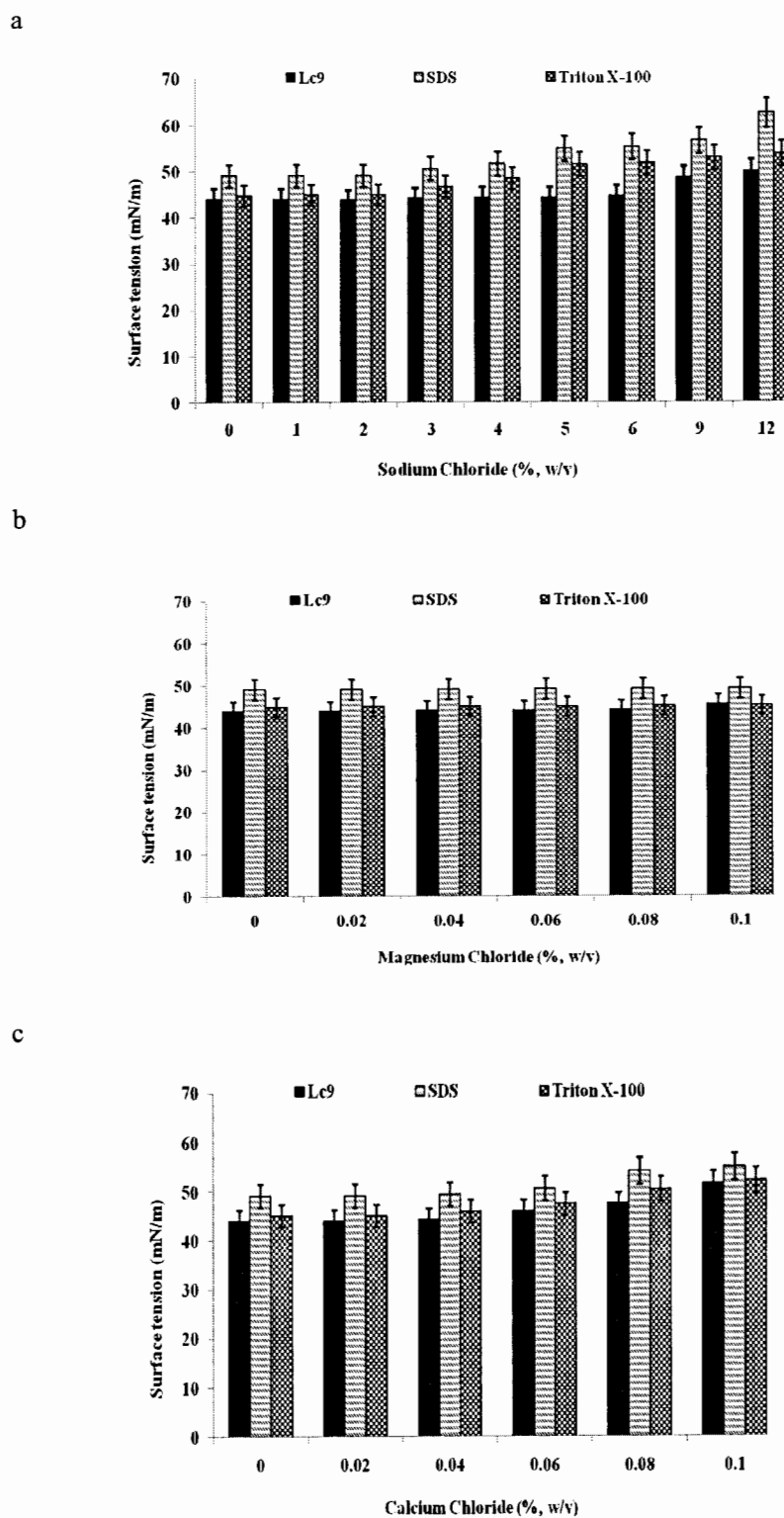


Figure 12. Effect of NaCl concentration (% w/v) (a), MgCl<sub>2</sub> concentration (% w/v) (b) and CaCl<sub>2</sub> concentration (% w/v) (c) on surface tension of biosurfactant produced by *Bacillus tequilensis* Lc9 versus chemical surfactant (SDS and Triton X-100).

Table 13. Effect of seawater on surface tension activity of biosurfactant crude extract from *Bacillus tequilensis* Lc9 and chemical surfactant (SDS and Triton X-100).

Surfactant	Surface tension (mN/m) <sup>*</sup>	
	Dissolved in seawater	Dissolved in distilled water
Crude extract	44.3 ± 0.5 <sup>**</sup>	44.0 ± 0.0 <sup>**</sup>
SDS	50.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	49.1 ± 0.2 <sup>a</sup>
Triton X-100	48.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	45.0 ± 0.0 <sup>b</sup>

<sup>\*</sup> Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

<sup>\*\*</sup> Different letters in the same column within the same parameter studied indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

## 6. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

เลี้ยงเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในสภาวะที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและมี  $\text{NaNO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 ชั่วโมงซึ่งเป็นสภาวะที่ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) โดยปริมาตร นำสารสกัดหยาบที่ได้มาศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 6.1 Thin Layer Chromatography

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย TLC ที่มี silica gel 60 F<sub>254</sub> เป็น stationary phase นำไปแช่ใน mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) โดยปริมาตร เมื่อตรวจสอบด้วย ninhydrin และ anisaldehyde ให้ค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.74 (Fig. 13) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) โดยปริมาตร ไม่เหมาะสมในการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ดังนั้นจึงนำสารสกัดหยาบมาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยใช้ TLC RP-18 F<sub>254</sub>s ชนิด reverse phase มี mobile phase คือ acetonitrile : water (2:1) โดยปริมาตร เมื่อตรวจสอบด้วย ninhydrin, anisaldehyde และ iodine ปรากฏจุดบน TLC chromatogram 2 จุด ให้ค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.10 และ 0.68 ตามลำดับ (Fig. 14) จากผลการทดลองสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม:เมทานอลที่สกัดได้

เมื่อนำมาทดสอบองค์ประกอบเบื้องต้นด้วย TLC พบว่าปรากฏจุด 2 จุดบนแผ่น TLC แสดงว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีสารอื่นปนเปื้อนมาด้วยจึงทำการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์ในขั้นขั้นตอนต่อไป

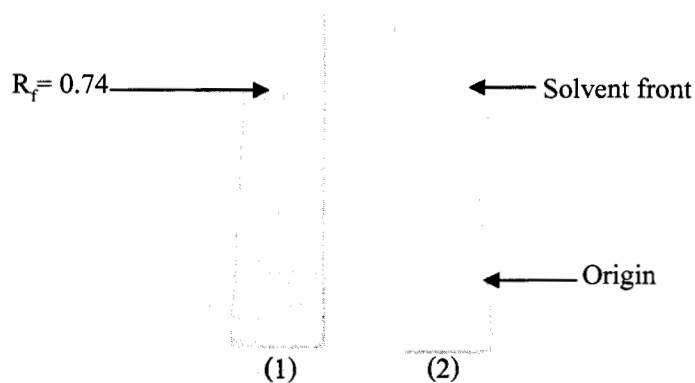


Figure 13. TLC chromatogram of crude biosurfactant from *Bacillus tequilensis* Lc9 using chloroform: methanol (2:1) as mobile phase on a normal-phase silica gel.

- (1) Using anisaldehyde as a spraying reagent for sugar detection
- (2) Using ninhydrin as a spraying reagent for amino acid detection

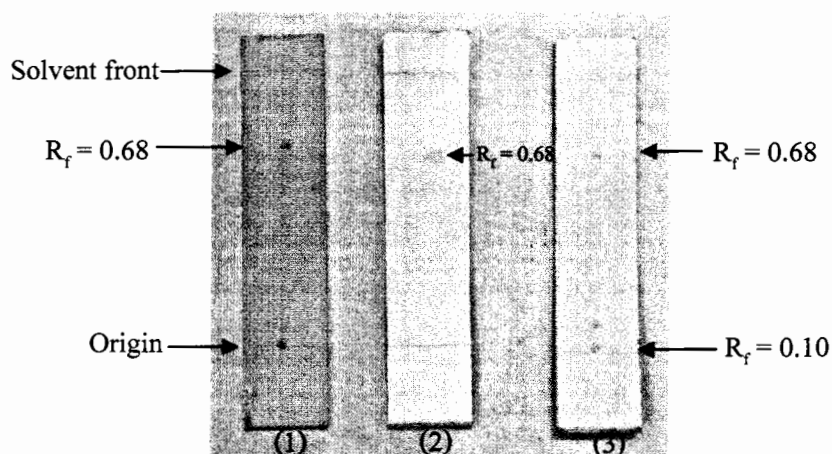


Figure 14. TLC chromatogram of crude biosurfactant from *Bacillus tequilensis* Lc9 using acetonitrile : water (2:1) as mobile phase on a reverse-phase silica gel.

- (1) Using anisaldehyde as a spraying reagent for sugar detection
- (2) Using ninhydrin as a spraying reagent for amino acid detection
- (3) Using iodine vapor for organic compound detection

## 6.2 การแยกสารโดย Column Chromatography

การทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม: เมทานอล โดยใช้คอลัมน์ SEP-PAK ( $C_{18}$ ) แสดงขั้นตอนการแยกดังภาพที่ 15 ตรวจสอบลักษณะของสารบนแผ่น TLC โดยใช้ mobile phase คือ acetonitrile: น้ำ (5:1) และรวมสารที่มีลักษณะโครมาโทแกรมเหมือนกันเข้าด้วยกัน สามารถแยกสารสกัดหยาบออกเป็น 3 ส่วนย่อยด้วยกัน ได้แก่ ส่วนย่อยที่ 1 (F1), ส่วนย่อยที่ 2 (F2) ส่วนย่อยที่ 3 (F3) และทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี oil displacement area ให้ผลดังภาพที่ 16 พบว่าส่วนย่อยที่ 1 ไม่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว โดยเมื่อนำสารจากส่วนย่อย F1 ไปละลายในน้ำกลั่นแล้วนำมาหยดบนหยดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วไม่พบการแผ่ออกของสารละลาย เมื่อนำส่วนย่อย F2 และ F3 ไปทดสอบเช่นเดียวกัน พบว่าส่วนย่อย F2 มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดพบการแผ่ออกของสารละลายกว้างเต็มงานเพาะเชื้อ (Fig. 17)

นำส่วนย่อย F2 ซึ่งมีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด แต่ปรากฏจุดบนแผ่น TLC จำนวน 2 จุด มาแยกสารให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ SEP-PAK ( $C_{18}$ ) อีกครั้ง เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาตรวจสอบลักษณะของสารบนแผ่น TLC พบว่า TLC chromatogram ที่ตรวจสอบด้วย anisaldehyde และ rhodamine B ให้ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.42 (Fig. 18) โดย anisaldehyde เป็นสารที่ใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของน้ำตาล (Schulz *et al.*, 1991) และ rhodamine B เป็นสารที่ใช้ตรวจสอบการมีอยู่ของไขมัน (Das *et al.*, 2009) ส่วนการตรวจสอบด้วย ninhydrin ไม่ปรากฏจุดบน TLC chromatogram แสดงว่าไม่พบการมีอยู่ของกรดอะมิโน จากการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้น พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีน้ำตาลและไขมันเป็นองค์ประกอบ

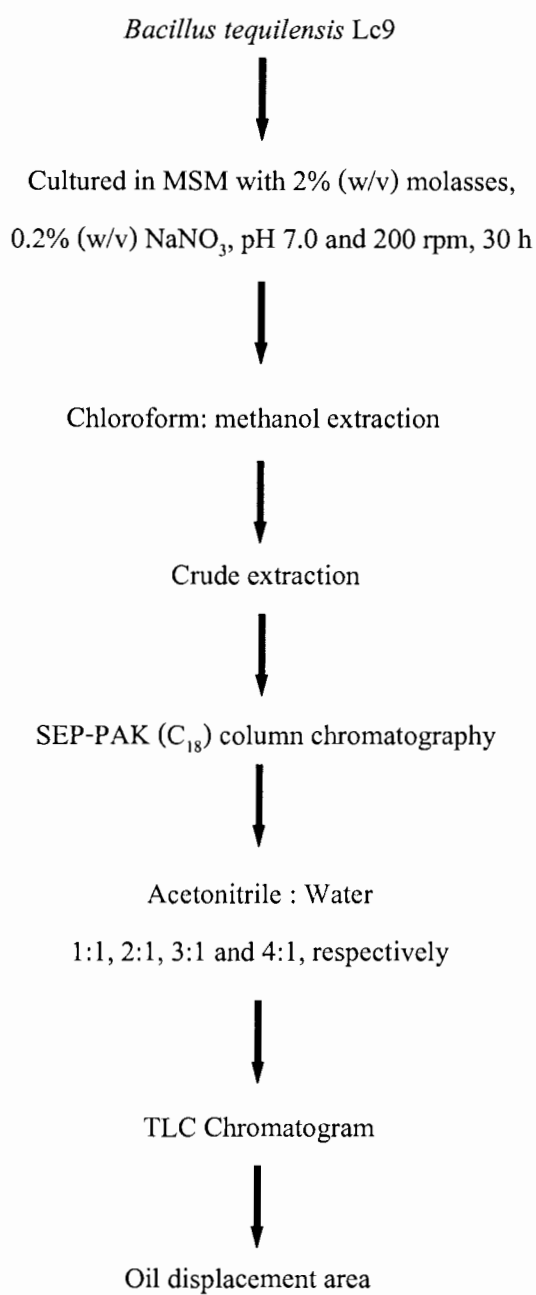


Figure 15. Isolation diagram of crude biosurfactant from *Bacillus tequilensis* Lc9.

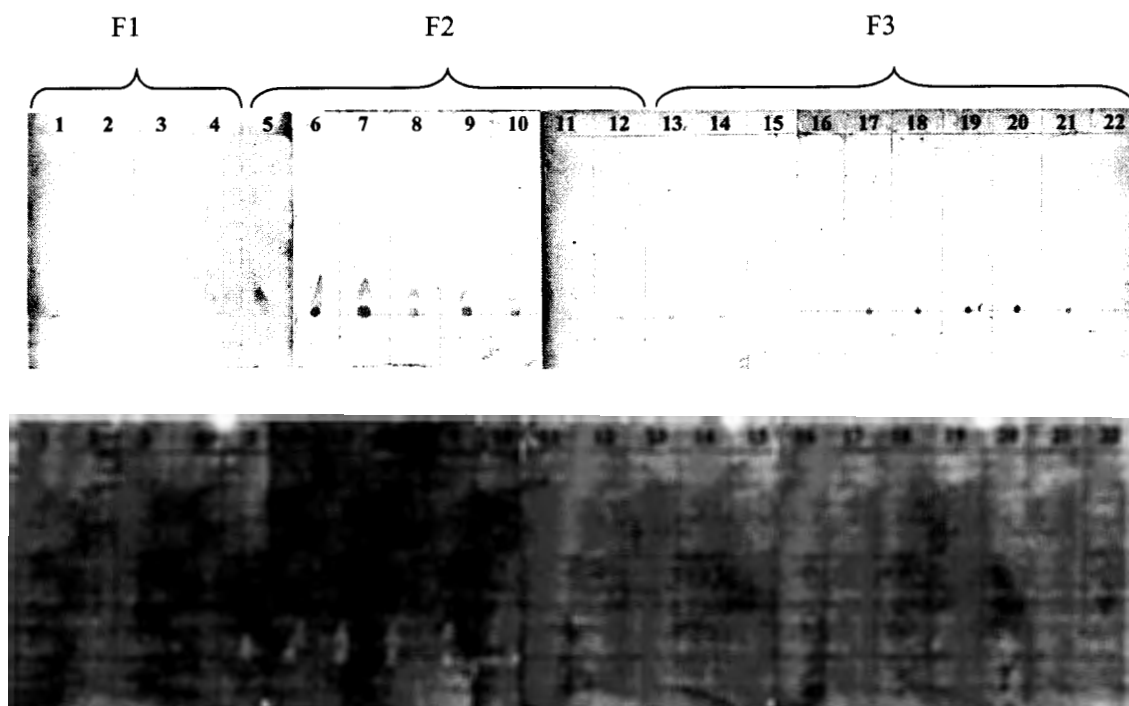


Figure 16. TLC chromatogram of partially purified biosurfactant from *Bacillus tequilensis* Lc9

using: Acetonitrile : Water (2:1) as mobile phase on a reverse-phase silica gel.

