



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม  
ปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี  
(Development of biosurfactant producing bacteria for application of  
petroleum industry and bioremediation of petroleum materials)

สุภัณฑิต นิมรัตน์  
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256102A1080006  
สัญญาเลขที่ 42/2561

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม  
ปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี  
(Development of biosurfactant producing bacteria for application of  
petroleum industry and bioremediation of petroleum materials)

สุภัณฑิต นิ่มรัตน์<sup>1</sup>  
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>2</sup>ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ธันวาคม 2561

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 42/2561

## บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี ในปีที่ 3 ทำการศึกษาถึงผลของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม และความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 และทำการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพวิธี Oil displacement test รวมทั้งทำการศึกษาถึงปริมาณและค่าความตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และเครื่อง Surface Tension Meter ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ที่เติม 1% (v/v) น้ำตาลกลูโคส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0% โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นของหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่ามีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ เท่ากับ  $66.00 \pm 1.54$  มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าความตึงผิวอยู่ระหว่าง 32.35 มิลลินิวตันต่อเมตร ถึง 24.87 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้เกิดการฟอร์มตัวของไมเซลล์ที่ความเข้มข้นของส่วนใสเท่ากับ 7.11% และมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่พบในส่วนใสเท่ากับ 4.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 น่าจะเป็นแบคทีเรียที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพในสิ่งแวดล้อมและนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการ Oil recovery ในบ่อเก็บกักน้ำมันโดยวิธีการที่เรียกว่า Biostimulation ด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในครั้งนี้

**คำสำคัญ:** แบคทีเรีย, *Bacillus subtilis*, สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, ลิโปเปปไทด์

## ABSTRACT

Research entitled “Development of biosurfactant producing bacteria for application of petroleum industry and bioremediation of petroleum materials” in the third fiscal year was established. This study focused on evaluation of optimal conditions, e.g. carbon source, pH, temperature, salinity and inoculum size, for biosurfactant production of *Bacillus subtilis* SE1 using an oil displacement technique. In addition, quantity and surface tension value of lipopeptide biosurfactant produced by *B. subtilis* SE1 were also investigated using a high performance liquid chromatography and a surface tension meter, respectively. Results showed that an optimal condition for biosynthesis of biosurfactant by *B. subtilis* SE1 included adding 1% (v/v) glucose in mineral salt medium,  $10^8$  CFU/mL of inoculation size and incubating at 30 °C. Under this condition, *B. subtilis* SE1 could produce  $66.00 \pm 1.54$  mg/L lipopeptide biosurfactant and provide surface tension values ranging from 32.35 to 24.87 mN/m. Minimal concentration of biosurfactant at which micelles begin to form was 7.11% and lipopeptide-biosurfactant concentration found in supernatant was 4.69 mg/L. Therefore, *B. subtilis* SE1 is likely to be applied in environmental bioremediation and in an oil recovery method in oil reservoirs, called as biostimulation technology, under optimal condition in this study.

**Keywords:** Bacteria, *Bacillus subtilis*, Biosurfactant, Lipopeptide

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อ.....	II
Abstract.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญภาพ.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	6
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	33
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	69
เอกสารอ้างอิง.....	74
ผลผลิต (Output).....	85
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	86

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....	11
2	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM) .....	33
3	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	34
4	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอน.....	36
5	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	37
6	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน.....	39
7	ผลของ pH ต่างๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	40
8	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอนและปรับค่าความเป็น กรด-ด่าง.....	43
9	ผลของอุณหภูมิต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	44
10	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็น กรด-ด่างและอุณหภูมิ.....	47
11	ผลของความเค็มที่ระดับต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก แบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	48
12	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด- ด่าง อุณหภูมิ และระดับความเค็ม.....	53
13	ผลของความเข้มข้นหัวเชื้อที่ระดับต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	54
14	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด- ด่าง อุณหภูมิ ระดับความเค็ม และความเข้มข้นของหัวเชื้อ.....	57
15	ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารทดสอบจากการตรวจวัด ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 1) .....	58
16	ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารทดสอบจากการตรวจวัด ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 2) .....	59
17	ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารทดสอบจากการตรวจวัด ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 3) .....	60

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 50 ppm.....	62
19	ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 100 ppm.....	63
20	ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 150 ppm.....	64
21	ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 200 ppm.....	65
22	ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 250 ppm.....	66



## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวที่เชื่อมต่อระหว่างของเหลวและอากาศ.....	7
2	โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิปิด.....	8
3	โครงสร้างของวงลิโปเปปไทด์ และโครงสร้างของเซอแฟกติน.....	9
4	โครงสร้างของแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
5	โครงสร้างของทรีฮาโลสลิปิด.....	12
6	โครงสร้างของเซอแฟกตินที่ผลิตจาก <i>Bacillus subtilis</i> .....	12
7	โครงสร้างของโซโฟโรลิปิด.....	12
8	โครงสร้างของอิมัลชัน.....	13
9	ปฏิกิริยานินไฮดริน.....	15
10	เครื่องเขย่าสาร.....	28
11	เครื่องปั่นเหวี่ยง.....	28
12	เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	31
13	เครื่อง Surface Tensiometer.....	32
14	การทดสอบผลของน้ำมันดีเซล 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก แบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	35
15	การทดสอบผลของกลีเซอรอล 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก แบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	35
16	การทดสอบผลของน้ำมันปาล์ม 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก แบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	35
17	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	36
18	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และโซเดียมไนเทรต 1% ต่อการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	38
19	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และ Yeast extract 1% ต่อการผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	38
20	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และยูเรีย 1% ต่อการผลิตสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	38
21	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ไม่ได้ปรับ ค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	41
22	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความ เป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	41



## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
33	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 2% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	50
34	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 3% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	50
35	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 5% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	51
36	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 10% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	51
37	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 15% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	52
38	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0% NaCl และระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ $10^7$ CFU/mL ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	55
39	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0% NaCl และระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ $10^8$ CFU/mL ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	55
40	การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0% NaCl และระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ $10^9$ CFU/mL ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	56

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
41	โครมาโทแกรมของสารทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 1) .....	59
42	โครมาโทแกรมของสารทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 2) .....	60
43	โครมาโทแกรมของสารทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 3) .....	61
44	กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Surfactin.....	61
45	โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 50 ppm.....	62
46	โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 100 ppm.....	63
47	โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 150 ppm.....	64
48	โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 200 ppm.....	65
49	โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 250 ppm.....	66
50	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของส่วนใสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	67
51	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log ความเข้มข้นของส่วนใสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ SE1.....	68

## บทที่ 1 บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารลดแรงตึงผิวเป็นคำสั้น ๆ ของ "สารที่ใช้งานกับพื้นผิว" (Surface-active-agents) ซึ่งคือสารเคมีทั่วไปที่ลดแรงตึงผิวของของเหลวหรือลดแรงตึงระหว่างของเหลวสองชนิดหรือระหว่างของเหลวและของแข็ง สารลดแรงตึงผิวโดยทั่วไปเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) ในธรรมชาติซึ่งมีทั้งส่วนที่ไม่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบน้ำ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (ไม่มีขั้ว) เป็นส่วนที่ไม่ละลายในน้ำและอาจจะมีกรดไขมันที่เป็นห่วงโซ่ยาว (Long-chain of fatty acids) กรดไขมันไฮดรอกซิล (Hydroxyl fatty acids) หรือแอลฟา-อัลคิล-เบต้า-กรดไขมันไฮดรอกซิล ( $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy fatty acids) ด้านปลายที่ชอบน้ำ (มีขั้ว) พบว่าเป็นคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วงเปปไทด์ ฟอสเฟต กรดคาร์บอกซิลิกหรือแอลกอฮอล์ (Van Ginkel, 1989; Jaysree et al., 2011)

สารลดแรงตึงผิวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันเพื่อช่วยในการทำความสะอาดการรั่วไหลของน้ำมัน ตลอดจนการเพิ่มปริมาณน้ำมันในกระบวนการขุดน้ำมันจากบ่อน้ำมัน โดยสารเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ และมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Jayrees et al., 2011) ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ และเป็นสารที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์ (Chen et al., 2007; Jayrees et al., 2011) สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจและการยอมรับมากกว่าสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เนื่องจากมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในเชิงการค้าเพื่อทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ รวมทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่ คุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวและทำให้เกิดอิมัลชันได้ดี มีความเสถียรแม้จะอยู่ภายใต้สภาวะทางกายภาพและเคมีที่รุนแรง สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวและทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ สามารถจับโลหะ สร้างไบโอฟิล์ม มีความเป็นพิษต่ำ สร้างความระคายเคืองน้อย ไม่เป็นอันตรายต่อผิวหนังมนุษย์ ทั้งนี้ยังมีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพสูง เป็นมิตรต่อระบบนิเวศ และสามารถผลิตได้จากสารตั้งต้นที่มีราคาถูกและสารตั้งต้นชนิดใหม่ ๆ ได้ (Banat et al., 2000a; Costa et al., 2006; Mohan et al., 2006) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีศักยภาพที่หลากหลายในการนำไปใช้งานด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมน้ำมัน เกษตรกรรม ยารักษาโรค อาหารและเครื่องสำอาง (Banat et al., 2000b)

จากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารประกอบจากผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถถูกย่อยสลายได้ง่าย จึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้งานด้านเกษตรกรรม ยารักษาโรค อาหารและเครื่องสำอาง (Banat et al., 2000b) การใช้เป็นสารซักฟอก สารที่ทำให้เกิดความชื้น (Wetting agents) สารป้องกันการแยกตัวของน้ำและน้ำมัน (Emulsifiers) สารที่ทำให้เกิดฟองและสารช่วยกระจายตัว (Dispersants) (Makkar and Cameotra, 2002) ทั้งยังใช้เป็นสารหลักในอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เพื่อทำให้การได้น้ำมันกลับคืนมาเพิ่มขึ้นและฟื้นฟูสภาพของ

สารกลุ่มไฮโดรคาร์บอน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพ เช่น การกำจัด การปนเปื้อนทั้งในดินและในน้ำ (Ron and Rosenberg, 2002; Franzetti et al., 2009) การเพิ่มการกระจายตัวของน้ำมันที่เกิดจากการรั่วไหลของน้ำมัน (Mohan et al., 2006) และได้มีการนำไปใช้ในกระบวนการทางเคมีและกายภาพในการออกแบบเพื่อฟื้นฟูสภาพแวดล้อมในแหล่งที่มีการปนเปื้อนด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือโลหะหนัก เช่น การนำสารลดแรงตึงผิวมาบำบัดดินในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนจริงและการนำดินจากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนออกมาบำบัดนอกพื้นที่นั้นหรือการสูบน้ำเพื่อบำบัดชั้นดินอุ้มน้ำ (Mulligan, 2005; Franzetti et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพควรคำนึงถึงประเภทของสารลดแรงตึงผิว ปริมาณและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว รวมถึงสภาวะอื่น ๆ ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการทำงาน ทั้งนี้เพื่อให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดและไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา (วิสาขา ภูจินดา, 2548)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีที่สุดเป็นสารประเภทไกลโคลิปิด (Glycolipids) เช่น แรมโนลิปิด ที่ผลิตโดย *Pseudomonas*, โซโฟโรลิปิด (Sopborolipids) ที่ผลิตโดย *Candida* หลายสปีชีส์, Cell-bound trehalose lipids ที่ผลิตโดย *Rhodococcus* และ *Actinomycetes* และลิโปเปปไทด์ (Lipopeptides) ที่มีลักษณะโครงสร้างที่หลากหลายผลิตโดย *Bacillus* หลายสปีชีส์ (Lang and Philp, 1998; Cubitto et al., 2004; Van Hamme et al., 2006) โดยแรมโนลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวหลักที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งประกอบด้วยโมโน- และได-แรมโนลิปิด ซึ่งมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก (Benincasa et al., 2002) *P. aeruginosa* มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนจากสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมันพืช (Costa et al., 2006) ไฮโดรคาร์บอน (Santa-Anna et al., 2002; Rashedi et al., 2005) และแหล่งคาร์บอนที่แตกที่เรี่ยนำมาใช้ได้ง่าย เช่น น้ำตาลกลูโคส (Bodour et al., 2003) น้ำตาลแมนนิทอล (De'ziel et al., 1999) หรือกลีเซอรอล (Das et al., 2009) ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด สารตั้งต้นประเภทคาร์บอนเป็นสารที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้รับการรายงานว่ามีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารลดแรงตึงผิว (Panilaitis et al., 2007; Abouseouda et al., 2008) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เครื่อง Mass spectrometry แสดงให้เห็นชัดเจนว่าแหล่งคาร์บอนไม่ได้มีผลต่อปริมาณเท่านั้น แต่ยังมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวด้วย (Perfumo et al., 2006) โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ต่างสกุลกันจะสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่มีโครงสร้างต่างกัน ในทางตรงกันข้ามจุลินทรีย์สายพันธุ์หรือสปีชีส์เดียวกันจะผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามความแตกต่างเพียงเล็กน้อยในโครงสร้างโมเลกุลมีผลกระทบอย่างมากต่อหน้าที่การทำงานและการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Bodour et al., 2003)

ในโลกปัจจุบันสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ปิโตรเลียมและน้ำมันดิบ เป็นสารที่มีความสำคัญอย่างมากต่อประชากรโลก แต่สารดังกล่าวเป็นของเหลวที่เกิดขึ้นใต้เปลือกโลก โดยปิโตรเลียมเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นหลัก มีโมเลกุลของสารหลายชนิดที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ในปิโตรเลียม กระบวนการเกิดปิโตรเลียมนั้นเป็นกระบวนการตามธรรมชาติที่เกิดจากการสลายตัวของอินทรีย์สารจำนวนมากที่