(1) Using anisaldehyde as a spraying reagent for sugar detection

(2) Using ninhydrin as a spraying reagent for amino acid detection

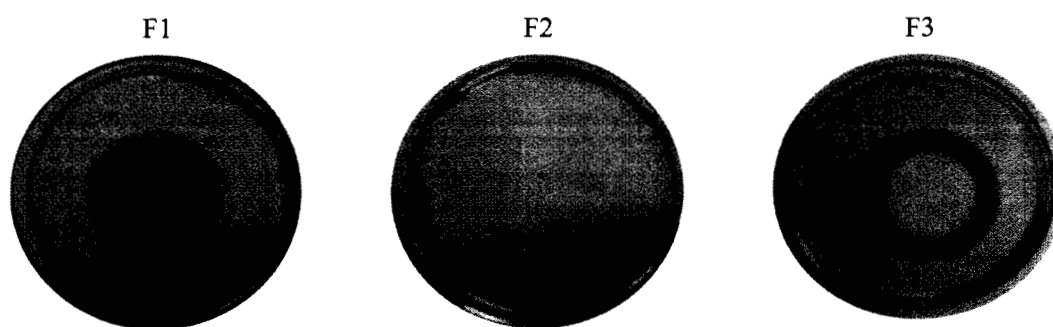


Figure 17. Biosurfactant activity of partially purified biosurfactant from *Bacillus tequilensis* Lc9

using used lubricating oil for oil displacement area.

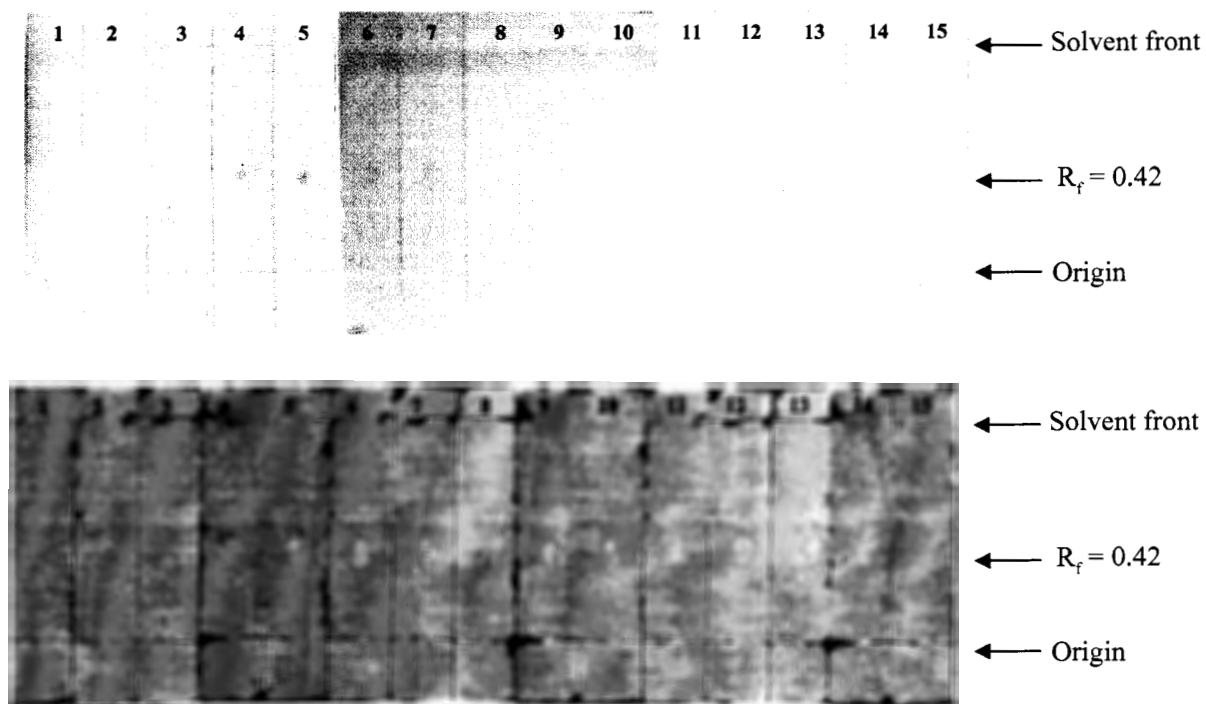


Figure 18. TLC chromatogram of partially purified biosurfactant from *Bacillus tequilensis* Lc9 using acetonitrile: water (5:1) as mobile phase on a reverse-phase silica gel.

- (1) Using anisaldehyde as a spraying reagent for sugar detection
- (2) Using iodine vapor for organic compound detection

### 6.3 Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์ด้วย FT-IR ซึ่งใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสาร ผลจาก FT-IR spectrum พบการยืดตัวของ O-H ที่  $3305\text{ cm}^{-1}$ , การยืดตัวของ C-H ที่  $2926\text{ cm}^{-1}$ , การยืดตัวของ C-O ที่  $1648$  และ  $1736\text{ cm}^{-1}$  และการยืดตัวของ C-O-C ที่  $1072\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งการวิเคราะห์ผลจาก FT-IR spectrum บ่งบอกถึงการมีน้ำตาลและไขมันเป็นองค์ประกอบ (Fig. 19)



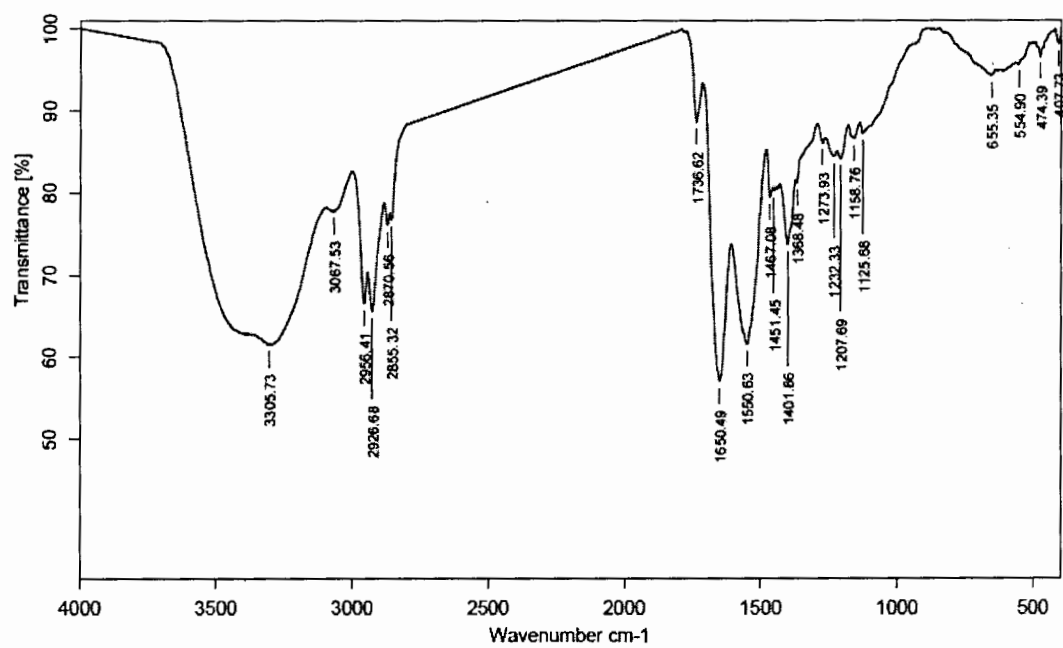


Figure 19. FT-IR spectrum of partially purified biosurfactant from *Bacillus tequilensis* Lc9.

## บทที่ 4

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

แยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 808 ไอโซเลต จากตัวอย่างดิน น้ำทิ้งและกากของเสียบริเวณโรงงานน้ำมันปาล์มจำนวน 54 ตัวอย่าง นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทำ primary screening โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal salt medium (MSM) ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วัดกิจกรรมการลดแรงดึงผิวโดยวิธี qualitative drop collapsing test พบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการลดแรงดึงผิวจำนวน 72 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 72 ไอโซเลตมาทำ secondary screening โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำมันปาล์มใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วัดกิจกรรมการลดแรงดึงผิวโดยวัดค่าแรงดึงผิว ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) และค่าความสามารถในการคงตัวของอิมัลชัน ( $E_{24}$ ) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดแรงดึงผิวได้ดีที่สุดจำนวน 14 ไอโซเลต

จากการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี 16S rDNA พบว่า เชื้อไอโซเลต Lc9 คือเชื้อ *Bacillus tequilensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ยังไม่พบการรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ โดยเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 จะผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพแล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM (พีเอช 7) ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและมี  $\text{NaNO}_3$  ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °C) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 มีกิจกรรมการลดแรงดึงผิวสูงสุด 44 mN/m เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง

เมื่อใช้ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อจากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ปริมาตร 1 ลิตร มาสกัดสารลดแรงดึงผิวชีวภาพด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) จะได้ตะกอนสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ 0.39 กรัม โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดไมเซลล์เท่ากับ 0.044 กรัมต่อลิตร และมีค่าแรงดึงผิวเท่ากับ 44 mN/m

จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ พบว่าที่พีเอช 6-9 ค่าแรงดึงผิวไม่เปลี่ยนแปลงเท่ากับ 44 mN/m สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแรงดึงผิวเท่ากับ 44-47 mN/m สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยพบว่าค่าแรงดึงผิวต่ำกว่า 50 mN/m นอกจากนี้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังมีความคงตัวต่อแมกนีเซียมคลอไรด์

และแคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 และ 0-0.04 ตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังคงมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวในน้ำทะเลโดยมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 44.3 mN/m

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์และศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตรวจสอบโดย Thin Layer Chromatography และ Fourier Transform Infrared Spectrometer พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. tequilensis* Lc9 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีน้ำตาลและไขมันเป็นองค์ประกอบ

### ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกอื่น ๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อเพิ่มผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
3. ศึกษาการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. tequilensis* Lc9 ไปประยุกต์ใช้ในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม, เพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวน้ำมันปาล์ม, ย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและการยับยั้งเชื้อก่อโรค
4. ในการศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้โดยวิธี Thin layer chromatography ควรเปลี่ยนความเข้มข้นของ mobile phase ให้มีความหลากหลายและในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเพื่อหาสภาวะที่สามารถแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด และใช้ column chromatography ชนิด normal phase เพื่อแยกสารที่ไม่ต้องการออกไปให้มากที่สุดก่อน

## เอกสารอ้างอิง

- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 223: 143-151.
- Abushady, H.M., Bashandy, A.S., Aziz, N.H. and 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.
- Al-Bahry, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Elshafie, A.E., Al-Bemani, A.S., Joshi, S.J., Al-Makhmari, H.S. and Al-Sulaimani, H.S. 2012. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *Int. Biodeterio. and Biodegrad.* xxx: 1-6.
- Anandaraj, B. and Thivakaran, P. 2010. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. *Biosci. Technol.* 1: 120-126.
- Aparna, A., Srinikethan, G. and Hegde, S. 2012. Isolation, screening and production of biosurfactant by *Bacillus clausii* 5B. *Res. J. Biotechnol.* 3: 49-56.
- Atlas R.M. 1992. Petroleum microbiology. *In* J. Lederberg (ed.). pp. 363-369. *Encyclopedia of Microbiology*, Academic, Baltimore, USA.
- Bai, G., Brusseau, M.L. and Miller, R.M. 1998. Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by a biosurfactant. *J. Contam. Hydrol.* 30: 265-279
- Banat, I.M., Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508.
- Batista, S.B., Mouteer, A.H., Amorim, F.R. and Totola, M.R. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Biores. Technol.* 97: 868-875.
- Bayoumi, R.A., Haroun, B.M., Ghazal, E.A. and Maher, Y.A. 2010. Structural analysis and characteristics of biosurfactants produced by some crude oil utilizing bacterial strains. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 4: 3484-3498.

- Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M.A. and Moraes, I.O. 2002. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *J. Food Eng.* 54: 283-288.
- Binazadeh, M., Karimi, I.A. and Li, Z. 2009. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. *Enz. Microbiol. Technol.* 45: 195-202.
- Bodour, A.A. and 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.
- Bodour, A.A., Drees, K.P. and Raina, M.M. 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3280-3287.
- Bognolo, G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloid. Surf. A.* 152: 41-52.
- Cameotra, S.S. and Makkar, R.S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 520-529.
- Cirigliano, M.C. and Carman, G.M. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 747-750.
- Cooper, D.G. 1986. Biosurfactants. *Microbiol. Sci.* 3: 145-149.
- Cooper, D.G. and Goldenberg, B.G. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 224-229.
- Cooper, D.G. and Paddock, D.G. 1984. Production of biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 173-176.
- Crosman, J.T., Pinchuk, R.J. and Cooper, D.G. 2002. Enhanced biosurfactant production by *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511 using self-cycling fermentation. *JAOCS* 79: 467-472.
- da Rosa, C.F.C., Michelon, M., de Medeiros Burkert, J.F., Kalil, S.J. and Burkert, C.A.V. 2010. Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 9012-9017.

- Das, P., Mukherjee, S. and Sen, R. 2009. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Biores. Technol.* 100: 1015-1019.
- Das K. and Mukherjee, A.K. 2007. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. *Proc. Biochem.* 42: 1191-1199.
- Davis, D.A., Lynch, H.C. and Varley, J. 1999. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzym. Microb. Technol.* 25: 322-329.
- Deleu, M. and Paquot, M. 2004. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *Comptes. Rendus. Chimie.* 7: 641-646.
- Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 47-64.
- Desai, J.D. and Desai, A.J. 1993. Production of Biosurfactants. *In Biosurfactants: Production, Properties, Applications.* (Kosaric, N. ed). p. 65-97. Marcel Decker. Inc. New York. USA.
- Edwards J.R. and Hayashi, J.A. 1965. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 415-421.
- 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. and Balogun, S. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources on biosurfactant producing *Bacillus* species isolates. *Nig. J. Microbiol.* 23: 1915-1921.
- Fiechter, A. 1992. Integrated systems for biosurfactant synthesis. *Pure Appl. Chem.* 64: 1739-1743.
- Fonseca, R.R., Silva, A.J.R., de Franca, F.P., Cardoso, V.L. and 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. and 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. and 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. and 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. Microb.* 45: 588-592.
- Gruber, T., Chmiel, H., Käpelli, O., Sticher, P. and Fiechter, A. 1993. Integrated Process for Continuous Rhamnolipid Biosynthesis. *In Biosurfactant. Production, Properties, Applications.* Vol. 48 (Kosaric, N., ed.). pp. 157-173. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Gudina, E.J., Teixeira, J.A. and Rodrigues, L.R. 2010. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloid. Surf.* 76: 298-304.
- He, H., Shen, B., Korshalla, J. and Carter, G.T. 2001. Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus curculans* J2154. *Tetrahedron.* 57: 1189-1195.
- Herman, D.C., Artiola, J.F. and Miller, R.M. 1995. Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2280-2285.
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F. and Suzuki, T. 1971. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 24: 855-859.
- Joshi, S., Bharuch, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai, A.J. 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Biores. Technol.* 99: 195-199.
- Kaplan, N. and Rosenberg, E. 1982. Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1335-1341.
- Karant, N.G.K., Deo, P.G. and Veenanadig, N.K. 1999. Microbial production of biosurfactant and their importance. *Curr. Sci.* 77: 126-166.

- Kim, H.S., Jeon, J.W., Lee, H.W., Park, Y., Seo, W.T., Oh, H.M., Katsuragi, T., Tani, Y. and Yoon, B.D. 2002. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, from *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.* 24: 225-229.
- Kim S., Lim, E., Lee, S., Lee J. and Lee, T. 2000. Purification and characterization of biosurfactant-producing *Bacillus* species. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 249-253.
- Kim, H.S., Yoon, B., Lee, C., Suh, H., Oh, H.M., Katsuragi, T. and Tani, Y. 1997. Production and properties of lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 41-46.
- Kitamoto, D., Isoda, H. and Nakahara, T. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 187-201.
- Klein, J. and Wagner, F. 1987. Different strategies to optimize the production phase of immobilised cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 501: 306-316.
- Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A. and Ritchkova, M.I. 2001. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyltertiary-butyl ether extraction. *J. Microb. Meth.* 46: 149-156.
- Lai, C.C., Huang, Y.C., Wei, Y.H. and Chang, J.S. 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 167: 609-614.
- Lang, S. 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid. In.* 7: 12-20.
- Li, J.L. and Chen, B.H. 2009. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mater.* 2: 76-94.
- Li, Y.M., Haddad, N.I.A., Yang, S.Z. and Mu, B.Z. 2008. Variants of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-MS. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 14: 29-235.
- Loncar, E.S., Petrovic, S., Malbaša, R.V. and Verac, R.M. 2000. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. *Food Nahrung.* 44: 138-139.
- Maneerat, S. and Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29: 781-791.



- Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H. and Kawai, K. 2006. A novel crude oil emulsifier extracted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. SM7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 254-259.
- Mercade, M.E., Monleon, L., de Andres, C., Rodon, I., Martinez, E., Espuny, M.J. and Manresa, A. 1996. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 161-166.
- Millero, F.J., Feistel, R., Wright, D.G. and McDougall, T.J. 2008. The composition of standard seawater and the definition of the reference-composition salinity scale. *Deep-sea Research I.* 55: 50-72.
- Morikawa, M., Ito, M. and Imangka, T. 1993. Isolation of a new surfactin producer, *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regular gene, *Psf-1*. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 255-261.
- Mukherjee, S., Das, P., Sivapathasekaran, C. and Sen, R. 2009. Antimicrobial biosurfactant from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 281-288.
- Mulligan, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133: 183-198.
- Mulligan, C.N. and Gibbs, B.F. 1993. Factors Influencing the Economics of Biosurfactants. *In Biosurfactants, Production, Properties and Applications.* Vol. 13. (Kosaric, N., ed.). pp. 329-371. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Mulligan, C.N., Chow, T.Y.K. and Gibbs, B.F. 1989. Enhanced biosurfactant production by a mutant *Bacillus subtilis* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 486-489.
- Najafia, A.R., Rahimpoura, M.R., Jahanmiria, A.H., Roostaazadb, R., Arabianb, D. and Ghobadib, Z. 2010. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycooides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *J. Chem. Eng.* 163: 188-194.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3240-3244.

- Niaounakis, M. and Halvadakis, C.P. 2004. Olive-mill waste management: literature review and patent survey. Typothito-George Dardanos Publications, Athens, ISBN 960-402-123-0.
- Nicholson, S.E, Yin, X. and Ba, M.B. 2000. On the feasibility of using a lake water balance model to infer rainfall: an example from Lake Victoria. *Hydrol. Sci. J.* 45: 75-95.
- Niescher, S., Wray, V., Lang, S., Kaschabek, S.R. and Schlomann, M. 2006. Identification and structural characterisation of novel trehalose dinocardiolipids from *n*-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 605-611.
- Nitschke, M. and Pastore, G. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Biores. Technol.* 97: 336-341.
- Okoh A.I. and Trejo-Hernandez M.R. 2006. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 2520-2525.
- Plaza, G.A., Zjawiony, I. and Banat, I.M. 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon contaminated and bioremediated soils. *J. Pet. Sci. Eng.* 50: 71-77.
- Panilaitis, B., Castro, G.R., Solaiman, D. and Kaplan, D.L. 2007. Biosynthesis of emulsion biopolymers from agro-based feedstocks. *J. Appl. Microbiol.* 102: 531-537.
- Park, C.B. and Lee, S.B. 1998. Ammonia production from yeast extract and its effect on growth of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 3: 115-118.
- Pornsunthorntawee, O., Arttaweeporn, N., Paisanjit, S., Somboonthanate, P., Abe, M., Rujiravanit, R. and Chavadej, S. 2008. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochem. Eng. J.* 42: 172-179.
- Priya, T. and Usharani, G. 2009. Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Botany Res. Int.* 2: 284-287.
- Providenti, M.A., Flemming, C.A., Lee, H. and Trevors, J.T. 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactant or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 17: 15-26.

- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutoas, Y., Petsas, I., Marchant, R. and Banat, I.M. 2003. Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipids and micronutrients. *Biores. Technol.* 90: 159-168.
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R. and Banat, I.M. 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Prog.* 18: 1277-1281.
- Ramana, K.V. and Karanth, N.G. 1989. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 45: 249-257.
- Rapp, P., Bock, H., Wray, V. and Wagner, F. 1979. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. *J. Gen. Microbiol.* 115: 491-503.
- Reis, F.A.S.L., Servulo, F.C. and de Franc, F.A. 2004. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116: 899-912.
- Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnol. Lett.* 11: 871-874.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural role of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3: 229-236.
- Roongsawang, N., Thaniyavarn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Properties of biosurfactant produced by *Bacillus* sp. Strain KP-2. *Thai J. Biotechnol.* 1: 54-60.
- Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Gottlieb, A., Rosenhak, S. and Ron, E.Z. 1988. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 402-408.
- Rosenberg, E., Ziclerberg, A., Rubinowitz, C. and Gutnick, D.L. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 402-408.
- Safary, A., Ardakani, M.R., Suraki, A.A., Khiavi, M.A. and Motamedi, H. 2010. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Caspian Sea. *Biotechnol.* 9: 378-382.

- Salehizadeh, H. and Mohammadizad, S. 2009. Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis*. Iran. J. Biotechnol. 7: 216-223.
- Saharan, B.S., Sahu, R.K. and Sharma, D. 2011. A Review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. Genet. Eng. Biotechnol. J. 2011: GEBJ-29.
- Sahoo, S., Datta, S., Biswas, D. and Choudhury, R.B. 2010. Biosurfactant production from *n*-paraffins by an air isolate *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. J. Oleo. Sci. 59: 601-605.
- Saimmai, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2011. Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. Appl. Biochem. Biotechnol. 165: 315-335.
- Sarney, D.B. and Vulfson, E.N. 1995. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. Trends Biotechnol. 13: 164-172.
- Sarubbo, L.A. Marcal, M.D.C., Neves, M.L.C., Silva, M.D.P.C., Porto, A.L.F. and Campos-Takaki, G. 2001. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. Appl. Biochem. Biotechnol. 95: 59-68.
- Schulz, D., Pasheri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Gunkel, W. 1991. Marine biosurfactants, I. screening for biosurfactant among crude oil degrading marine microorganisms from the north sea. Z. Naturforsch. 46: 197-203.
- Shepherd, R., Rockey, J., Sutherland, I.W. and Roller, S. 1995. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. J. Biotechnol. 40: 207-217.
- Silva, S.N.R.L., Farias, C.B.B., Rufino, R.D., Luna, J.M. and Sarubbo, L.A. 2010. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. Colloid. Surf. 79:174-183.
- Singh, P. and Cameotra, S.S. 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends Biotechnol. 22: 142-146.
- Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Sneath, P.H.A., Main, N.S., Sharp, M.E., Holt, J.G. and Wilkins, W., ed.). pp. 1104-1140. Baltimore, USA.
- Sugiura, K., Ishihara, M. and Shimauchi, T. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environ. Sci. Technol. 31: 45-51.

- Sutthivanitchakul, B., Thaniyavorn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* F2.2. Thai J. Biotechnol. 1: 46-53.
- Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Witte, L. 1985a. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* species DSM 2874 grown on *n*-alkanes. Z. Naturforsch. 40: 51-60.
- Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U. and Wagner, F. 1985b. Production of four interfacial active rhamnolipids from *n*-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. Z. Naturforsch. 40: 61-67.
- Tang, J.S., Gao, H., Hong, K., Yu, Y., Jiang, M.M., Lin, H.P., Ye, W.C. and Yao, X.S. 2007. Complete assignments of <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectral data of nine surfactin isomers. Magn. Reson. Chem. 45: 792-796.
- Thaniyavarn, J., Roongsawang, N., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M. and Kanaya, S. 2003. Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:1239-44.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S. and Banat, I.M. 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource Technol. 102: 772-778.
- Thimon, L., Peypoux, F., Marget-Dana, R., Michael, G., 1992. Surfaceactive properties of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. JAOCS. 69: 92-93.
- Thenmozhi, R. and Nagasathya, A. 2010. Screening for surface-active agent producing bacteria in used engine oil contaminated soil samples. J. Agric. Biol. Sci. 6: 983-986.
- Tugrul, T. and Cansunar, E. 2005. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. J. Microbiol. Biotechnol. 21: 851-853.
- Urum, K., Grigson, S., Pekdemir, T. and McMenamy, S. 2006. A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. Chemosphere. 62: 1403-1410.
- Vaz, D.A., Gudinab, E.J., Alameda, E.J., Teixeira, J.A. and 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.

- Walter, V., Syldatk, C. and Hausmann, R. 2010. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672: 1-13.
- Wang, J., Ji, G., Tian, J., Zhang, H., Dong, H. and Yu, L. 2011. Functional characterization of a biosurfactant-producing thermo-tolerant bacteria isolated from an oil reservoir. *Pet. Sci.* 8:353-356.
- Wei, Y.H., Lai, C.C. and 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.
- Wei, Y.H., Chou, C.L. and Chang, J.S. 2005. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *J. Biochem. Eng.* 27: 146-154.
- Wilkinson, S.G. 1972. Composition and structure of the ornithine-containing lipid from *Pseudomonas rubescens*. *Biochem. Biophys. Acta.* 270: 1-17.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H.L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1706-1713.
- Yamaguchi, M., Sato, A. and Yukuyama, A. 1976. Microbial production of sugar-lipids. *Chem. Ind.* 4: 741-742.
- Yeh, M.S., Wei, Y.H. and Chang, J.S. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Proc. Biochem.* 41: 1799-1805.
- Yin, B., Gua, J.D. and Wana, N. 2005. Degradation of indole by enrichment culture and *Pseudomonas aeruginosa* Gs isolated from mangrove sediment. *Int. Biodeter. Biodegr.* 6: 243-248.
- Younis, M.A.M., Hezayen, F.F., Nour-Eldein, M.A. and 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.
- Youssef, N.H., Dunacn, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M. and McInerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *J. Microbiol. Method.* 56: 339-347.

- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. and Bertagnolli, B.L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil. Biol. Biochem.* 34: 955-963.
- Zhang, J., Gorkovenko, A., Gross, R.A., Allen A.L. and Kaplan, D. 1997. Incorporation of 2-hydroxyl fatty acids by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to tailor emulsan structure. *Biol. Macromol.* 20: 9-21.
- Zosim, Z., Gutnick, D.L. and Rosenberg, E. 1983. Uranium binding by emulsan and emulsanosols. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1725-1735.

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

## 1. Mineral salt medium (MSM) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$K_2HPO_4$	0.80	กรัม
$KH_2PO_4$	0.20	กรัม
$CaCl_2$	0.05	กรัม
$Mg Cl_2$	0.50	กรัม
$FeCl_2$	0.01	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.00	กรัม
$NaCl$	5.00	กรัม
น้ำมันปลาล้างแล้ว	20.00	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

## 2. Minimal Salt Medium Agar ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$K_2HPO_4$	0.80	กรัม
$KH_2PO_4$	0.20	กรัม
$CaCl_2$	0.05	กรัม
$Mg Cl_2$	0.50	กรัม
$FeCl_2$	0.01	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.00	กรัม
$NaCl$	5.00	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำมันปลาล้างแล้ว	20.00	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วต้มให้เดือดนำไปปรับ pH ให้ได้ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

## 3. Nutrient Broth ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม



ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน  
(autocleave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### 1. การเตรียม spraying reagent ต่างๆ

#### 1.1 ninhydrin reagent

เตรียมโดยนำ ninhydrin 0.3 กรัม ละลายใน 1-butanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glacial acetic acid ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบหมู่เอมีโนอิสระ ซึ่งจะปรากฏจุดสีม่วงโดยมีพื้นหลังเป็นสีขาวบนแผ่น TLC หลังจากให้ความร้อน 105 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

#### 1.2 rhodamine B

เตรียมโดยนำ rhodamine B ปริมาตร 0.25 กรัม ละลายในเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบกรดไขมัน ซึ่งจะปรากฏจุดสีชมพูบนแผ่น TLC เมื่อมองภายใต้ UV

#### 1.3 anisaldehyde

เตรียมโดยผสม anisaldehyde ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับเอทานอล ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบน้ำตาล ซึ่งจะปรากฏจุดสีม่วงเข้มมีพื้นหลังเป็นสีชมพูบนแผ่น TLC หลังจากให้ความร้อน 105 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที

### 2. การจำแนกแบคทีเรียทางสัณฐานวิทยา

#### 2.1 การย้อมสีแกรม

ใช้ loop เขี่ยเชื้อบนสไลด์บางๆ ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีที่ล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายที่ล้างสีออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดสีซาฟรานิน (safranin) ประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำ ซับให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (Sneath, 1986)

#### 2.2 การย้อมสปอร์

หยดสีมาลาไคท์กรีน (malachite-green) ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อที่ผ่านการ fix แล้ว วางสไลด์บนไอน้ำเดือดนานประมาณ 10 นาที คอยเติมสี ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง เมื่อครบเวลา เทสีทิ้ง ทิ้งไว้ให้เย็น ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ย้อมทับด้วยสีซาฟรานินนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (Sneath, 1986)

## ภาคผนวก ค

**1. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Bacillus tequilensis* Lc9**

Sample name: Lc9

Identify: *Bacillus tequilensis*

16s rDNA Sequence

```
CCCCTGTTACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTT
ACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATCACCGC
GGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACT
GCGATCCGAAGTGAAGACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCC
CTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTT
GACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACT
GAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGAC
GTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT
TCCAATTAACACATGCTCCACCTTTTGTGTTGTTCTCCTTCAATTCCTTTGAGTTTC
ATTCTTTTT
```

**Blast Result**

**RID: TWTWN4W4012**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

## 2. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Klebsiella pneumoniae* 0/15

Sample name: 0/15

Identify: *Klebsiella pneumoniae*

16s rDNA Sequence

```
CGTTAAGTTTTTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGATGGCGGCAGGCCTAAC
ACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
AGCTAATACCGGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCC
ATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCCGA
CGATCCCTAGCTAGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACTGAGACACGGTCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
CAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGA
GGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTGCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGC
GCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGTGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGT
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAATATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAACCCTCCGGTAGTACACGCCGTAGACGATGTCGACTTCGAGGATGTGCC
CCTGAGGCATGGGATTCCGGACCTAACGCGTTTAAATCCAACCGCCAGAGGAGACCC
GGCGCAAAGGCGAACACGACATAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTGGATCCA
```

### Blast Result

**RID: TWNZWW3F013**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

### 3. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Klebsiella pneumoniae* 7/17b

Sample name: 7/17b

Identify: *Klebsiella pneumoniae*

16s rDNA Sequence

```
CACCGATTGACGTTTTTTAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGCTTGAACGCTGGCGGCAGG
CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGA
AACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTC
ATGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTA
GGCGACGATCCCTAGCTGGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACA
CGGTCCAGACTCCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCA
GCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAG
AAGCACC GGCTTTAACTTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGCAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGA
AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAG
AGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACC
GGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGAATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGGAAAACAATGTCTATTTTCAT
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCT
TAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGGATTCCG
```

#### Blast Result

**RID: TWT0V0JK013**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

#### 4. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Klebsiella pneumoniae* 7/18a

Sample name: 7/18a

Identify: *Klebsiella pneumoniae*

##### 16s rDNA Sequence

```
GTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGGAGTTTGATT
CTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGGCAGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCAC
AGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACCAGCGGGACGGGTGAATAATGTCTGGGAAACTG
CCTGATGGAGGGGGATAAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAA
GACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTACCCAGATGGGATTAG
CTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAAGTTAATAACCTT
GTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGC
GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAAC
TGGCAGGCTACTTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTG
ACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGTGAGCAAACAGGATTAATAACCCGTAGATCAG
AATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA
GTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTG
ATTCAA
```

##### Blast Result

**RID: TWT2YEYE01S**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

## 5. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Pseudomonas aeruginosa* 7/18b

Sample name: 7/18b

Identify: *Pseudomonas aeruginosa*

### 16s rDNA Sequence

```
GTTTGTGGCCGTTACCACCAGATTAAGCACCGGCTAATTTTCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGAAAGGTGGCAAGCGTTAATCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAG
GTGGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
GTCTAGGAATGGGCCTTGGAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCG
CATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATGACATGAGCC
TAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACT
GGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGACCAGACTCCTACTGC
TGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATGTAAAGCACTTAACTTGGGAGGAAGGGGGATGAG
TTAATAACCAAGATGTTTTTACATTGCCGTTATCAATAAGAACACGGCTAACTTCGTGC
CCGCTGCCC GCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC
TGCATCCAAAATAATGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCCCTGGAC
TGATCATGACACTCAGGACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAA
CCGCAAGGAGACGGTACCACGGAGGATCCA
```

### Blast Result

**RID: TWTUM5BG016**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

## 6. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Serratia marcescens* 7/18r

Sample name: 7/18r

Identify: *Serratia marcescens*

16s rDNA Sequence

```
CACCGGGCTAACTCCGTGCCAGCAGTTTTAGAGTTTGGAACTGGCTCAGATTGAAC
GCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAAGGGAGCTTGCTCCC
TGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGG
GATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGG
GACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGG
TAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACT
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGTACGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACGAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGACAGGTGGTGAACCTAATACGTTTCATCAATT
GACGTTACTCGCAGAACTGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGTGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAATCCCGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAG
GCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAA
ACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGA
CGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
TTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTACACACCGCCCGTCACACCATGGG
AGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTGA
TCCATCCCC
```

### Blast Result

**RID: TWTV7ZYJ016**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)



## 7. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Bacillus subtilis* Lc10

Sample name: Lc10

Identify: *Bacillus subtilis*

16s rDNA Sequence

```
CTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACATCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTTG
TGGTGTGGCGGGCGGGTGTTC AAGCCC GGGAAGGGATTAACCGCGGCATGCTGAT
CCTCATTTAATAACGTCCCCGTCCGCCCGCGGGAGATTTTCGCTGCTTGCCCTATC
AGATTACCTGATGGGGTTATCTCTTGTAGGTGGCGTAGTCTCTCTTCGTCGACGCGAC
GCCTCCCCCCTGAGAGGATGAGCTGAGCCGCCCTGATTAAATGATACCACAAACCCC
CCCCCCTGGATGCAGCGGGGAGTATGAATCAAGGTTTCGGTTGGCAAATGCAGCTGT
CCCGCTTCTCCAGAAGAATGACGGGGTGTTCGGGTTTTCTCGTCCGGGAAGAAG
ATAAGGTTACGAATATTTTCTACTGTCGTTCCCTTACTCGAATTAGAAGCATACTCAT
TCCTAGCTTCGTCCGATCCTCAT
```