ทับถมกันลึกลงไปในชั้นหินใต้พื้นผิวโลก ซึ่งมีความร้อนและความดันมหาศาล การใช้ประโยชน์จากปิโตรเลียมจำเป็นต้องนำมาผ่านกระบวนการกลั่นได้เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ เช่น ก๊าซหุงต้ม น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล ยางมะตอย รวมทั้งเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ปุ๋ยเคมี ยาปราบศัตรูพืช พลาสติก และยางสังเคราะห์ เป็นต้น (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554) ส่วนน้ำมันดิบ คือ ปิโตรเลียมที่มีสถานะเป็นของเหลวในธรรมชาติ มีลักษณะสีดำหรือน้ำตาล มีกลิ่นคล้ายน้ำมันเชื้อเพลิงสำเร็จรูป มีลักษณะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ปะปนกันอยู่และอาจมีสารอื่น ๆ ประกอบอยู่ด้วย เช่น กำมะถัน คาร์บอน ไฮโดรเจนและไนโตรเจน เป็นต้น คุณสมบัติของน้ำมันดิบจะแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่รวมอยู่ ด้วยเหตุนี้ น้ำมันดิบที่ขุดขึ้นจึงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที ดังนั้นน้ำมันดิบที่ได้จะต้องนำมาแยกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ ออกเป็นกลุ่ม ๆ ก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ตามชนิดได้ โดยวิธีการแยกสารที่ปนอยู่ในน้ำมันดิบออกจากกันนี้เรียกว่าการกลั่นน้ำมันดิบ (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554) และกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบนั้นประกอบด้วยขั้นตอนการกลั่นสำหรับแยกส่วนต่าง ๆ ของน้ำมันปิโตรเลียม ที่ต้องอาศัยสารลดแรงตึงผิวเพื่อทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีมูลค่ามหาศาล (Kister, 1992; Nur Asshifa, 2009) และปัจจุบันมีการศึกษาการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติทั่วไปเช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ แต่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำและย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติเมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Burgos-Díaz et al., 2012)

จากคุณสมบัติดังกล่าวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ปิโตรเลียมและน้ำมันดิบ เนื่องจากต้องมีการขนส่งสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ปิโตรเลียมและน้ำมันดิบทั่วโลก และเกิดการรั่วไหลและหกทั่วโลก โดยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ปิโตรเลียมและน้ำมันดิบ เป็นสารพิษทำให้เกิดการระคายเคืองตามผิวหนัง เป็นผื่นคัน แสบร้อน เกิดแผลและติดเชื้อได้ รวมถึงเมื่อสารพิษซึมเข้าสู่ผิวหนังทำให้เกิดอันตรายอย่างต่อเนื่องในระยะยาว เช่น มะเร็งผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้ถ้าสูดดมกลิ่นของน้ำมันจะทำให้ปอดได้รับสารพิษ เกิดอาการปอดอักเสบ เกิดโรกระบบทางเดินหายใจ การรับสารพิษโดยการดูดซึมทางร่างกายอาจทำให้สารพิษไปสะสมในไตจนเกิดภาวะไตเสื่อมและไตวายได้ และหากได้รับสารพิษเป็นระยะเวลานานและในระยะยาวอาจเกิดอันตรายถึงขั้นสารพิษทำลายระบบประสาทการควบคุมการเคลื่อนไหวทำให้ไม่สามารถทรงตัวและไม่สามารถเดินได้เป็นปกติและอาจรุนแรงถึงขั้นเป็นมะเร็งในที่สุด (สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 16, 2556)

จากช่วงทศวรรษที่ 1930 ถึง 1990 มีงานวิจัยพิสูจน์ให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความสำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันปิโตรเลียม แบคทีเรียจำนวนมากมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานตามธรรมชาติ (Hua et al., 2004; Korda et al., 1997; Rahman et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Chaerun et al., 2004; Ilori et al., 2006) โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวบนผิว และลดแรงตึงผิวระหว่างของแข็งกับของเหลวหรือของเหลวกับของเหลว (Interfacial tension) ที่เกิดจากการรวมของเหลวที่ผสมกันไม่ได้ (Immiscible fluids) หรือของเหลวกับของแข็งซึ่งทำให้เพิ่มพื้นผิวของสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ส่งผลให้เพิ่มการ

เคลื่อนที่และความสามารถในการนำมาใช้โดยจุลินทรีย์หลังจากที่มีการย่อยสลายทางชีวภาพและการเกิด Emulsification (Ron and Rosenberg, 2001; Vasileva-Tonkova and Gesheva, 2007) หน้าที่ทางชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวมีความเกี่ยวข้องกับการดูดซึมสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารที่ถูกผลิตและปล่อยออกมาอย่างอัตโนมัติ ถ้ามีสารตั้งต้นเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Guerra-Santos et al., 1984; Makkar and Cameotra, 1998; Singh et al., 2006) แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* และ *Mycobacterium* (Ilori et al., 2005; Kosaric, 1993) และเป็นที่น่าทึ่งว่าความสามารถของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. aeruginosa* สามารถย่อยสลาย Heavy oil และ Aliphatic hydrocarbons ภายใต้สภาวะที่มีการใช้ออกซิเจนและสามารถหลังสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณสูงขณะเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารไฮโดรคาร์บอนในปริมาณสูง (Hommel, 1990; Chayabutra and Ju, 2000)

จากข้อความที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพและมีประโยชน์หลายประการทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และนำมาศึกษาชนิดและองค์ประกอบทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีที่สุด เพื่อพัฒนาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี สำหรับใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์และเพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ตั้งแต่ในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงระดับเชิงพาณิชย์ต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

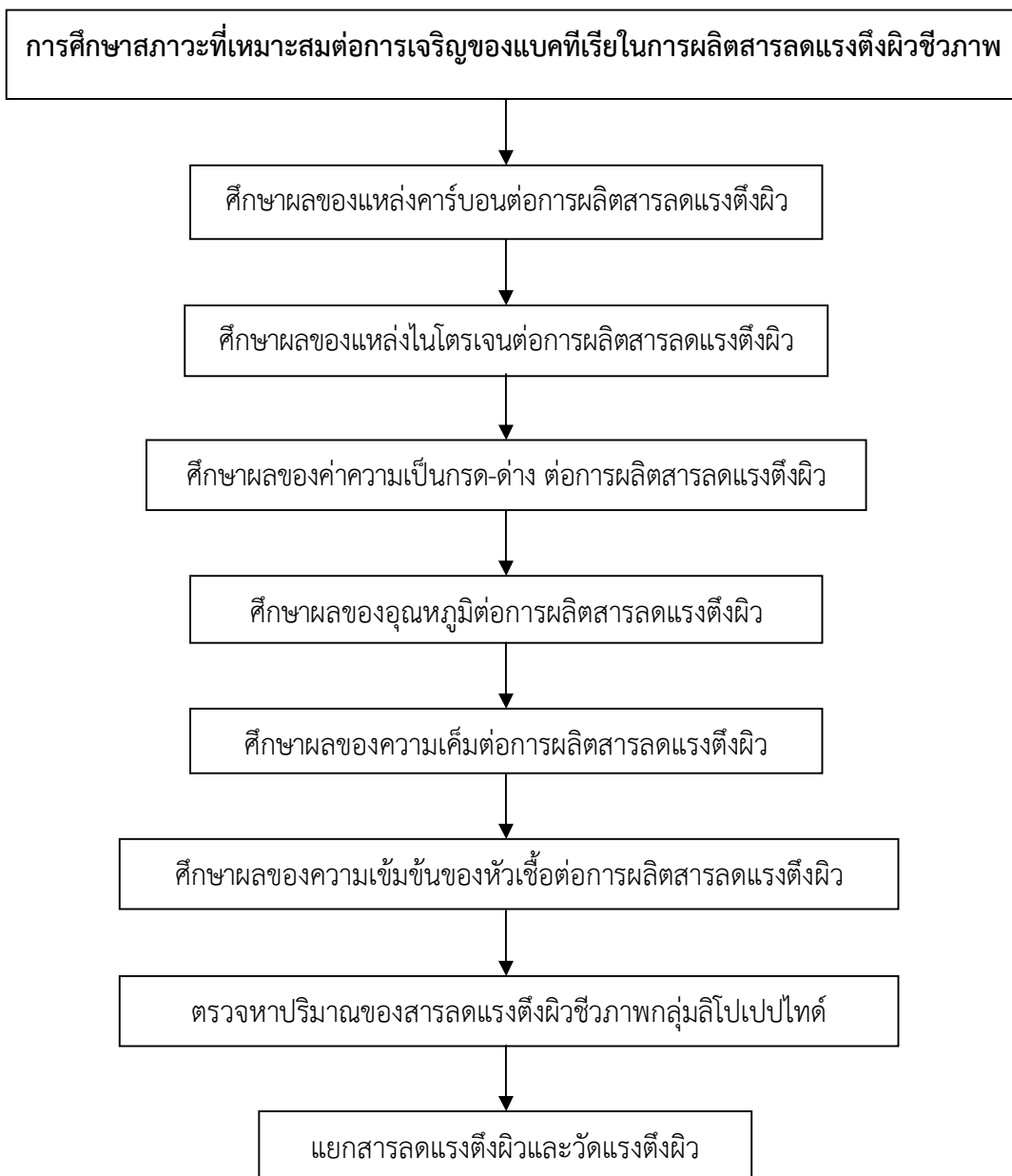
เพื่อพัฒนาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดใหม่จากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและการฟื้นฟูสภาพที่ปนเปื้อนด้วยสารกลุ่มปิโตรเคมี เพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์

### ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยศึกษาถึงผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม และปริมาณหัวเชื้อ ที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย ตรวจสอบปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ แยกสารลดแรงตึงผิวและวัดแรงตึงผิว เพื่อมุ่งเพิ่มศักยภาพในการนำไปผลิตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป



### วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงปัจจัยในการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใน Scale ขนาดเล็ก
2. สามารถทราบถึงปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียชนิดใหม่ นำมาซึ่งการพัฒนาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อทดแทนสารลดแรงตึงผิวที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์

## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

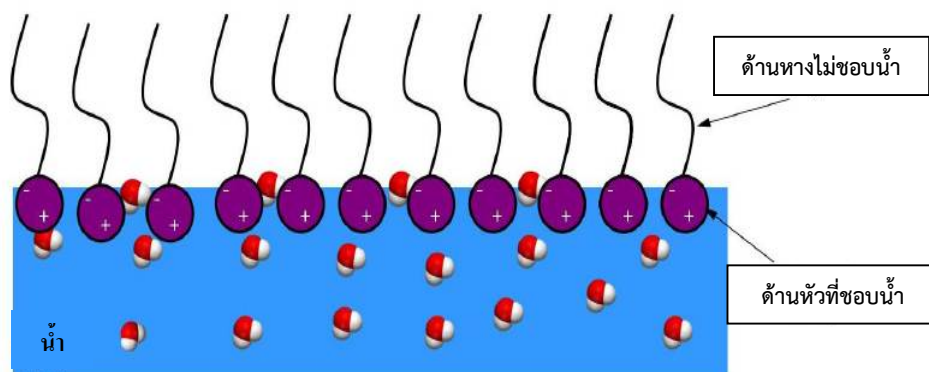
1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
2. วิธีการตรวจสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์
3. วิธีการตรวจสอบการสร้างสารอิมัลซิฟายเออร์
4. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

#### 1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

##### 1.1 ความหมายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactants) หมายถึง สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตออกมาจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น ยีสต์ แบคทีเรียและรา (Priya and Usharani, 2009) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มักจะเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) คือในโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน (Chioma et al., 2013) โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนที่ไม่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น เป็นส่วนที่ไม่สามารถละลายในน้ำได้ เนื่องจากเป็นโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นห่วงโซ่ยาว (Long-chain of fatty acids) กรดไขมันไฮดรอกซิล (Hydroxyl fatty acids) หรือแอลฟา-อัลคิล-เบต้า-กรดไขมันไฮดรอกซิล ( $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy fatty acids) ส่วนด้านปลายที่ชอบน้ำหรือส่วนที่มีขั้วพบว่าเป็นคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วงเปปไทด์ ฟอสเฟต กรดคาร์บอกซิลิกหรือแอลกอฮอล์ (Jaysree et al, 2011)

โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเกิดการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (Micells) เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นอยู่ในตัวทำละลาย เช่น น้ำ โดยสารลดแรงตึงผิวจะหันเอาส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอก และส่วนที่ชอบไขมันไว้ด้านใน ซึ่งทำให้สามารถแสดงคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวของของเหลวหรือลดแรงตึงระหว่างของเหลวสองชนิดหรือระหว่างของเหลวและของแข็งได้ ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวเกิดเป็นไมเซลล์เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดเรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า Critical micelle concentration (CMC)



ภาพที่ 1 ลักษณะของสารลดแรงตึงผิวที่เชื่อมต่อระหว่างของเหลวและอากาศ  
(ดัดแปลงจาก Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

## 1.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ตามน้ำหนักโมเลกุล (Jaysree et al, 2011; Pacwa-Plociniczak et al., 2011) โดยมีรายละเอียดดังนี้

### 1.2.1 สารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

เป็นกลุ่มที่มีพื้นที่ผิวและแรงตึงระหว่างผิวที่ต่ำ มีหน้าที่หลักในการลดแรงตึงผิว (Surface tension) และแรงระหว่างผิว (Interfacial tension) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไกลโคลิปิด (Glycolipids) ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) และลิโปเปปไทด์ (Lipopeptides) เป็นต้น

### 1.2.2 สารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

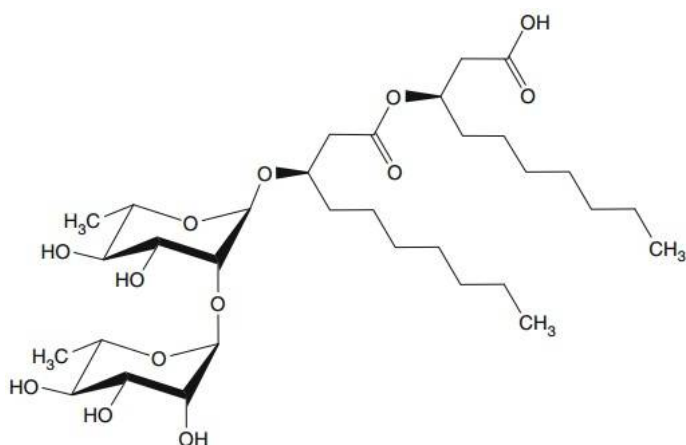
เป็นกลุ่มที่จะเกาะติดแน่นกับพื้นผิว มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับความคงตัวของสารอิมัลชัน ทำให้แบคทีเรียติดอยู่กับพื้นผิวที่เป็นส่วนที่ชอบน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งทำให้สามารถย่อยสลายสารชีวภาพได้ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ พอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) โปรตีน (Proteins) ลิโปพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharides) ลิโปโปรตีน (Lipoproteins) หรือสารประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังกล่าว เป็นต้น