### Blast Result

**RID: TWUAJ5TD01N**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

## 8. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Bacillus subtilis* Lc12

Sample name: Lc12

Identify: *Bacillus subtilis*

### 16s rDNA Sequence

```
GAGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTG
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCC
GCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTG
AGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCA
CCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAAC
TAATATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT
GACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTTTAG
ATTTTCAGAGGATGTCAAGATCTGCTAAGGTCCATTGCGTTGCTTCCAACCTAAGCAA
TCTTTCCCACCAGCTCTTCTAGAATATTCTCAATTGCCTTAAGTTTTGTCTTTCTTTTCG
```

### Blast Result

**RID: TWUB04KF016**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

### 9. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Bacillus subtilis* Lc16

Sample name: Lc16

Identify: *Bacillus subtilis*

#### 16s rDNA Sequence

```
CTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCG
TGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGAT
CCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAAC
TGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTC
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCC
CACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCA
ACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCT
AGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATAAA
CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCG
ACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAA
CCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
TTCGCTCCCCACGCTTCTCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCATAGAGTCGCCTTCG
CTCACTTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCAT
```

#### Blast Result

**RID: TWUBH6Z001N**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

**10. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Bacillus pumilus* Sb7**

Sample name: Sb7

Identify: *Bacillus pumilus*

16s rDNA Sequence

```
TTCCTTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAAC  
CTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGC  
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCC  
GAACTGAGAACAGATTTATGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTTC  
TGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCA  
TCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCT  
GGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA  
CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTAT  
CTCTAGGGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCTAATT  
AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTT  
GCTACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGG  
AAATCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTGCGTGCGTGTACTACCATGGTATCTAATC  
CTGTTGCGCTCCCC
```

**Blast Result**

**RID: TWUWBXA901N**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

### 11. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Bacillus pumilus* Sb8

Sample name: Sb8

Identify: *Bacillus pumilus*

16s rDNA Sequence

```
CCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTC
GTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGA
TCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAA
CTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTTCTGT
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCC
CCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGC
AACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTC
TAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGC
GACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAA
ACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCG
CCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCACCTCT
CCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTTCCCCGGTTGAGCTGGGGG
CTTTCACATCAGACTT
```

#### **Blast Result**

**RID: TWUX16GV013**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

## 12. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Bacillus subtilis* Td4

Sample name: Td4

Identify: *Bacillus subtilis*

16s rDNA Sequence

```
GGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTG
ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGAT
TACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAAC
AGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAG
CACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCT
CCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGAT
CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC
AACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGAAGTCCTATCTCTAGGATTGT
CAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGATTTGCTTCGAAATAAACCGCGTTG
TCCACCACTTTTGTTCCTATGTTGATTTGGGTAAGTACTTTCTTCGACCTTGCTCCC
CAGTATTTGATCTTAGGCATTTTGATTTGCTGTAAAACAACCTTACTGTGTTCCATC
CGAGTCGGGATGAATTCCCGGACTTGTTTCATGCTCTTATCTCAACCTAAAGTCTCACT
TTTACGAGAATGCGACGGCTTGTGACAA
```

### Blast Result

**RID: TWUXJMVE012**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

### 13. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Acinetobacter junii* Tf19

Sample name: Tf19

Identify: *Acinetobacter junii*

16s rDNA Sequence

```
CACCGTGGTAAGCGTCCTCCTTGCGGTTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAAACTCC
CATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTG
ATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGG
ACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCACATCGCTGTGTAGCAACCCTTTGTACCG
ACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTC
CCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTCCCATCCGAAATGCTG
GCAAGTAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC
GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATCTAGATTCCCGAAGGCACCAATCCATC
TCTGGAAAGTTTCTAGTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTA
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTG
CTACCGT
```

#### Blast Result

RID: TWV417SH01N

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

**14. Nucleotide sequence of 16s rDNA gene of *Acinetobacter calcoaceticus* Tg9**

Sample name: Tg9

Identify: *Acinetobacter calcoaceticus*

16s rDNA Sequence

```
GGTAGCGTCCTCCCTAAGGTTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAACTCCCATGGTG
TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCG
ATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGA
TCGGCTTTTTGAGATTAGCATCTGCTCGCGCAGTAGCAACCCTTTGTACCGACCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCCT
TCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTTCCCACCCGAAGTGCTGGCAAATA
AGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA
CGACAGCCATGCAGCACCTGTATCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAA
AGTTCTCTGTATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCGACTGT
ACTCCCCAGGCGGGCTACTTATTTCTTTAGCTGCGCCTCTAAT
```

**Blast Result**

**RID: TWV7XCG9012**

**Database:** All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)



# Isolation, Optimization and Production of Biosurfactant Produced by *Bacillus Tequilensis* Lc9 Isolated from Palm Oil Mills

Onkamon Rukadee and Suppasil Maneerat

Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University

## Abstract

Seventy-two biosurfactant producing isolates were screened from soil and water contaminated with palm oil using drop collapse method. The phylogenetic diversity of the isolates was evaluated using 16S rRNA gene analysis. The strain *Acinetobacter junii* Tf19 showed the highest surface tension reduction of 37 mN/m. The strain *Bacillus tequilensis* Lc9 was the new strain for biosurfactant production and used for future study. Determination of the important nutritional requirement for biosurfactant production was investigated using *B. tequilensis* Lc9. Under optimal condition, the minimum surface tension was 45 mN/m in cultures grown in minimal salt medium supplemented with molasses, sodium nitrate adjusted to pH 7.0, agitation rate of 200 rpm and incubation at room temperature ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) for 30 h.

*Keywords: Biosurfactant, Bioemulsifier, Palm Oil*

## 1. Introduction

Biosurfactants are defined as surface-active compounds produced by microorganism, such as bacteria, yeasts, and filamentous fungi (Lang and Philp 1998; Cubitto et al., 2004; Van Hamme et al., 2006). They are able to produce surface-active agents during their growth. Biosurfactant consisting of a hydrophilic moiety composed of sugars, amino acids or peptides, and a hydrophobic portion, which is often made up with hydroxylated fatty acid (Kosaric et al., 1987; Georgiou et al., 1992; Kowall et al., 1998; Sanchez et al., 2007). These molecules reduce surface tension of both aqueous solutions and hydrocarbon mixtures (Tabatabaee et al. 2005) and other properties by creating microemulsion in which micelle formations occur where hydrocarbons can solubilize in water or water in hydrocarbons (Banat 1995). Surfactants have a wide range of industrial applications such as in bioremediation of oil-polluted soil and water, enhancing oil recovery, using in the detergent industry, and stabilizing emulsions for the food and cosmetic industry. However, surfactants currently in use are chemically synthesized, which are partly toxic and not so readily biodegradable (Van Hamme et al. 2006). Under this aspect, biosurfactants are advantageous because of their lower toxicity, biodegradability, selectivity and specific activity at extreme

conditions (temperature, pH and saline) (Fiechter 1992; Georgiou et al., 1992; Banat 1995; Makker and Cameotra 1998; Singh and Cameotra 2004).

Since palm oil industry has become one of the rapidly growing sectors in Thailand, the explosive expansion of oil palm plantation generates enormous amounts of wastewater and solid wastes, causing an environmental problem (Chavalparit et al., 2006). Hydrocarbon-degrading microorganisms, adapted to grow and thrive in palm oil-containing environments, have an important role in the biological treatment of this pollution. Palm oil is a good source of the biosurfactants-producing bacteria. Some bacterial can use palm oil as a carbon source and produce biosurfactants increase the surface area of hydrophobic water-insoluble substrates and increase their bioavailability, thereby enhancing the growth of bacteria and the rate of bioremediation. (Abu-Ruwaida et al., 1991; Healy et al., 1996; Ron and Rosenberg 2002; Nerurkar et al., 2009).

## 2. Objectives

- 1) To isolate biosurfactant-producing bacteria from palm oil contaminated soil and water
- 2) To optimize the medium component and conditions for biosurfactant production from

*Bacillus tquilensis* Lc9

## 3. Materials and Methods

### 3.1 Sampling procedures and screening of biosurfactant-producing bacteria

Fifty four samples were collected from palm oil-contaminated soil and water (three samples of sludge palm oil, four samples of palm oil-contaminated wastewater and forty-seven samples of palm oil-contaminated soil). Biosurfactant-producing bacteria were isolated by standard plate culture technique on mineral salts (MS) medium formulated by Yin et al., (2005), solidified with noble agar (1.5%). Used palm oil (2%, w/v) was used as a carbon source. The composition of MS medium (g/l) used in this study was: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2; CaCl<sub>2</sub>, 0.05; MgCl<sub>2</sub>, 0.5; FeCl<sub>2</sub>, 0.01; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 and NaCl, 5.0. The pH was adjusted to 7.0 with 1N NaOH, and then autoclaved at 121 °C for 15 min. One gram or one milliliter of sample was added in 10 ml of 0.85% NaCl, serially diluted and spreaded on MS agar plates. The plates were incubated at room temperature (30 ± 2 °C) for 24 to 48 h. After incubation, plates were enumerated and the morphologically different bacterial colonies were selected and restreaked on nutrient agar (NA) for further use. The purified isolates were inoculated into 10 ml MS medium containing 2% glucose (w/v) and MS medium containing 2% used palm oil (w/v) and incubated at room temperature for 24 h with 200 rpm shaking speed. Culture broth was centrifuged at 10,000 rpm, 4 °C for 15 min. After that the cell-free supernatant was determined for biosurfactant activity by drop collapsing test, surface tension, emulsification activity (%EA) and emulsification index (E24).

### 3.2 Inoculum preparation and cultivation conditions

Nutrient broth (NB) was used for preparation of the inoculum. The culture was grown for 24 h at room temperature with the OD<sub>660</sub> value of 0.5 contains approximately  $1 \times 10^7$  c.f.u./ml. The seed culture at 5% (v/v) was used as an inoculum into 50 ml of MS medium (pH 7.0) in a 250 ml Erlenmeyer flask. The cultures were incubated in a temperature controlled shaker-incubator (200 rpm) at 30 °C for 24 h.

### 3.3 Identification of selected strains

The selected bacterial strains were incubated for 24-48 h at room temperature on NB. Then, Gram-stain was conducted to identify pure cultures of bacterial isolates. For 16S rDNA gene amplification, chromosomal DNA was extracted using Blood and Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instruction. The 16S rRNA gene was amplified using the PCR method with a 1U *Taq* DNA polymerase (Bio-Lab Ltd., Auckland, New Zealand) and universal bacterial primers UFUL (8F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT; Weisburg et al. 1991). These primers target two highly conserved regions known to be variable among bacterial species (Phalakornkule and Tanasupawat 2006). The following PCR program was used: 95°C for 5 min, followed by 25 cycles of 95°C for 1 min, 50°C for 30 s and 72°C for 1.5 min, followed by 72°C for 5 min. PCR product was purified using purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instruction and then the electrophoresis of the purified PCR products were carried out for 24 min at 100 V on 1% TAE agarose gel. The 16S rDNA gene was sequenced by using the ABI Prism BigDye terminator kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, MA, USA), according to the manufacturer's protocol, with 1492R and 8F as primers. The 16S rDNA gene sequences were aligned along with the sequences of type strains obtained from the GenBank by using the program ClustalW (Thompson et al. 1997). Sequence homologies were examined using BLAST version 2.2.12 of the National Center for Biotechnology Information and the 16S rDNA gene sequence was submitted to GenBank.

### 3.4 Optimization of biosurfactant production

The medium optimization was conducted in a series of experiments by changing one variable at a time and keeping the other factors fixed at a specific set of conditions. Six factors were chosen aiming to obtain higher productivity of the biosurfactant: carbon source, carbon source concentration, nitrogen source, nitrogen source concentration, shaking speed, and initial pH. The carbon sources used were 2% (w/v): soluble (glucose, commercial sugar (CS; saccharose) and molasses) and insoluble carbon sources (commercial palm oil and used palm oil), with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as nitrogen source. For the most appropriate carbon source concentration used were 1, 1.5, 2, 2.5 and 3% (w/v). For the evaluation of the most appropriate nitrogen sources for the production of biosurfactants, NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, peptone and urea were employed at a concentration of 0.1 g/l with the optimum carbon source. The nitrogen source concentrations were varied

concentration from 0.1 to 0.5 g/l. The most appropriate shaking speed (100, 150, 200 and 250 rpm) and initial pH (5.0, 6.0, 7.0 and 8.0) for the production of biosurfactants were evaluated (with optimized carbon, carbon source concentration, nitrogen, nitrogen source concentration).

#### 4. Analytical Methods

Growth was monitored by measuring the optical density (OD) of the culture broth at 660 nm.

Surface activity measurement was done by centrifuging the culture supernatants at 10,000 rpm for 15 min to remove cells. The surface tension (ST) measurement was carried out at room temperature and determined using a du Nöuy ring-type tensiometer (model "OS" balance/tensiometer, Bidford-on-Avon, Alcester, Warwickshire, U.K.) by the Ring method. The measurement was repeated at least three times and an average value was used to express the surface activity of each sample.

Qualitative drop collapsing test was performed in the polystyrene lid of a 96-microwell plate (internal diameter, 8 mm) (Nunc, Roskilde, Denmark). Before use, each lid was rinsed three times each with ethanol and distilled water, and dried. After preparation, each well was coated with a thin layer of 2  $\mu$ l of used palm oil and equilibration was done for 1 h at room temperature. Then, 5  $\mu$ l of the cultured supernatant was delivered into the center of the well. The drop results were determined visually after 1 min. If the drop remained beaded, the result was scored as negative. If the drop collapsed, the result was scored as positive. Cultures were tested in triplicate. The MS medium alone had a negative drop-collapse test (Bodour and Maier 1998).

Emulsification activity (%EA) and emulsification index (E24) of biosurfactant production were measured according to the method of Cooper and Goldenberg (1987). Briefly, 2 ml of culture supernatant of each sample were mixed with 2 ml of xylene and vortexed at high speed for 2 min. The sterilized medium was used as control. The mixture was allowed to stand for 10 min prior to measurement for %EA and stand for 24 h prior to measurement for E24 as the height of the emulsion layer divided by the total height of the mixture and expressed as percentage.

All screening and biosurfactant characterization studies were performed at least three times under each condition in all experiments. One way analysis of variance (ANOVA) was used to test for statistical significance among treatments. Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ .

#### 5. Results and Discussion

##### 5.1 Isolation and screening of biosurfactant producing bacteria from palm oil contaminated soil and water

A total of 54 samples were collected from palm oil-contaminated soil and water and used to screen for biosurfactant-producing bacteria by the standard plate culture technique. The

initial screening on MS agar yielded a total of 808 isolates, which were grown in MS medium containing 2% of different carbon sources (glucose and used palm oil) and then tested qualitatively for biosurfactant production with the drop-collapse test. This resulted in 72 putative biosurfactant producing isolates or a total of 8.9% of the isolates tested under these screening conditions. They were cultivated in MS medium containing used palm oil or glucose as carbon sources and then tested for biosurfactant production with the surface tension by the ring method. The supernatant of 14 isolates found to reduce surface tension lower than the other isolates (data not shown). Of the 14 putative biosurfactant producers, they were further characterized for morphology and gram staining, 85.7% were gram negative and 14.3% were gram positive (data not shown). Upon examining the types of soils and their contaminants, most of the strains were gram negative isolates dominated in the hydrocarbon-contaminated soils (Bicca et al., 1999; Bodour et al., 2003; Batista et al., 2005). The gram-negative bacteria have outer membrane which act as biosurfactant. Biosurfactants are present in various pools inside cells: as intracellular molecules, extracellularly secreted compounds or as compounds located at the cell surface (Prabhu and Phale 2003). Together they have been known to enhance degradation by alteration in cell hydrophobicity and enhancement of dispersion of water immiscible compounds (Zang and Miller 1992; Zang and Miller 1994; Patricia and Jean-Claude 1999). Biosurfactants exhibit properties as emulsifying or dispersing agents, favoring the release of hydrophobic contaminants absorbed to organic matter or increasing the surface area of the contaminant available as substrate (Mercade et al. 1996). This distribution may represent the ability of the microorganisms to survive in these soils or may be a response to the type of contaminant present.

### 5.2 Identification of selected strain

The result obtained from the sequencing of the 16S rDNA gene of the genomic DNA revealed that strain Lc9 was *Bacillus tequilensis* (98%). The rDNA sequence was deposited in DDBJ/EMBL/GenBank database under accession number AB647198. *Bacillus tequilensis* is the new biosurfactant-producing strain that was selected for further study. Hydrocarbon degrading bacteria usually produce biosurfactants which improve the solubilization of hydrophobic compounds from soil or water (Van Dyke et al., 1993; Scheibenbogen et al., 1994; Herman et al., 1997). The results of the present study could identify the commonest genera include *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia* and *Bacillus* that were in accordance with Atlas (1992), Okoh and Trejo Hernandez (2006) and Thenmozhi and Nagasathya (2010) who reported that most of the bacteria frequently isolated from hydrocarbon contaminated sites belong to the genera *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Actinobacter*.

### 5.3 Optimization of biosurfactant production

### Effect of carbon source and carbon source concentration on biosurfactant production

Table 1 shows the reduction in surface tension of the cell free broth and growth concentration of *B. tequilensis* Lc9 using different carbon sources (palm oil wastewater, glucose, CS, molasses, commercial palm oil and used palm oil). Biosurfactant production was estimated by the reduction in surface tension of the fermented broth. Results reveal that surface tension reduction is greater with molasses, glucose, CS, used palm oil and commercial palm oil as carbon sources. When the growth and biosurfactant production by *B. tequilensis* Lc9 grown on different carbon sources were compared. The growth of *B. tequilensis* Lc9 was the highest that was reached in MS medium supplement with used palm oil or molasses as carbon source. Low cell growth was observed with the same bacteria growing on glucose and CS with OD values of 1.70 and 1.56, respectively. The greatest surface tension reduction, 17.84, 10.50, and 10.17 mN/m were achieved, respectively when molasses, glucose and CS were used as carbon sources. The emulsification activity about 45.83% was obtained in 24 h. *B. tequilensis* Lc9 did not show emulsification activity when the others carbon source were used. Therefore, molasses is the suitable carbon source for biosurfactant production by *B. tequilensis* Lc9.

Table 1: Effect of different carbon sources on biosurfactant production in shake-flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in MS medium with shaking speed 200 rpm after cultivated for 24 h at room temperature.

C-source (%)	Final pH	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)	Emulsification index (E <sub>24</sub> )	Growth (OD <sub>660</sub> )
Palm oil wastewater	6.98±0.02	0 <sup>e*</sup>	0 <sup>b*</sup>	0 <sup>b*</sup>	ND
Glucose	4.36±0.03	10.50±1.32 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.70±0.15
Commercial sugar	4.37±0.03	10.17±1.60 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.56±0.07
Molasses	4.46±0.00	17.84±1.20 <sup>b</sup>	45.83±0.05 <sup>a</sup>	39.58±0.11 <sup>a</sup>	3.49±0.01
Palm oil	7.14±0.02	6.00±1.00 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.97±0.38
Used palm oil	7.10±0.00	7.67±1.15 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.13±0.22

ND: Not detected

Different letters in the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

Since the production medium was optimized with molasses as sole carbon source, different concentrations of molasses were examined for the best biosurfactant production from the studied strains. Molasses was added to the production medium in concentrations, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0% (w/v), the results obtained (data not shown). Added 2% (w/v) of the substrate was found to

be optimum for biosurfactant production. The maximum surface tension reduction was achieved within 24 h of fermentation (18.57 mN/m). At this point the growth was the highest. The emulsification activity about 43.75% was obtained in 24 h. When the concentration of molasses increased and/or decreased more than 2% (w/v), biosurfactant activity was decreased with similar to the result of Joshi et al. 2008. The was production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 and *Bacillus* strain HS3 was studied using molasses or cheese whey as a sole source of nutrition at 45 °C. Maximum biosurfactant production was achieved with molasses at 5–7% (w/v), the concentration of molasses was higher (9.0%) that seemed to inhibit biosurfactant production by isolates HS3 and 20B. This indicates that different microbes respond differently to the carbon sources.

The results also indicated that types of carbon sources affected the growth and biosurfactant activity of *B. tequilensis* Lc9. Generally, different substrates will generate different effect on biosurfactant activity with the same strain (Jeong et al., 2004; Wu et al., 2008; Saimmai et al., 2011). In some cases, addition of water-immiscible substrates resulted in induction of biosurfactant production such as vegetable oil (Rahman et al., 2002; Pruthi and Cameotra 2003; Thaniyavarn et al., 2006; Thavasi et al., 2008). However, some have been produced on water-soluble substrates such as sucrose (Makkar and Cameotra 2002), molasses (Solaiman et al., 2004; Joshi et al., 2008; Panesar et al., 2011).

#### **Effect of nitrogen source and nitrogen source concentration on biosurfactant production**

Biosurfactant production was affected by the nitrogen source used in the fermentation. As can be seen in Table 2, sodium nitrate was the best nitrogen source of the four tested sources. The highest surface tension reduction of 19.84 mN/m was achieved and did not show the emulsification activity. Meanwhile, when the cultivation in MS medium was done without nitrogen source, *B. tequilensis* Lc9 exhibited the lowest cell growth and biosurfactant activity was not detected. When peptone was used as nitrogen source, this strain did not reduce the surface tension but showed the emulsification activity about 33.30%. Furthermore, type, quality and quantity of biosurfactant production is dependent on the culture conditions. There are lots of study regarding biosurfactant production related to the optimization of their physicochemical properties (Sarubbo et. al., 2001).

Table 2: Effect of different nitrogen sources on biosurfactant production in shake-flask by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in minimal salt medium with 2% (w/v) molasses and shaking speed 200 rpm after cultivated for 24 and 48 h at room temperature.

N-source (0.1%)	Final pH	Surface tension reduction (mN/m)	Emulsification activity (%)	Emulsification index (E <sub>24</sub> )	Growth (OD <sub>660</sub> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.32±0.03	17.67±0.57 <sup>a*</sup>	43.75±0.17 <sup>a*</sup>	34.16±0.05 <sup>a*</sup>	3.50±0.03
NaNO <sub>3</sub>	7.35±0.04	19.84±0.28 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.71±0.00
Urea	7.37±0.02	17.00±0.50 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	3.59±0.00
Peptone	6.47±0.02	0 <sup>d</sup>	33.30±0.05 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	3.52±0.00

\* Different letters in the same column indicate significant different ( $p < 0.05$ )

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

From the results, sodium nitrate was selected as a nitrogen source for biosurfactant production by *B. tequilensis* Lc9. The highest surface tension reduction (21.17 mN/m) was obtained when MS medium supplement with 0.2% (w/v) of sodium nitrate (data not shown) was used. The surface tension reduction was decreased when the sodium nitrate concentration was below or above 2%. The amount of biosurfactant synthesis depends greatly on the availability of carbon sources and on the balance between carbon and other limiting nutrients (Abouseoud et. al., 2008; Najafi et. al., 2010). From the result if the N concentration increased or decreased too much, the balance of carbon and nitrogen was unsuitable for biosurfactant production by this strain. Nitrogen is important in the biosurfactant production medium because it is an essential component of the proteins that are essential for the growth of microbes and for production of enzymes for the fermentation process (Saharan et. al., 2011).

#### Effect of shaking speed on biosurfactant production

The shaking speed was also investigated in this study (data not shown), the inoculated cultures were incubated at room temperature at different agitation rates from 100-250 rpm. It was demonstrated that an increase in shaking speed up to 200 rpm resulted in an increase in biosurfactant production. The highest surface tension reduction was obtained when the shaking speed was at 200 rpm (22.17 mN/m) for 24 h. Wei et. al., (2005) studied the effect of shaking speed on rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater in the range of 50-250 rpm. They found that even the maximum growth was observed with shaking speed 250 rpm, but the optimum biosurfactant production was reached when shaking speed was 200 rpm. Shaking speed affected the mass transfer efficiency of both oxygen and medium components and also the cell growth and biosurfactant formation of the aerobic bacterium, especially when it was grown in a shake-flask. The effect of biotechnological parameters such as shaking speed can influence biosurfactant synthesis (Lotfabad et. al., 2009).



### Effect of initial pH on biosurfactant production

The highest biosurfactant activity was obtained when initial pH was adjusted to 7.0 (data not shown). It was shown that the reduction of surface tension to 22.84 mN/m occurred in 24 h. However, the maximum growth of *B. tequilensis* Lc9 was obtained when initial pH of medium was adjusted to 5.0. The pH plays a role in determining the ability of bacteria to grow or thrive in particular environments because it mainly affects biological activities of prokaryotes (Cameotra and Makkar 1998). The nature of some bacteria renders them more effectively in acidic medium and its action is also influenced by others factors (Swaminathan 1997), however most of bacteria grow optimally within a narrow range of pH between 6.7 and 7.5.

### Time course of growth and biosurfactant production

Cultivation of *B. tequilensis* Lc9 was done in 50 mL of MS medium (contained 2%, w/v of molasses, 0.2%, w/v of sodium nitrate) with an initial pH 7.0 in the shake-flask (200 rpm) at room temperature. Therefore, when the biosurfactant production medium was inoculated with the studied strains and incubated for different incubation times from 0-72 h, it was observed that (Fig. 2) biosurfactant concentration increased with the increase of incubation period up to 30 h but no increase in biosurfactant concentration was observed above this level on further increase in the incubation period. Meanwhile, the growth was increasing slowly from day 1 to day 3. These results suggested that this biosurfactant production by this strain was a growth-associated and mix growth associated type. Biosurfactant production (as evident from surface tension lowering) starts from 6 h and continues till 72 h of growth. The highest surface tension reduction of the culture broth was decreased from 70 mN/m to 44 mN/m which was obtained after 30 h of incubation which later on remained stationary. The maximum emulsification index (E24) was obtained after 60 h of incubation, which indicated that production of biosurfactant started when the culture achieved in the late stationary phase (36-72 h).

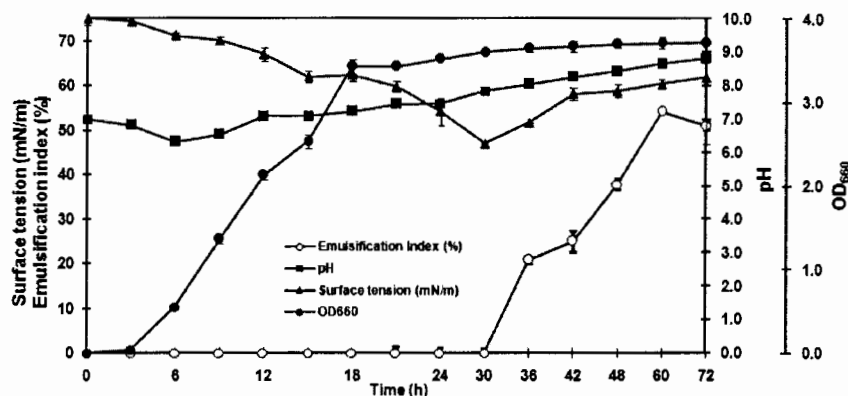


Figure 1: Time course of growth, culture pH, surface tension, emulsification activity (%) and emulsification index (E24) by *Bacillus tequilensis* Lc9 grown in minimal salt medium (pH 7) with 2% molasses, 0.2% sodium nitrate and agitation rate 200 rpm at room temperature

It could be concluded that the biosurfactant production medium from *B. tequilensis* Lc9 as MS medium should contain molasses as sole carbon source at concentration of 2%, w/v and sodium nitrate as a nitrogen source at concentration of 0.2%, w/v. The initial pH was adjusted to 7. The optimum incubation time is 30 h with shaking at 200 rpm and incubated at room temperature. The highest surface tension reduction of the culture broth was decreased from 70 mN/m to 44 mN/m.

## 6. Conclusion

In the present study, the production of the biosurfactant from *Bacillus tequilensis* Lc9 which was isolated from palm oil contaminated soil is reported. *B. tequilensis* Lc9 is the new biosurfactant producing strain, the growth characteristics were obtained and studied on the properties of the biosurfactant which indicate the possibility of its industrial application. *B. tequilensis* Lc9 used molasses as sole carbon source. It has many advantages because of its low price compared to other sources of sugar and the presence of several other compounds such as minerals, organic compounds and vitamins besides sucrose which are valuable for the fermentation process (Makkar and Cameotra, 2002). The potential of this biosurfactant for industrial uses was shown by studying its physical properties, i.e., the surface tension, emulsification activity (%EA) emulsification index. It was able to reduce the surface tension of pure water to 44 mN/m and achieve the %EA of 54% for xylene.

## 7. References

- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 223: 143-151.
- Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S. and Khamis, A. (1991). Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus* bacterium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 53-61.
- Banat, I.M. (1995). Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresour. Technol.* 51: 1-12.
- Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R. and Totola, M.R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Biores. Technol.* 97: 868-875.
- Bento, F.M., de Oliveira Camargo, F.A., Okeke, B.C. and Frankenberger Jr, W.T. (2005). Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol. Res.*, 160: 249-255.

- Bicca, F.C., Fleck, L.C. and Ayub, M.A.Z. (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev. Microbiol.* 30: 231-236.
- Bodour, A.A. and Miller-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.
- Bodour, A.A., Drees, K.P. and Maier, R.M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing microorganisms in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3280-3287.
- Cameotra, S.S. and Makkar, R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 520-529.
- Chavalparit, O., Rulkens, W., Mol, A. and Khaodhair, S. (2006). Options for Environmental Sustainability of the Crude Palm Oil Industry in Thailand Through Enhancement of Industrial Ecosystems. *Environment, Development and Sustainability.* 8: 271-287.

## Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 grown on crude glycerol obtained from biodiesel production plant as sole carbon source

Atipan Saimmai<sup>1</sup>, Onkamon Rukadee<sup>2</sup>, Vorasan Sobhon<sup>2</sup> and Suppasil Maneerat<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science Technology, Faculty of Agricultural Technology, Phuket Rajabhat University, Phuket 83000, Thailand

<sup>2</sup>Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai 90112, Thailand

Received 03 January 2012; revised 20 April 2012; accepted 24 April 2012

This study presents isolation of biosurfactant (BS)-producing bacteria, *Bacillus subtilis* TD4 (*BsTD4*) and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 (*PaSU7*), from palm oil contaminated soil. BS production was done by using a minimal salt medium with used crude glycerol as carbon and commercial monosodium glutamate as nitrogen source. After microbial cultivations at 30°C under optimum conditions, BSs produced by *BsTD4* and *PaSU7* reduced surface tension of culture supernatant to 30 mN/m with BS yield of 2.65 and 2.25 g/l, respectively. BSs could reduce surface tension of pure water to 26.0 and 28.0 mN/m with critical micelle concentration (CMC) of 12 mg/l (*BsTD4*) and 20 mg/l (*PaSU7*). BS produced by *BsTD4* exhibited higher oil recovery efficiency than that produced by *PaSU7*. Both BSs could recover oil more effectively than synthetic surfactants, could enhance solubility of PAHs, and can emulsify various oil and hydrophobic compounds.

**Keywords:** Crude glycerol, Microbial oil recovery, Microbial surfactant, Polyaromatic hydrocarbons, Surface tension

### Introduction

Industrial conversion of renewable resources into bio-based materials is receiving much attention from environmental point of view<sup>1</sup>. Among bioresources, crude glycerol (CG) is increasing year by year through increasing production of biodiesel and other oleochemicals<sup>2</sup>. CG accounts for 10% (v/v) of oil transesterification reaction<sup>3</sup>, and regarded as a waste product because of the cost associated with its disposal<sup>4</sup>. Utilization of CG is limited, although there are reports on glycerol conversion to value-added products through chemical<sup>5</sup> or biological methods<sup>6</sup>. End products include 1,3-propanediol, dihydroxyacetone, ethanol, succinate, polyhydroxyalcanoate, pigments and biosurfactants (BSs)<sup>7</sup>. BSs have attracted considerable interest owing to their biodegradability, and mild production conditions<sup>8</sup>. Lipopeptides are effective BSs, usually produced by *Bacillus* strains<sup>9,10</sup>. Lipopeptides possess manifold attractive properties<sup>11</sup>, and can be used as carbon (C) source<sup>12-15</sup>. Hydrocarbons or oils are common substrate for BS production<sup>16</sup>, but production and recovery

processes are very complicated. Success of BSs depends on the economy of process and the use of low cost raw materials, which account for 10-30% of overall costs<sup>17</sup>.

This study evaluates BS production from *B. subtilis* TD4 (*BsTD4*) and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 (*PaSU7*) cultivated in CG as C source, studies surface tension (ST) and emulsification activity (EA) of obtained BSs and evaluates potential application in the environment.

### Experimental Section

#### Biosurfactant producing Strain

*BsTD4* (accession no. AB647203) and *PaSU7* (accession no. AB647206) were isolated from palm oil contaminated soil in a palm oil industry from Suratthani Province, Thailand, (unpublished data). *BsTD4* and *PaSU7* were maintained on nutrient agar (NA) plate and transferred monthly.

#### Media and Cultivation Conditions

Nutrient broth (NB) used for inoculum preparation had following composition: beef extract, 1.0; yeast extract, 2.0; and peptone, 5.0 g; and distilled water, 1 l. To make nutrient agar, agar (15.0 g) was added to NB. Culture

\*Author for correspondence  
E-mail: suppasil.m@psu.ac.th

was grown in NB for 20 h at 30°C, and used as inoculum at 2% (v/v) level. For BS synthesis, a mineral salt medium (MSM; pH, 7.0±0.2) was used with following composition<sup>14,15</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2; CaCl<sub>2</sub>, 0.05; MgCl<sub>2</sub>, 0.5; FeCl<sub>2</sub>, 0.01; NaCl, 5.0 g/l. Carbon and nitrogen (N) sources were added separately. Cultivation was performed in 250 ml flasks containing 50 ml medium at 30°C, and stirred in a rotary shaker at 200 rpm for 48 h.