## 1.3 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

### 1.3.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิด

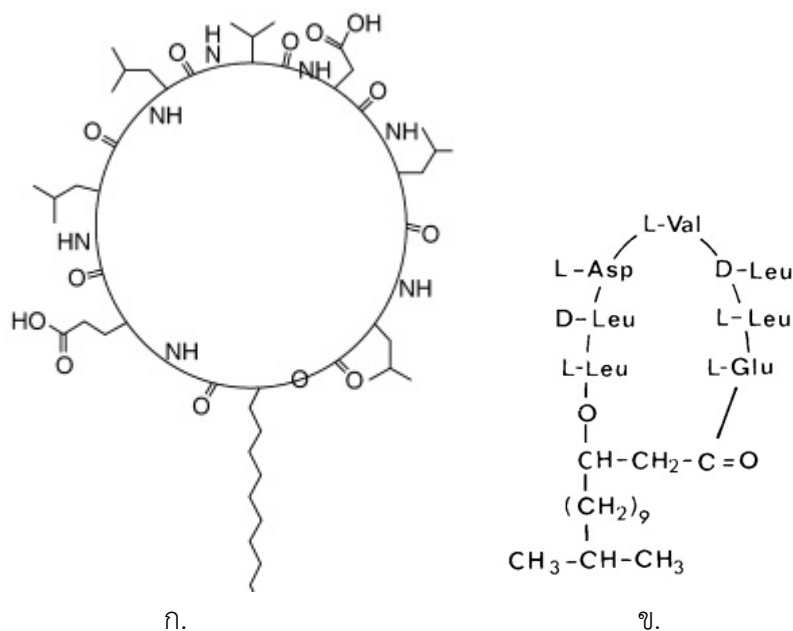
ไกลโคลิปิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่พบมากที่สุดชนิดหนึ่ง ประกอบด้วย โมโน-ได- ไตร- และเตตระแซคคาไรด์ รวมทั้งกลูโคส กาแลคโตส กรดกลูคูโรนิก แรมโนส และกาแลคโตส ซัลเฟต รวมทั้งประกอบด้วยกรดไขมันซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายกับฟอสโฟลิปิดของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งได้เป็นทรีฮาโลสลิปิด (Trehalose lipid) โซโฟโรลิปิด (Sophorolipid) และแรมโนลิปิด (Rhamnolipids) (Shaw, 1970) ตัวอย่างโครงสร้างของแรมโนลิปิด ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิปิด  
(Abdel-Mawgoud et al., 2011)

### 1.3.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์

ลิโปเปปไทด์ ประกอบด้วยส่วนหางที่เป็นกรดไขมันเชื่อมต่อกับโพลีไกลิโคเปปไทด์สายสั้นซึ่งอยู่ในรูปวงกลม (Raaijmakers et al., 2006) โดยพบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตวงลิโปเปปไทด์ (Cyclic lipopeptide) เรียกว่าเซอแฟกติน (Surfactin) หรือซับทิลิซิน (Subtilisin) (Arima et al., 1968; Bernheimer and Avigad, 1970) ซึ่งเซอแฟกตินมีค่า CMC ในน้ำเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้ถึง 27 มิลลินิวตันต่อเมตร (Cooper et al., 1981) โครงสร้างของ Cyclic lipopeptide และ Surfactin ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของวงลิโปเปปไทด์ (ก.) และโครงสร้างของเซอแฟกติน (ข.)  
(Rosenberg and Ron, 1999; Smyth, et al., 2010)

### 1.3.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มฟอสโฟลิปิดและกรดไขมัน

(1) ฟอสโฟลิปิด เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยพบว่าแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรืออีสต์ที่เจริญบนอาหารที่มีแอลเคนเป็นแหล่งของคาร์บอนจะพบปริมาณของฟอสโฟลิปิดเพิ่มขึ้นอย่างมาก ยกตัวอย่างเช่น ในกรณีของแบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. HO1-N ที่เจริญบนเฮกซะเดคเคน (Hexadecane) พบว่าถุงเวสิเคิล (Vesicles) ที่แบคทีเรียปล่อยออกมาออกเซลล์อุดมไปด้วยฟอสโฟลิปิด (Kaeppli and Finnerty, 1979)

(2) กรดไขมัน กรดไขมันที่ได้มาจากแอลเคนได้รับความสนใจอย่างมากในฐานะที่เป็นสารลดแรงตึงผิว Rehm and Rei (1981) ได้อธิบายถึงรายละเอียดของกรดไขมันที่เกิดจากการออกซิเดชันของแอลเคนโดยจุลินทรีย์ สมดุลระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบน้ำของกรดไขมันมีส่วนเกี่ยวข้องกับความยาวของห่วงโซ่ไฮโดรคาร์บอน สำหรับกรดไขมันที่นิยมนำมาเป็นสารลดแรงตึงผิวจะอยู่ในช่วง  $C_{12} - C_{14}$  นอกจากกรดไขมันโซ่ตรง จุลินทรีย์ยังสามารถผลิตกรดไขมันที่มีความซับซ้อนโดยประกอบด้วยไฮดรอกซิลและกิ่งก้านแอลคิล ยกตัวอย่างเช่น โครีโนไมโคลิกแอซิด (Corynomycolic acid) ซึ่งมีศักยภาพในการเป็นสารลดแรงตึงผิว (MacDonald et al., 1981)

#### 1.3.4. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มพอลิเมอร์ริก (Polymeric surfactant)

สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ริกเป็นสารลดแรงตึงผิวที่จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ โปรตีน ลิโปพอลิแซคคาไรด์ หรือลิโปโปรตีน และในบางกรณีพบว่าประกอบด้วยโมเลกุลที่ซับซ้อนของพอลิเมอร์ชีวภาพที่รวมตัวกัน ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตสารในกลุ่มนี้ได้ ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Acinetobacter* (Rosenberg and Ron, 1998)

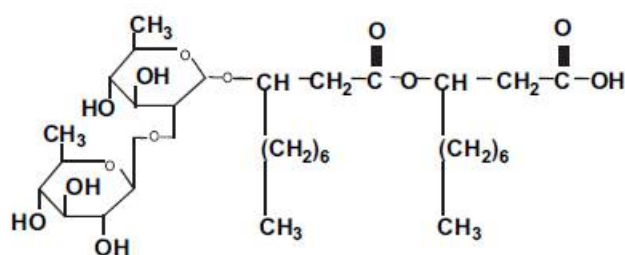
#### 1.3.5 สารลดแรงตึงผิวกลุ่มพาร์ติคูลาท (Particulate surfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพาร์ติคูลาท เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่บรรจุอยู่ในถุงเวสิเคิลที่ห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น *Acinetobacter* sp. H01-N ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฮกซะเดคเคน (Hexadecane) เป็นองค์ประกอบ แบคทีเรีย *Acinetobacter* sp. H01-N จะหลั่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มพาร์ติคูลาทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 20-50 มิลลิเมตร และค่าความหนาแน่นของการลอยตัวเท่ากับ 1.158 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ถุงภายนอกนี้จะมีบทบาทสำคัญในการดูดซึมเฮกซะเดคเคนเข้าไปภายในเซลล์ของ *Acinetobacter* sp. H01-N (Karanth et al., n.d.)