#### Culture Medium Optimization

Three factors (CG conc., N, C:N ratio) were used to obtain higher productivity of BS. Concentration of CG was varied (2-8 g/l) by using (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as N source. For evaluation of the most appropriate N sources, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, commercial monosodium glutamate (CMSG), NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub> and peptone were employed (conc., 1 g/l) with optimum concentration of CG. C:N ratio was varied (10-50) by keeping a constant N source (conc., 1 g/l).

#### Inoculum Optimization and Growth Conditions for Biosurfactant (BS) Production

An inoculum of each strain was varied (2-8% v/v) and transferred to a nutrient broth containing optimum amount of CG. Then, culture was incubated at 30°C in shaking incubator at 200 rpm for 48 h. After removal of bacterial cells, sample was put to ST and EA measurement. Dry cell weight was measured to represent microbial concentration. Finally, optimum amount of inoculum was determined. To produce BS from *Bs*TD4 and *Pa*SU7, an optimum amount of inoculum was transferred to MSM containing optimum amount of CG. Culture was then incubated at 30°C under aerobic conditions in a shaking incubator at 200 rpm. Then, dry cell weight was determined, and ST and EA were measured every 3 h for 72 h to find optimum conditions for BS production.

#### Biosurfactant (BS) Recovery and Stability Study

Four solvent systems<sup>14,15</sup> [a mixture of chloroform: methanol (2: 1), cold acetone, dichloromethane and ethyl acetate] were examined for BS extraction. The method showing highest BS activity was used to recover BS from both strains. For thermal stability study, crude BSs at critical micelle concentrations (CMCs) level of each compound in distilled water were prepared. To study effects on BS activity of pH, sodium chloride (NaCl) concentrations and temperature, BS solution was adjusted with 1.0 N HCl or NaOH to obtain pHs of 2.0 to 12.0. NaCl was added to sample to obtain final concentrations

of 1.0 to 11.0% (w/v). BS solution was incubated from 4° to 100°C for 1 h and at 121°C for 15 min and cooled to 25°C. Remaining activity was then determined.

#### Chemical Analysis of Biosurfactant (BS)

BS was spotted in triplicate on readymade silica gel thin layer chromatography plates (Merck, Darmstadt, Germany) using CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (65:15:1) as solvent system. One plate was put into a jar, saturated with iodine vapors to detect lipids. Another plate was sprayed with anisaldehyde and ninhydrin reagent (0.2% ninhydrin solution in acetone) and dried. It was then heated at 120°C for 5 min for detection of sugars and peptides, respectively. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) of BS was done on a Nexus-870 FT-IR spectrometer (Thermo Electron Co., Yokohama, Japan) by KBr pellet method. Dried BS samples (0.5 mg) were ground in 80 mg of spectral grade KBr (Merck, Darmstadt, Germany) and pressed into pellets under 6 tons/cm<sup>2</sup> pressure using a hydraulic press (Specac, Orpington, Kent, UK). For BS molecular mass, BS (0.5 mg) was dissolved in methanol and analyzed by Electrospray Ionization - Mass Spectrometry (ESI-MS) (Micromass Co., LCT KC 317, England). Electro spray source was operated at: ionization source temp., 80°C; electrolyte voltage, 200 V; and sprays inlet temp., 120°C. Equipment was run in a positive ion mode.

#### Effect of Biosurfactant (BS) on Mobilization of Used Lubricating Oil (ULO)

For BS effect on ULO mobilization, mobility test was done with a 30 cm × 30 cm glass plate, on which 0.5 ml ULO (5) were placed. Sample drops (5) were mixed with distilled water (0.5 ml), and 0.5 ml (20 mg/l) of TD4, SU7, Tween 80 and SDS, respectively. Glass plates were plated 45° from ground at room temperature (RT, 30±2°C) and measured distances after 1 min of oil displacement<sup>18</sup>.

#### Application of Biosurfactant (BS) in Oil Removal from Contaminated Sand

BS suitability for enhance oil recovery was investigated using acid washed sand (800 g) impregnated with ULO (50.0 ml). Fractions of contaminated sand (20.0 g) were transferred to flasks (250 ml), in which were added distilled water (60.0 ml; control), and 60.0 ml aqueous solutions of SDS, Tween 80, and BSs at CMCs of each compound. Samples were incubated on a rotary shaker (200 rpm) for 24 h at 30°C and centrifuged at 5000 rpm for 20 min for separation of laundering solution and sand. Amount of oil residing in

sand after the impact of BS was gravimetrically determined as the amount of material extracted from sand by hexane<sup>19</sup>. Experiment was carried out at 25, RT, 45 and 65°C to assess the influence of temperature on BS-induced oil recovery.

#### **Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) Solubilization Assay**

For PAHs solubilization assay<sup>20</sup>, an appropriated concentration of each compound (anthracene, Ant; fluoranthene, Fluora; fluorine, Fluori; naphthalene, Nap; phenanthrene, Phe or pyrene, Pry from stock solution in acetone) was distributed into glass test tube (10 mm × 170 mm) and kept open inside an operating chemical fume hood to remove solvent. Then, 5.0 ml of assay buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0) and BS at increasing concentrations (0-30 mg/ml), obtained from respective bacterial strains, were used. Assay buffer containing BS, but no PAH, was used as blank. Tubes were capped with plastic closures and incubated overnight at 30°C with shaking (200 rpm) in dark. Samples were filtered through 1.2 µm filters (Whatman, Springfield Mill, United Kingdom) and 3.0 ml of this filtrate was extracted with equal volume of hexane. This emulsion was centrifuged at 8,500 rpm for 10 min to separate aqueous and hexane phases. PAH concentration was measured spectrophotometrically (Libra S22, Biochrom Ltd., Cambridge, England) at specific wavelength of each compound<sup>20</sup>. From a calibration curve of individual PAH (in hexane), concentration of each PAH was determined. Assay buffer with BS but without PAH was extracted with hexane identically and served as blank.

#### **Analytical Methods**

Biomass determination was done in term of dry cell weight. At different times of fermentation, samples were mixed in pre-weighted tubes with chilled distilled water and centrifuged at 8,500 rpm for 30 min. Biomass obtained was dried overnight at 105°C and weighted. For EA<sup>12</sup> (E24), 4 ml of hydrocarbon or oil was added to 4 ml of aqueous solution of culture supernatant in a screw cap tube, and vortexed at high speed for 2 min. Emulsion stability was determined after 24 h. E24 was calculated by dividing measured height of emulsion layer by the mixtures total height and multiplying by 100. ST was measured using a Model 20 Tensiometer (Fisher Science Instrument Co., PA, USA) at 25°C. CMC was determined by plotting surface tension versus concentration of BS in the solution.

All experiments were carried out in triplicate for calculation of mean value. Tween 80 and SDS were used

as positive controls, while distilled water and MSM medium were used as negative controls. All chemicals used were of analytical grade. CG was obtained from biodiesel pilot plant, Department of Chemical Engineering, Prince of Songkla University, Thailand. ULO was collected from motorcycle garage near Prince of Songkla University, Thailand. Statistical analysis was performed using Statistical Package for Social Science (SPSS 10.0, for Windows Inc., Chicago, IL).

## **Results and Discussion**

### **Effect of Crude Glycerol (CG) Concentration**

Highest activities (Table 1) towards BS production were found when CG (6 g/l) was used in cultivation of *BsTD4* and *PaSU7*. Although CG (6 g/l) could not give the highest value of dry cell weight, especially in case of *BsTD4*; excreted BSs displayed good surface activities in terms of ST reduction and BS yield. Therefore, MSM supplemented with CG (6 g/l) was chosen as appropriate culture medium for next experiments of BS production by two bacterial strains. Currently, a very important renewable C source is CG<sup>8</sup>. Increase in biodiesel production is generating large quantities of CG. With the production of 10 kg of biodiesel from rapeseed oil, 1 kg of CG becomes available<sup>21</sup> and its price is decreasing and tends to decrease even more as traditional CG markets become saturated.

### **Effect of Nitrogen (N) Source**

After examining the most commonly used organic and inorganic N sources reported<sup>22</sup>, CMSG was found (Table 1) the most efficient N source to give high BS yield for *BsTD4* (1.91 g/l) and *PaSU7* (1.06 g/l). These yields were 2.35 and 2.46 folds of that obtained from using (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as N source for *BsTD4* and *PaSU7*, respectively. Moreover using CMSG as N source not only increased BS yield but also improved biomass and reduction of ST and E24 by selected strains.

### **Effect of Carbon:Nitrogen (C:N) Ratio**

C:N ratio is a vital factor influencing performance of BS production<sup>23</sup>. Best BS activity in ST reduction, BS yield and E24 from both strains was found at a C:N ratio of 10 (Table 1). Productivity of BS tended to decrease as C:N ratio increased over 15. BS production is reported more efficient under N-limiting conditions<sup>14,15</sup>. The results show that a possible inhibitory effect on bacterial metabolism may occur due to a likely nutrient transport deficiency. It is likely that assimilation of nitrate as N source is very low, leading to a simulated N-limiting condition<sup>24</sup>.

Table 1—Effect of carbon and nitrogen concentrations and C: N ratio on growth and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7, cultivated in 250 ml flask containing 50 ml MSM at 30°C in a shaking incubator at 200 rpm for 48 h\*

Parameters	Dry cell weight, g/l		Surface tension, N/m		Biosurfactant, g/l		Emulsification activity, %	
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Crude glycerol, % w/v [N-source, 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]</i>								
2	1.57±0.25	1.04±0.06	36.3±0.5	37.5±2.1	0.10±0.02	0.09±0.02	15.50±2.00	39.45±2.50
4	2.10±0.57	1.27±0.10	33.4±2.0	35.5±1.2	0.56±0.03	0.26±0.03	18.53±2.83	40.82±2.65
6	3.14±0.42	1.31±0.27	33.5±0.5	34.3±2.1	0.81±0.08	0.43±0.02	20.52±4.08	43.28±1.73
8	3.54±0.48	1.48±0.33	32.5±1.5	35.0±0.5	0.55±0.02	0.21±0.09	19.51±6.15	40.52±1.23
10	3.59±0.81	1.54±0.27	34.0±1.5	35.3±0.3	0.50±0.08	0.18±0.04	18.51±2.24	39.52±2.82
<i>Nitrogen sources, 1 g/l (C-source, 6% crude glycerol)</i>								
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.14±0.42	1.31±0.27	33.5±0.5	34.3±2.1	0.81±0.08	0.43±0.02	20.52±4.08	43.28±1.73
CMSG	4.89±0.52	4.18±0.12	29.8±2.4	30.0±0.9	1.91±0.28	1.06±0.11	58.51±8.27	59.52±5.85
NH <sub>4</sub> Cl	3.27±0.85	1.51±0.14	35.3±1.2	33.5±2.8	0.81±0.11	0.33±0.05	22.54±5.08	40.28±5.00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.19±0.77	1.68±0.21	32.5±1.7	36.0±2.4	0.86±0.05	0.20±0.04	18.93±5.03	35.82±6.53
Peptone	5.04±0.92	4.58±0.24	30.2±1.4	33.5±1.7	1.22±0.08	0.88±0.07	40.82±6.00	49.82±4.82
<i>C: N ratio</i>								
Control	4.89±0.52	4.18±0.12	29.8±1.4	30.0±0.9	1.91±0.28	1.06±0.11	58.51±8.27	59.52±5.85
10	4.92±0.41	4.58±0.20	29.5±5.1	30.5±1.8	2.04±0.12	1.16±0.23	58.00±5.25	60.50±4.20
15	5.17±0.55	4.61±0.24	30.2±1.7	31.2±4.2	2.01±0.23	1.03±0.11	48.55±4.05	55.08±4.12
20	5.32±0.71	4.68±0.70	32.8±1.5	30.8±2.1	1.86±0.09	0.90±0.04	45.83±4.51	59.52±5.03
25	5.04±0.12	4.08±0.52	35.5±2.4	32.1±1.8	1.82±0.15	0.85±0.05	42.52±5.70	45.80±5.22

\*All values are mean ± SD from triplicate determinations

Table 2—Effect of inoculum concentration on biosurfactant production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7, cultivated in 250 ml flask containing 50 ml MSM supplemented with 15% CG and 1% CMSG at 30°C in a shaking incubator at 200 rpm for 48 h\*

Inoculum conc. % v/v	Dry cell weight g/l		Surface tension mN/m		Biosurfactant g/l		Emulsification activity %	
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
2	5.17±0.55	4.58±0.20	30.2±1.7	30.5±1.8	2.01±0.23	1.16±0.23	58.55±4.05	60.50±5.20
4	5.32±0.52	4.68±0.14	30.5±2.1	30.0±2.5	2.10±0.22	1.49±0.14	60.80±5.01	64.00±8.78
6	5.47±0.24	4.69±0.37	29.8±1.4	30.2±2.0	2.23±0.13	1.35±0.24	65.25±5.40	55.48±9.82
8	5.52±0.41	4.81±0.14	30.2±1.1	30.1±2.0	2.22±0.08	0.98±0.02	55.73±2.58	50.82±8.93
10	5.60±0.21	4.80±0.12	30.1±1.0	30.0±1.5	2.10±0.25	0.87±0.07	52.82±0.90	50.91±8.52

\*All values are mean ± SD from triplicate determinations

**Effect of Inoculum**

Highest amount of inoculum (Table 2) on BS production was *Bs*TD4 (6%) and *Pa*SU7 (4%). Although dry cell weight seemed to increase with an increase in the amount of inoculums, but excreted BSs did not show superior surface activities.

**Optimum Fermentation Conditions**

To maximize BS production, *Bs*TD4 and *Pa*SU7 were cultivated in MSM containing CG (10 g/l), CMSG (1 g/l), inoculums (6% and 4%, respectively) for 72 h. *Bs*TD4 (Fig. 1a) began to excrete BS after the first lag phase (9 h) of cultivation, as indicated by a decrease in ST of culture media. During lag phase (9-39 h), ST of culture

medium was strongly reduced and reached a minimum as the cultivation time approached 54 h, which corresponded to stationary phase of microbial growth. After 54 h, microbial system entered into dead phase. Thus a cultivation time of 54 h gave the highest BS yield (2.65 g/l) and lowest ST, indicating highest surface activity of excreted BS. Thus, it was selected as optimum time for BS production by *Bs*TD4. *Pa*SU7 possesses a short lag phase (6 h) and also provides a large reduction of ST (Fig. 1b). During lag phase (9-39 h), ST of culture medium rapidly decreased in early lag phase and reached a minimum when the system approached stationary phase. A minimum ST (30.0 mN/m) and BS yield (2.25 g/l) were observed at a cultivation time of 63 h.

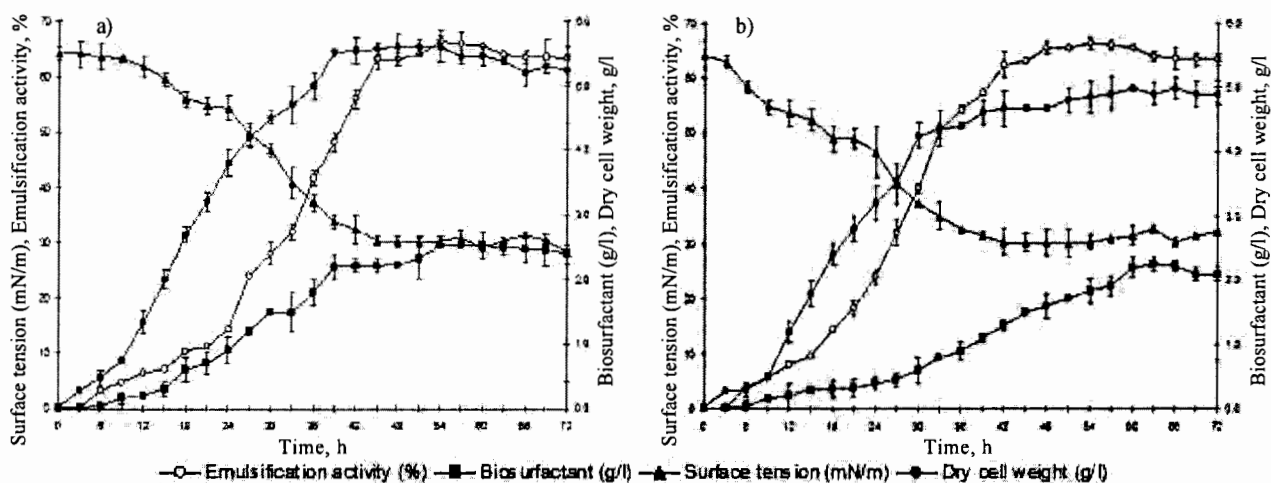


Fig. 1—Times course of growth and biosurfactant production in optimal medium (10% of crude glycerol and 1% of commercial monosodium glutamate) at 200 rpm and 30°C by: a) *Bacillus subtilis* TD4; and b) *Pseudomonas aeruginosa* SU7 (Bars indicate standard derivation from triplicate determinations)

After 63 h, dead phase appeared. Thus, optimum time for BS production by SU7 was 63 h.