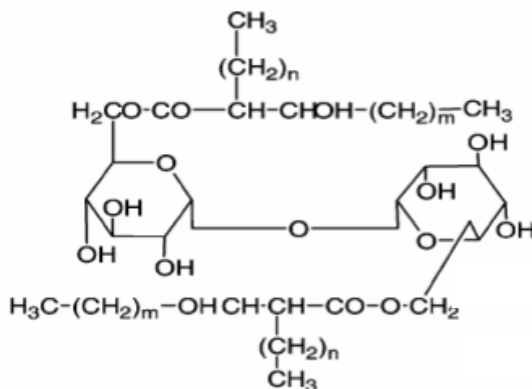
ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดที่สร้างโดยจุลินทรีย์ แสดงดังตารางที่ 1 และภาพที่ 4-8

ตารางที่ 1 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Pacwa-Plociniczak et al., 2011)

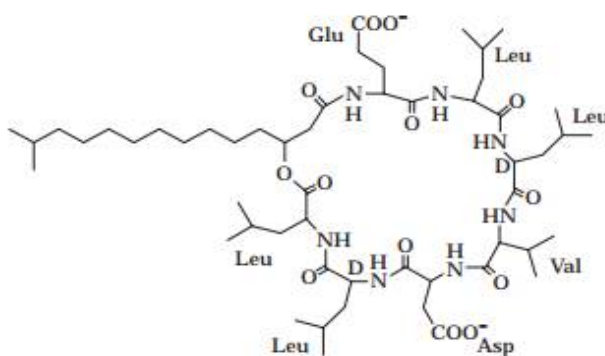
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ		จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต
กลุ่ม	ชนิด	
ไกลโคลิปิด	แรมโนลิปิด (Rhamnolipid)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
	ทรีฮาโลสลิปิด (Trehalolipid)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.
	โซโฟโรลิปิด (Sophorolipid)	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis apicola</i>
กรดไขมัน ฟอสโฟลิปิด และ นิวทรัลลิปิด	โครีโนไมโคลิก แอซิด (Corynomycolic acid)	<i>Corynebacterium lepus</i>
	สไปคูลิสปอริก แอซิด (Spiculisporic acid)	<i>Penicillium spiculisporum</i>
	ฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (Phosphatidylethanolamine)	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i>
ลิโปเปปไทด์	เซอแฟกติน (Surfactin)	<i>Bacillus subtilis</i>
	ไลเคนไนซิน (Lichenysin)	<i>Bacillus licheniformis</i>
สารลดแรงตึงผิว ชีวภาพ ชนิดพอลิเมอร์ริก	อิมัลแซน (Emulsan)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	อะลาแซน (Alasan)	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53
	ไบโอดีสเพิซแซน (Biodispersan)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2
	ไลโปแซน (Liposan)	<i>Candida lipolytica</i>
	แมนโนโปรตีน (Mannoprotein)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>



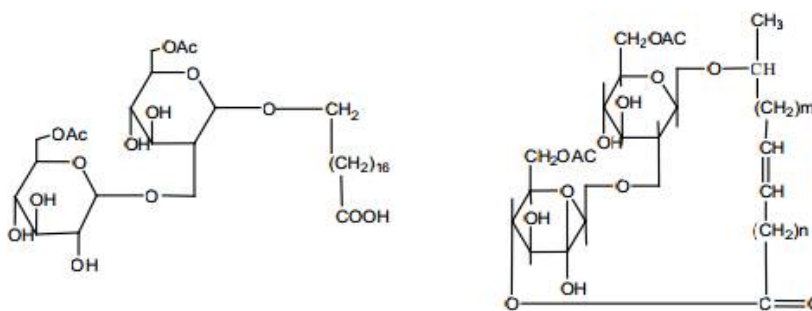
ภาพที่ 4 โครงสร้างของแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* (Mulligan, 2005)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของทรีฮาโลสลิปิด  
(Chakrabarti, n.d)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของเซอแฟกตินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*  
(Vollenbroich et al., 1997)

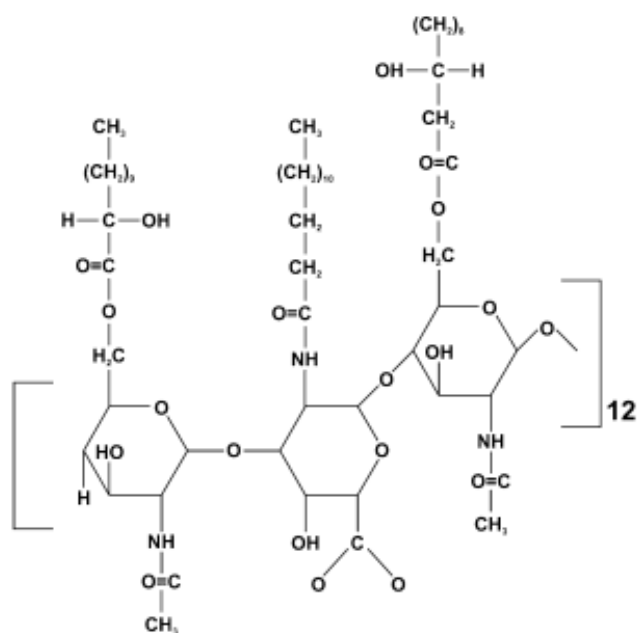


**Sophorolipid (GL-A)**

**Sophorolipid lactone**

ภาพที่ 7 โครงสร้างของไซโฟโรลิปิด  
(Bhardwaj et al., 2013)





ภาพที่ 8 โครงสร้างของอิมัลชัน

(Edwards et al., 2003)

## 2. การตรวจสอบการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์

### 2.1 วิธีการตรวจสอบการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 2.1.1 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Blood hemolysis test)

การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เป็นการคัดกรองแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น (Schulz et al., 1991; Plaza et al., 2006; Youssef et al., 2004) โดยสารลดแรงตึงผิวจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดเกิดการแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ส่งผลให้สารละลายภายนอกเซลล์มีความดันออสโมติกต่ำกว่าความดันออสโมติกในเซลล์เรียกว่า ไฮโปโทนิก (Hypotonic) ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (Noudeh et al., 2010) ซึ่งทำให้สามารถใช้ในการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงการคัดกรองแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้จะเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ  $\beta$ -hemolysis

#### 2.1.2 Oil displacement test

Oil displacement test เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน ซึ่งเป็นวิธีการคัดกรองที่มีประสิทธิภาพ น่าเชื่อถือ สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว รวมทั้งสามารถบอกปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ (Youssef et al., 2004) วิธีการนี้ทำได้โดยนำน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร เติมน้ำมันในจานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร เติมน้ำมัน 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวของน้ำ จากนั้นเติมน้ำมันใสของเซลล์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวของน้ำมัน ทิ้งไว้ 30 วินาที (Jaysree et al., 2011) ถ้าส่วนใสของเซลล์มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้

น้ำมันจะกระจายตัวออกและเกิดเป็นโซนใส เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า Oil displacement activity (Morikawa et al., 2000)

### 2.1.3 Drop collapsing test

Drop collapsing test เป็นวิธีการทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย และได้ผลดีในการตรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หลักการของวิธีการทดสอบนี้อาศัยการคงตัวของของเหลวบนพื้นผิวของโมเลกุลที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น น้ำมัน เมื่อหยดน้ำลงบนผิวของน้ำมัน น้ำจะยังคงเป็นหยดอยู่เช่นเดิม เนื่องจากน้ำซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจะมีความคงตัวของน้ำบนพื้นผิวของน้ำมัน ในขณะที่สารหรือของเหลวที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้ เมื่อหยดลงบนผิวหน้าของน้ำมัน หยดของสารหรือของเหลวเหล่านี้จะแผ่ออกหรือยุบตัวเนื่องจากแรงตึงผิวระหว่างสารหรือของเหลวกับน้ำมันนั้นลดลง (Saravanan and Vijayakumar, 2012) วิธีการนี้ทำได้โดยนำน้ำมันปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนำส่วนของเซลล์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ที่มีสารไฮโดรคาร์บอนอยู่แล้ว ทิ้งไว้ 1 นาที หลังจากนั้นดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น สังเกตเห็นว่าหยดของส่วนของเซลล์ที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะมีลักษณะยุบตัวลงหรือแผ่กระจาย ส่วนส่วนของเซลล์ที่ไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (Nur Asshifa et al., 2012)

### 2.1.4 Tilting glass slide test

Tilting glass slide test เป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพในการคัดกรองจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งอาศัยการคงตัวของของเหลวบนพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ เช่น สไลด์ เนื่องจากน้ำซึ่งมีขั้วจะมีความคงตัวของน้ำบนพื้นผิวดังกล่าวและยังคงเป็นหยดอยู่เช่นเดิม เมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียที่มีศักยภาพผลิตสารลดแรงตึงผิวซึ่งคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้ ซึ่งเมื่อนำโคโลนีของแบคทีเรียดังกล่าวมาเกลี่ยลงบนหยดของ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ แล้วเอียงสไลด์หยดของ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมจะไหลไปอีกด้านของสไลด์ เนื่องจากแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับน้ำมันนั้นลดลง (Persson and Molin, 1987)

## 2.2 การตรวจสอบถึงชนิดของสารลดแรงตึงผิว

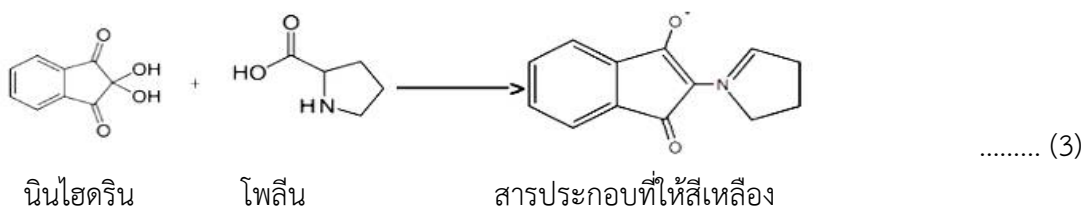
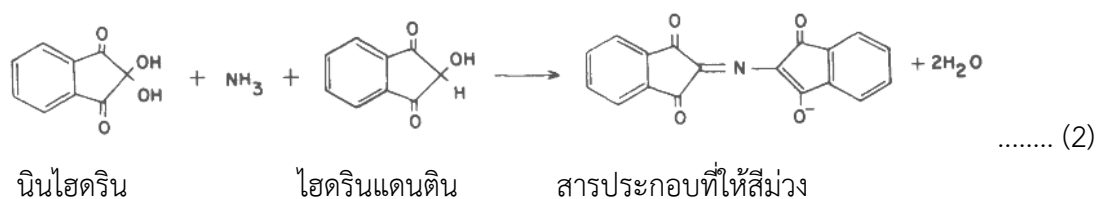
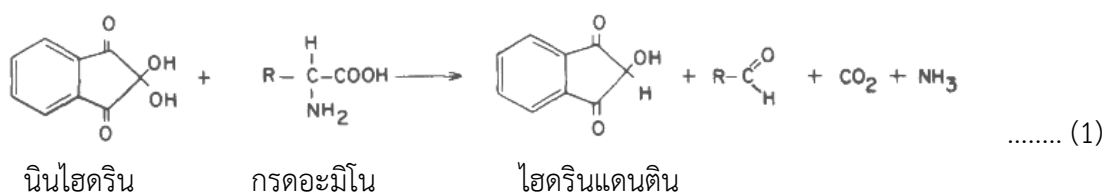
### 2.2.1 Blue agar method เพื่อตรวจหาสารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคลิปิดและสารลดแรงตึงผิวประจุลบกลุ่มอื่น

Blue agar method เป็นการทดสอบถึงปริมาณวิเคราะห์ในการตรวจหาสารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคลิปิด และสารลดแรงตึงผิวประจุลบกลุ่มอื่น ๆ โดยใช้ CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) – Methylene blue agar plate ในการทดสอบซึ่งประกอบด้วย CTAB-Methylene blue และ Mineral salt medium ซึ่งอาศัยคุณสมบัติการมีประจุของสารลดแรงตึงผิว ในการทดสอบ โดยไอออนลบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิด และสารลดแรงตึงผิวประจุลบกลุ่มอื่น ๆ จะจับคู่กับไอออนบวกของ Methylene blue และ CTAB เป็นไอออนเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Siegmond and Wagner, 1991) Blue agar method เป็นวิธีการทดสอบที่สะดวกแต่เป็นการ

ทดสอบที่จำเพาะกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประจุลบ ซึ่งถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดกรองที่หลากหลาย (Tuleva et al., 2005; Christova et al., 2004; Gunther et al., 2005; Tuleva et al., 2002; Tahzibi et al., 2004) แต่ข้อเสียคือ CTAB เป็นอันตรายและยับยั้งการเจริญในจุลินทรีย์บางชนิด Siegmund and Wagner (1991) ได้แนะนำให้ใช้สารลดแรงตึงผิวประจุบวกชนิดอื่นแทน CTAB

### 2.2.2 ปฏิกิริยานินไฮดริน (Ninhydrin reaction) เพื่อตรวจหาสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide)

ปฏิกิริยานินไฮดรินใช้สำหรับการทดสอบสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนภายในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์จะเกิดปฏิกิริยากับนินไฮดริน แบ่งออกเป็น 2 ปฏิกิริยา ได้แก่ ปฏิกิริยาแรกกรดอะมิโนจะทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินได้สารประกอบไฮดรินแดนติน (Hydrindantin) อัลดีไฮด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนียขึ้น (สมการ 1) ปฏิกิริยาที่ 2 นินไฮดรินและไฮดรินแดนตินทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียจนได้สารประกอบที่ให้สีน้ำเงินม่วง (สมการ 2) ส่วนโพรินหรือไฮดรอกซีโพลินเมื่อทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินจะให้สารประกอบที่มีสีเหลือง (สมการ 3) (Bottom et al., 2010)



ภาพที่ 9 ปฏิกิริยานินไฮดริน  
(Bottom et al., 2010)

### 3. วิธีการตรวจสอบการสร้างสารอิมัลซิฟายเออร์โดยวิธี Emulsifying capacity ( $E_{24}$ )

Emulsifying capacity ( $E_{24}$ ) เป็นวิธีการทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ วิธีการนี้ทำได้โดยนำสารไฮโดรคาร์บอนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และส่วนใสของเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่นผสม (Vortex) เป็นระยะเวลา 2 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดความสูงของชั้นอิมัลชันและความสูงของชั้นสารละลายทั้งหมดเพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์  $E_{24}$  ดังสมการต่อไปนี้ (Cooper and Goldenberg, 1987; Jaysree et al., 2011)

$$\%E_{24} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของชั้นสารละลายทั้งหมด}} \times 100$$