#### Recovery of Biosurfactant (BS)

Crude extract of BS was recovered from culture supernatant of *Bs*TD4 and *Pa*SU7 by extraction with organic solvents. Ethyl acetate resulted in greater activity of crude extract than systems based on mixtures of chloroform and methanol, cold acetone or dichloromethane (data not shown). Recovery yields were from *Bs*TD4 (2.65 g/l) and *Pa*SU7 (2.25 g/l). Extraction of bioproducts with considerably high polarity by ethyl acetate solvent is reported<sup>9</sup> rather efficient. Because recovery and concentration of BSs from fermentation broth largely determine production cost, ethyl acetate is a better choice than highly toxic chloro-organic compounds.

#### Physicochemical Properties

ST of culture supernatants of *Bs*TD4 and *Pa*SU7 was measured as a function of concentration in order to compare surface activities of two excreted BSs. STs vs BS concentrations (Fig. 2) indicated that ST of pure water rapidly decreased as concentration of *Bs*TD4 BS increased and a minimum ST (26.0 mN/m) was observed. From break point of the plot of ST vs BS concentration, CMC was 12 mg/l (Fig. 2a). *Pa*SU7 BS could decrease ST of pure water from 72.0 to 28.0 mN/m and CMC was estimated to be 20 mg/l (Fig. 2b). BS showed better properties in terms of higher ST reduction and a lower CMC. Minimum ST and CMCs of *Bs*TD4 and *Pa*SU7

based BS are consistent with reported values<sup>10</sup>. BSs from *Bs*TD4 and *Pa*SU7 showed a lower minimum ST and CMC value than that of BS from *B. subtilis* LB5a (26.6 mN/m, 33.0 mg/l)<sup>25</sup>, *B. subtilis* PT2 (26.4 mN/m, 25.0 mg/l)<sup>26</sup>, *P. aeruginosa* SP4 (28.3 mN/m, 120 mg/l)<sup>26</sup> and *P. aeruginosa* S6 (33.9 mN/m, 50 mg/l)<sup>27</sup>.

#### Stability of Biosurfactant (BS)

Heating of crude BS from two strains up to 100°C (or its autoclaving at 121°C) caused a little effect on ST reduction and its EA (Table 3). An 8% reduction in E24 and ST was observed after autoclaving at 121°C for 15 min. ST reduction (ST ≈ 30 mN/m) and E24 (E24 ≈ 60%) of crude BS from two strains were relatively stable at the temperatures used. Activity of *Bs*TD4 based BS decreased (Table 3) obviously with decreasing pH (< 4.0). ST of BS from two strains remained stable over a pH (6.0–10.0), although a marginal decrease at pH 10.0 was detected with *Pa*SU7 based BS. At pH 6.0, ST was lowest for BSs (*Bs*TD4, 26.0; and *Pa*SU7, 28.0 mN/m). E24 of both two strains decreased when pH varied from 12.0 to 6.0 and reached highest at pH 6.0. However, when pH reached 4.0, E24 from two strains declined and came to its lower point due to precipitation of BS<sup>25</sup>. A negligible change occurred in BS activity (Table 3) with an increase in NaCl concentration for BSs (*Bs*TD4, 7.0; and *Pa*SU7, 9%). Likewise, an increase in NaCl concentration up to 9.0% did not affect E24 of BS from both strains. However, at the highest level of NaCl (11.0%), E24 was severely dropped to 30.0% and ST increased as well (45 mN/m).



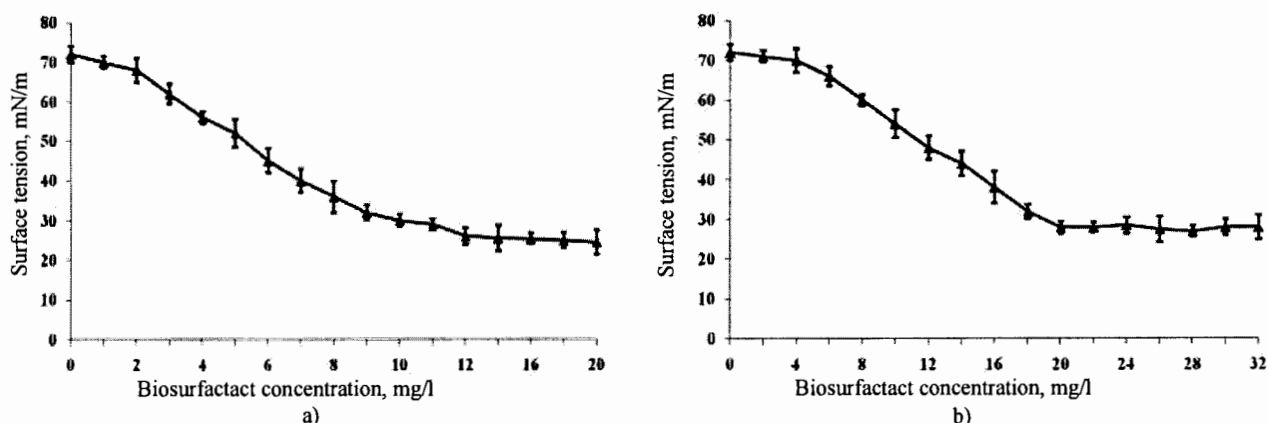


Fig. 2—Surface tension as a function of biosurfactant concentration produced by: a) *Bacillus subtilis* TD4; and b) *Pseudomonas aeruginosa* SU7 (Bars represent standard deviation from three determinations)

Table 3—Influence of temperature, pH and salt concentration on surface tension and emulsifying activity of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7\*

Parameters	<i>B. subtilis</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Surface tension mN/m	Emulsification activity %	Surface tension mN/m	Emulsification activity %
<i>Temp., °C</i>				
4	30.0±2.3	64.5±3.5	33.2±1.4	63.0±3.4
20	26.3±2.5	65.8±2.3	28.0±3.0	64.5±5.0
40	29.5±2.7	62.5±5.0	28.6±2.2	62.2±2.0
80	30.2±5.1	60.8±5.7	29.8±1.5	59.8±8.9
100	31.5±2.0	58.4±8.0	31.5±4.2	58.5±8.0
121	32.0±2.0	58.0±5.0	32.0±2.4	58.5±10.2
<i>pH</i>				
2.0	55.4±2.9	20.8±2.6	53.6±1.8	22.0±2.1
4.0	48.3±2.8	39.5±2.5	41.0±3.2	37.3±1.9
6.0	26.0±2.4	65.7±2.7	28.0±1.0	64.4±1.7
8.0	27.2±3.1	62.3±2.9	30.2±2.4	62.5±5.0
10.0	28.9±5.2	60.8±5.0	31.5±1.0	60.4±4.7
12.0	30.2±0.5	55.0±2.7	32.0±2.3	56.6±2.4
<i>NaCl, %</i>				
4	30.0±2.3	64.5±3.5	33.2±1.4	63.0±3.4
20	26.3±2.5	65.8±2.3	28.0±3.0	64.5±5.0
40	29.5±2.7	62.5±5.0	28.6±2.2	62.2±2.0
80	30.2±5.1	60.8±5.7	29.8±1.5	59.8±8.9
100	31.5±2.0	58.4±8.0	31.5±4.2	58.5±8.0

\*All values are mean ± SD from triplicate determinations

#### Emulsification Properties of Biosurfactant (BS)

BSs from *Bs*TD4 and *Pa*SU7 showed a good E24 against several hydrophobic substrates (Fig. 3a). *Bs*TD4 based BS emulsified more than 50% of all hydrocarbons (cyclohexane, hexane, xylene, benzene, *n*-hexadecane, kerosene and toluene) tested. It ranged 60-70% for palm oil, soybean oil and olive oil. In addition, *Pa*SU7 based BS was found able to form emulsion of more than 55% toward all hydrocarbons tested and ranging 60-75% for vegetable oils. Thus BSs produced by *Bs*TD4 and *Pa*SU7

have a good potential for applications in microbial enhanced oil recovery, and can also be used as emulsifying agents in food industry.

#### Biosurfactant (BS) Characteristics

Chemical nature of BSs from *Bs*TD4 and *Pa*SU7 were seen as a single spot on TLC. This fraction showed a positive reaction with ninhydrin reagent and iodine vapor, indicating the presence of peptide and lipid moieties in the molecule (data not shown). Lipopeptide nature of BS

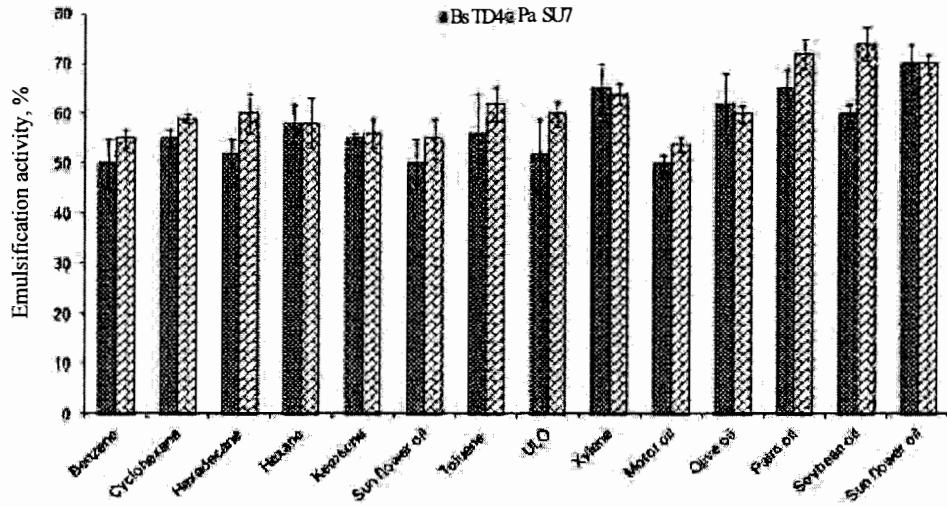


Fig. 3—Emulsification activity (E24) of biosurfactant against different hydrocarbons and vegetable oils (Bars represent standard deviation from three determinations)

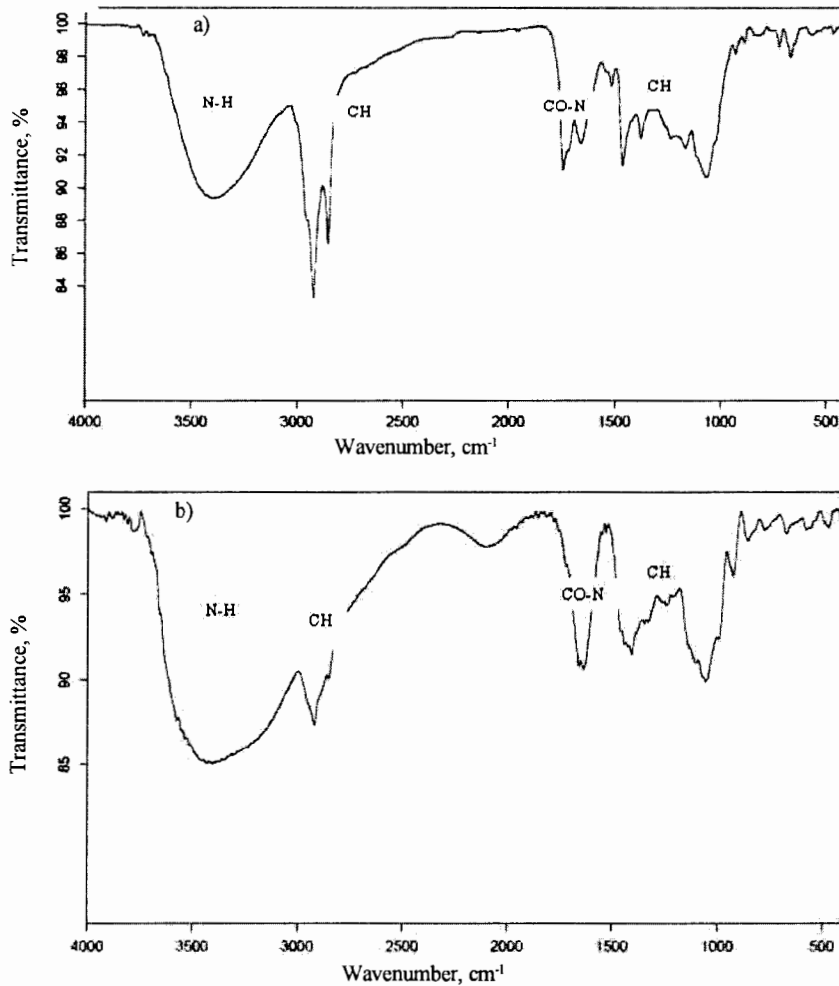


Fig. 4—FTIR spectrum of biosurfactant produced by: a) *Bacillus subtilis* TD4; and b) *Pseudomonas aeruginosa* SU7

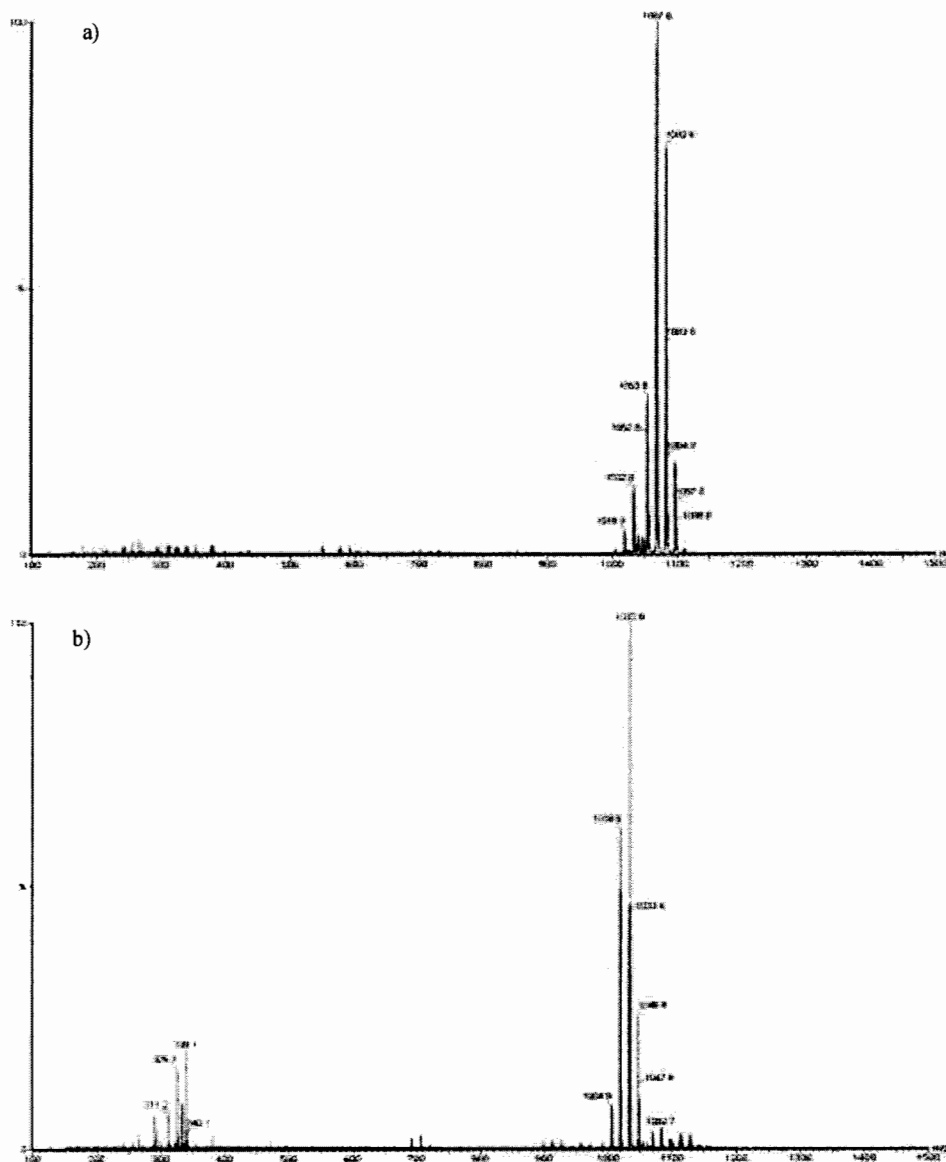


Fig. 5—Mass spectrum of biosurfactant produced by: a) *Bacillus subtilis* TD4; and b) *Pseudomonas aeruginosa* SU7

was further confirmed by IR spectra of compound (Fig. 4). IR spectrum in KBr showed bands characteristic of peptides at  $3305\text{ cm}^{-1}$  (NH stretching mode) and at  $1650\text{ cm}^{-1}$  (stretching mode of CO-N bond). Bands at  $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ,  $2855\text{ cm}^{-1}$  and at  $1464\text{ cm}^{-1}$  reflect aliphatic chains ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2$ ) of the fraction. BS structure from both strains was fully supported by mass spectrometric analysis. Analysis of intact molecules with ESI-MS (Fig. 5) revealed molecular ion peaks of BS from *Bs*TD4 (1053, 1067, 1082, 1097 m/z) and from *Pa*SU7 (1004.0, 1018, 1032, 1046 m/z). Spectra clearly

indicate the presence of higher and lower homologous of surfactants for the difference between prominent  $M^+$  peaks being around 14 (m/z), corresponding to a difference in the number of methylene groups ( $\text{CH}_2$ ). This finding was in accordance with a reported study that showed BSs produced by *Bacillus* spp. had molecular mass ranging m/z 992-1088<sup>15,28</sup>. Chemical nature of BS thus varies with both species and strains within *Bacillus* spp.<sup>10</sup>. Thus BSs from *Bs*TD4 and *Pa*SU7 were ipeptide type BS. Generally, BSs produced by *Pseudomonas* spp. were found to be glycolipid type

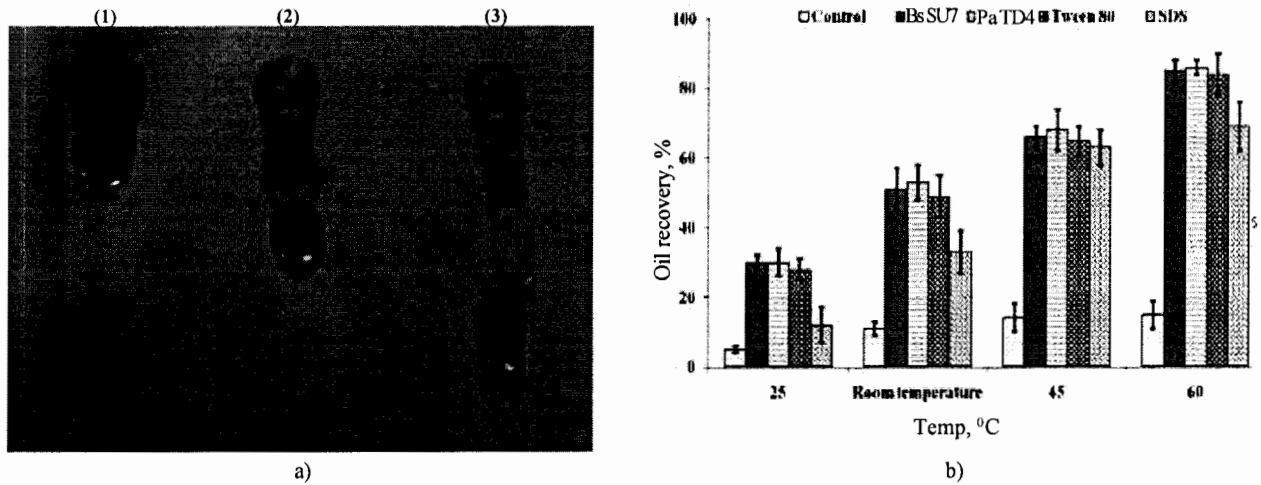


Fig. 6—Effect of biosurfactant on mobilization of used lubricating oil: a) oil with water (1), oil with Bs SU7 biosurfactant (2) and oil with Pa TD4 biosurfactant (3); and b) Microbial enhanced oil recovery by biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 under different temperatures

BSs<sup>22,27</sup>. However, some studies reported lipopeptide BS produced by *Pseudomonas* spp.<sup>29</sup>.

#### Effect of Biosurfactant (BS) on Mobilization of Used Lubricating Oil (ULO)

BSs can be utilized for crude oil mobilization and microbial enhanced oil recovery<sup>30</sup>. In a test, ULO mixed with BS was about twice the displacement (Fig. 6a) for *Bs*TD4 (15 cm) and *Pa*SU7 (11 cm) as compared with that of control (5.5 cm), suggesting that BS produced by two strains can be useful in ULO mobilization. BSs reduce ST and interfacial tensions of reservoir fluids; hence, oil release is promoted and oil recovery can be enhanced as well<sup>30,31</sup>.

#### Microbial Surfactant-Enhanced Oil Recovery

Due to robust properties of BSs, use of BSs in tertiary oil recovery applications is receiving more attention<sup>26</sup>. For practical application of BS on oil removal from contaminated sand, performance of obtained BS was compared with that of two synthetic surfactants (Tween 80 and SDS). In present study, efficiency of *Bs*TD4 and *Pa*SU7 in microbial surfactant-enhanced oil recovery was evaluated at varying temperature, and found that distilled water (control) recovered oil (5-15%) in tested temperatures (Fig. 6b). BSs from *Bs*TD4 and *Pa*SU7 and Tween 80, in tested temperatures, could recover motor oil from contaminated sand as follows: 25°C, 25-28%; RT, 49-53%; 45°C, 65-68%; and 60°C, 84-86%. SDS was found to be less efficient in oil removal as follows: 25°C, 12%; RT, 33%; 45°C, 63%; and 60°C, 69%.

This is due to characteristic of anionic surfactant that less efficacy than nonionic surfactant to maintain an emulsion in oil in water systems<sup>32</sup>. The result was in accordance with earlier study that BS from *Bacillus* spp. and nonionic surfactant Tween 80 had higher efficacy than anionic surfactant SDS in oil removal<sup>5</sup>. These results indicated superior performance of BS over SDS in terms of mobilization of oil pollutants from contaminated soil. Thus BSs examined in this study have the potential to be used as biostimulation agents for bioremediation of oil-polluted soils.

#### Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) Solubilization Effect of Bisurfactant (BS)

PAHs are ubiquitous environmental pollutants. Excessive inputs from anthropogenic activities have caused serious contamination and adversely affect the health of aquatic and human through bioaccumulation. PAHs are hydrophobic and readily adsorbed onto particulate matter; therefore, coastal and marine sediments become the ultimate sinks and elevated concentrations have been recorded<sup>2</sup>. Solubilization of PAHs depends on the type and dose of surfactant, hydrophobicity, surfactant-soil interactions and time that contaminant has been in contact with the soil<sup>33</sup>. BSs from *Bs*TD4 and *Pa*SU7 enhanced solubility of PAHs (Table 4). In general, BSs enhanced apparent solubility of PAHs in a dose dependent manner. However, solubilization of Fluore, Nap or Phe by BSs from both two strains (3-5 time higher apparent solubility compared to control) was significantly lower ( $p < 0.05$ ) when

Table 4—Dose dependent solubilization of polyaromatic hydrocarbons by biosurfactant isolated from *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7

Biosurfactant conc. mg/l	Solubility of polyaromatic hydrocarbons*, mg/l					
	Ant	Fluora	Fluore	Nap	Phe	Pyr
<i>B. subtilis</i>						
0	0.07±0.01 <sup>g**</sup>	0.22±0.02 <sup>f</sup>	1.78±0.11 <sup>g</sup>	31.34±3.52 <sup>g</sup>	1.39±0.11 <sup>g</sup>	0.14±0.03 <sup>f</sup>
5	0.17±0.02 <sup>f</sup>	1.02±0.08 <sup>e</sup>	2.65±0.13 <sup>f</sup>	48.51±6.05 <sup>f</sup>	2.31±0.12 <sup>f</sup>	0.80±0.07 <sup>e</sup>
10	0.43±0.08 <sup>e</sup>	1.92±0.13 <sup>d</sup>	3.30±0.71 <sup>e</sup>	61.01±4.20 <sup>e</sup>	2.52±0.80 <sup>de</sup>	1.72±0.11 <sup>d</sup>
15	0.80±0.05 <sup>d</sup>	2.85±0.24 <sup>c</sup>	3.92±0.08 <sup>d</sup>	67.86±5.13 <sup>d</sup>	2.62±0.52 <sup>de</sup>	2.14±0.80 <sup>c</sup>
20	1.12±0.10 <sup>c</sup>	3.19±0.11 <sup>b</sup>	4.67±0.38 <sup>c</sup>	75.54±6.21 <sup>c</sup>	2.99±0.14 <sup>c</sup>	2.65±0.45 <sup>b</sup>
25	1.28±0.09 <sup>b</sup>	4.79±0.24 <sup>a</sup>	5.78±0.20 <sup>b</sup>	86.84±4.88 <sup>b</sup>	3.71±0.12 <sup>b</sup>	2.80±0.27 <sup>b</sup>
30	1.49±0.14 <sup>a</sup>	4.85±0.27 <sup>a</sup>	6.55±0.84 <sup>a</sup>	94.57±8.73 <sup>a</sup>	4.01±0.28 <sup>a</sup>	3.12±0.84 <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i> SU7						
0	0.07±0.01 <sup>g**</sup>	0.22±0.02 <sup>f</sup>	1.78±0.11 <sup>g</sup>	31.34±3.52 <sup>g</sup>	1.39±0.11 <sup>f</sup>	0.14±0.03 <sup>f</sup>
5	0.12±0.02 <sup>f</sup>	1.00±0.09 <sup>e</sup>	2.40±0.15 <sup>f</sup>	39.51±4.45 <sup>f</sup>	2.02±0.12 <sup>e</sup>	0.71±0.06 <sup>e</sup>
10	0.39±0.08 <sup>e</sup>	1.79±0.13 <sup>d</sup>	3.24±0.55 <sup>e</sup>	50.51±4.18 <sup>e</sup>	2.19±0.51 <sup>d</sup>	1.58±0.81 <sup>d</sup>
15	0.77±0.05 <sup>d</sup>	2.71±0.10 <sup>c</sup>	3.78±0.12 <sup>d</sup>	61.86±4.80 <sup>d</sup>	2.51±0.92 <sup>c</sup>	2.31±0.46 <sup>c</sup>
20	1.05±0.11 <sup>c</sup>	3.05±0.14 <sup>b</sup>	4.52±0.51 <sup>c</sup>	70.05±8.03 <sup>c</sup>	2.82±0.80 <sup>c</sup>	2.51±0.78 <sup>bc</sup>
25	1.20±0.08 <sup>b</sup>	4.68±0.61 <sup>a</sup>	5.67±0.15 <sup>b</sup>	80.54±4.58 <sup>b</sup>	3.61±0.12 <sup>b</sup>	2.70±0.28 <sup>b</sup>
30	1.41±0.11 <sup>a</sup>	4.88±0.24 <sup>a</sup>	6.42±0.21 <sup>a</sup>	91.27±5.13 <sup>a</sup>	3.88±0.48 <sup>a</sup>	3.06±0.42 <sup>a</sup>

\*Values are mean ± SD from triplicate determinations (Ant, anthracene; Fluora, fluoranthene; Fluore, fluorine; Nap, naphthalene; Phe, phenanthrene; and or Pry, pyrene); \*\*Different superscript letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ )

compared with Ant, Fluora or Pyr affect by BSs (15-20 times higher compared to control). In present study, BSs showed ability to solubilize PAHs in aqueous phase, indicating its possible role in increasing bioavailability of non-soluble organic compounds for bacterial metabolism.

### Conclusions

BS-producing bacteria, *BsTD4* and *PaSU7*, were isolated from palm oil contaminated soil in Thailand. BS production was done by using MSM with CG as C and CM5G as N source. *BsTD4* could grow in culture medium better than *PaSU7*, leading to shorter cultivation time for BS production and a higher yield of extracted BS. BS produced by *BsTD4* had better surface activity than that produced by *PaSU7*. FT-IR spectroscopy and ESI-MS confirmed the presence of lipopeptide in samples. Excreted BSs were superior, in terms of efficiency in oil recovery, to anionic surfactant SDS. BS produced by *BsTD4* could recover oil more effectively than that produced by *PaSU7*, and also for the enhanced solubility of PAHs. Thus, two BSs produced by *BsTD4* and *PaSU7* have good potential for microbial enhanced oil recovery and environmental applications.

### Acknowledgments

Author AS thanks Polkiet Rajabhat University for scholarship. This work was supported by Higher

Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of Higher Education Commission, and also funded by Graduate School, Prince of Songkla University.

### References

- Willke T & Vorlop K D, Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry, *Appl Microbiol Biotechnol*, **66** (2004) 131-142.
- Huang H, Cheng S G & George T T, Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Appl Biochem Biotechnol*, **98** (2002) 687-698.
- Wang X, Dou P, Zhao P, Zhao C, Ding Y *et al*, Immobilization of lipases onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for application in biodiesel production, *Chem Sus Chem*, **2** (2009) 947-950.
- Yazdani S S & Gonzalez R, Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry, *Curr Opin Biotechnol*, **18** (2007) 213-219.
- Johnson D & Taconi K, The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production, *Environ Prog*, **26** (2007) 338-348.
- Athalye S K, Garcia R A & Wen Z, Use of biodiesel-derived crude glycerol for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*, *J Agric Food Chem*, **57** (2009) 2739-2744.
- da Silva G P, Mack M & Contiero J, Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology, *Biotechnol Adv*, **27** (2009) 30-39.
- Amaral P F F, Coelho M A Z, Marrucho I M & Coutinho J A P, Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application, *Adv Exp Med Biol*, **672** (2010) 236-249.

- 9 Chen H L & Juang R S, Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction, *Biochem Eng J*, **38** (2008) 39-46.
- 10 Ghojavand H, Vahabzadeh F, Roayaei E & Khodabandeh A, Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696), *J Colloid Interf Sci*, **324** (2008) 172-176.
- 11 Joshi S, Bharucha C & Desai A J, Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B, *Biores Technol*, **99** (2008) 4603-4608.
- 12 Cooper D G & Goldenberg B G, Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Appl Environ Microbiol*, **53** (1987) 224-229.
- 13 Fox S L & Bala G A, Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates, *Biores Technol*, **75** (2000) 235-240.
- 14 Saimmai A, Sobhon V & Maneerat S, Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183, *Ann Microbiol*, (2011a) doi:10.1007/s13213-011-0275-9.
- 15 Saimmai A, Tani A, Kimbara K, Sobhon V & Maneerat S, Molasses a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application, *Appl Biochem Biotech*, **165** (2011b) 315-335.
- 16 Wan-Nawawi W M, Jamal P & Alam M Z, Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production, *Biores Technol*, **101** (2010) 9241-9247.
- 17 Silva S N R L, Farias B C B B, Rufinob R D, Luna J M & Sarubbob L A, Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992, *Colloid Surface B*, **79** (2010) 174-183.
- 18 Roldan-Carrillo T, Martinez-Garcia X, Zapata-Penasco I, Castorena-Cortes G, Reyes-Avila J *et al*, Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design, *Colloid Surface B*, **86** (2011) 384-389.
- 19 Sobrinho H B S, Rufino R D, Luna J M, Salgueiro A A, Campos-Takaki G *et al*, Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP099, *Process Biochem*, **43** (2008) 912-917.
- 20 Barkay T, Navon-Venezia S, Ron E Z & Rosenberg E, Enhancement of solubilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan, *Appl Environ Microbiol*, **65** (1999) 2697-2702.
- 21 Meesters P A E P, Huijberts G N M & Eggink G, High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source, *Appl Microbiol Biotechnol*, **45** (1996) 575-579.
- 22 Wei Y H, Chou C L & Chang J S, Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater, *J Biochem Eng*, **27** (2005) 146-154.
- 23 Santos A S, Sampaio A P, Vasquez G S, Anna L M S, Pereira Jr N *et al*, Evaluation of different carbon and nitrogen sources in the production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas*, *Appl Biochem Biotechnol*, **98** (2002) 1025-1035.
- 24 Barber W P & Stuckey D C, Nitrogen removal in a modified anaerobic baffled reactor (ABR): 1, denitrification, *Water Res*, **10** (2000) 2413-2422.
- 25 Nitschke M & Pastore G, Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater, *Biores Technol*, **97** (2006) 336-341.
- 26 Pornsunthorntawe O, Arttaweeporn N, Paisanjit S, Somboonthanate P, Abe M *et al*, Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery, *Biochem Eng J*, **42** (2008) 172-179.
- 27 Yin H, Qiang J, Jia Y, Ye J, Peng H *et al*, Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 from oil-containing wastewater, *Process Biochem*, **44** (2008) 302-308.
- 28 Li A H, Xu M Y, Sun W & Sun G P, Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* GIM 32 using different substrates including molasses distillery wastewater, *Appl Biochem Biotechnol*, **163** (2010) 600-611.
- 29 Thavasi R, Nambaru V R M S, Jayalakshmi S, Balasubramanian T & Banat I M, Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources, *Indian J Microbiol*, **51** (2011) 30-36.
- 30 Kitamoto D, Isoda H & Nakahara T, Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers, *J Biosci Bioeng*, **94** (2002) 187-201.
- 31 Morita T, Konish M, Fukuoka T, Imura I & Kitamoto D, Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317, *J Biosci Bioeng*, **104** (2007) 78-81.
- 32 Doong R A & Lei W G, Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant, *J Hazard Mater*, **96** (2003) 15-27.
- 33 Zhou M & Rhue R D, Screening commercial surfactants suitable for remeditating DNAPL source zones by solubility, *Environ Sci Technol*, **34** (2000) 1985-1990.