### 4. การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนอกจากจะมีคุณสมบัติทั่วไปเช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์แล้ว สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีความเป็นพิษต่ำกว่าและย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (Burgos-Díaz et al., 2012) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกันอย่างแพร่หลายในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อมและด้านปิโตรเลียม (Fakruddin, 2012; Gharaei-Fathabad, 2011) โดยมีรายละเอียดดังนี้

#### 4.1 ด้านอุตสาหกรรมอาหาร

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกนำมาใช้สำหรับการแปรรูปผลิตอาหารต่าง ๆ หลากหลายชนิด โดยใช้เป็นส่วนประกอบที่เติมลงในสูตรอาหาร โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะส่งเสริมการสร้างและการรักษาเสถียรภาพของอิมัลชัน เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการลดพื้นผิวสัมผัสและความตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกใช้เป็นสารต้านการยึดเกาะของไบโอฟิล์มที่มีอยู่ในพื้นที่อุตสาหกรรมอาหารที่เป็นแหล่งของการปนเปื้อนซึ่งอาจนำไปสู่การเน่าเสียของอาหารและการส่งผ่านของเชื้อโรค (Okoliegbe and Agarry, 2012)

#### 4.2 ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติเฉพาะที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมการดูแลสุขภาพและเครื่องสำอาง โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน สารที่ทำให้เกิดฟอง สารช่วยละลาย สารที่ทำให้เปียกชื้น เป็นน้ำยาทำความสะอาด เป็นยาต้านจุลชีพ สารชักนำการทำงานของเอนไซม์ สารไล่แมลง ยาลดกรด ผลิตภัณฑ์อาบน้ำ แผ่นป้องกันผิว ผลิตภัณฑ์

ป้องกันรังแค ผลิตภัณฑ์สำหรับเด็ก มาสคาร่า ลิปสติก ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปากและยาสระผม เป็นต้น (Gharaei-Fathabad, 2011)

#### 4.3 ด้านการแพทย์

การประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านการแพทย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา โดยมีการศึกษาและนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส อีกทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถนำมาใช้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เป็นสารต้านการยึดเกาะกับเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นสารเสริมฤทธิ์ (Adjuvants) ของระบบภูมิคุ้มกันและเป็นสารส่งมอบยีน เป็นต้น (Rodrigues et al., 2006; Okoliegbe and Agarry, 2012; Fakruddin, 2012)

#### 4.4 ด้านสิ่งแวดล้อม

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการทำให้สารไฮโดรคาร์บอนประเภทต่าง ๆ เช่น น้ำมันเบนซิน น้ำมันดีเซล เกิดการรวมตัวกับน้ำได้ดียิ่งขึ้นจากปกติที่ไม่สามารถเข้ากันได้กับน้ำ ซึ่งจากคุณสมบัติข้อนี้ทำให้การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปช่วยในการย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอนที่มีการปนเปื้อนหรือรั่วไหลในพื้นที่ต่าง ๆ ทั้งในดิน น้ำจืด และน้ำทะเล (Rodrigues et al., 2006)

#### 4.5 ปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียม

ปิโตรเลียม เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นหลัก โดยมีโมเลกุลของสารหลายชนิดที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ภายในปิโตรเลียม กระบวนการเกิดปิโตรเลียมนั้นเป็นกระบวนการตามธรรมชาติที่เกิดจากการสลายตัวของอินทรีย์สารจำนวนมากที่ทับถมกันลึกลงไปใต้พื้นผิวโลก ซึ่งมีความร้อนและความดันมหาศาล การใช้ประโยชน์จากปิโตรเลียมจำเป็นต้องนำมาผ่านกระบวนการกลั่นได้เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ เช่น ก๊าซหุงต้ม น้ำมันเบนซิน น้ำมันก๊าด น้ำมันดีเซล น้ำมันเตา ยางมะตอย รวมทั้งเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ปุ๋ยเคมี ยาปราบศัตรูพืช พลาสติกและยางสังเคราะห์ เป็นต้น (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554)

##### (1) น้ำมันดิบ

น้ำมันดิบ คือ ปิโตรเลียมที่มีสถานะเป็นของเหลวในธรรมชาติ มีลักษณะสีดำหรือน้ำตาล มีกลิ่นคล้ายน้ำมันเชื้อเพลิงสำเร็จรูป มีลักษณะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ปะปนกันอยู่และอาจมีสารอื่น ๆ ประกอบอยู่ด้วยเช่น กำมะถัน (S), คาร์บอน (C), ไฮโดรเจน (H) และไนโตรเจน (N) เป็นต้น คุณสมบัติของน้ำมันดิบจะแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่รวมอยู่ ด้วยเหตุนี้ น้ำมันดิบที่ขุดขึ้นจึงไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที ดังนั้นน้ำมันดิบที่ได้จะต้องนำมาแยกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ ออกเป็นกลุ่ม ๆ ก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ตามชนิดได้โดยวิธีการแยกสารที่ปนอยู่ในน้ำมันดิบออกจากกันนี้ เรียกว่า การกลั่นน้ำมันดิบ (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554)

## (2) น้ำมันดีเซล

น้ำมันดีเซล (Diesel fuel) คือ น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล เป็นส่วนหนึ่งของผลิตภัณฑ์น้ำมันดิบที่ได้จากการกลั่นปิโตรเลียม ซึ่งเป็นน้ำมันที่เรียกว่าน้ำมันใสหรือ Distillate fuel มีช่วงจุดเดือดประมาณ 180-370 องศาเซลเซียส น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งเป็นเครื่องยนต์แรงอัดสูง (High compression) และจุดระเบิดเอง (Self ignition engine) ซึ่งการจุดระเบิดของเชื้อเพลิงเกิดขึ้นจากความร้อนจากแรงอัดสูงของอากาศในกระบอกสูบโดยไม่ต้องใช้หัวเทียน น้ำมันดีเซลที่มีจำหน่ายในปัจจุบันนี้ แบ่งออกได้ 2 ประเภท คือ

(2.1) น้ำมันดีเซลหมุนเร็ว (HSD; High speed diesel oil) ซึ่งเป็นน้ำมันดีเซลสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลรอบหมุนเร็วที่ใช้กับยานยนต์ (Automotive diesel oil หรือ Gas oil) เช่น รถยนต์ รถบรรทุก เรือประมง เรือโดยสาร รถแทรกเตอร์และเครื่องจักรกลหนักทุกชนิดที่มีรอบหมุนเร็วเกิน 1,000 รอบต่อนาที เครื่องยนต์ประเภทนี้ จำเป็นต้องใช้น้ำมันที่มีค่าซีเทนสูงและมีการระเหยเร็ว โดยน้ำมันดีเซลหมุนเร็วนี้ที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อของน้ำมันโซล่าและหากใช้กับเรือเดินสมุทรจะเรียกว่า Marine gas oil

(2.2) น้ำมันดีเซลหมุนช้า (LSD; Low speed diesel oil) ซึ่งเป็นน้ำมันดีเซลสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลรอบหมุนปานกลางหรือหมุนช้า (Industrial diesel oil) เช่น เครื่องยนต์ดีเซลขับเคลื่อนกำลัง ติดตั้งอยู่กับที่ตามโรงงานต่าง ๆ ซึ่งมีรอบการทำงานต่ำ ประมาณ 500-1,000 รอบต่อนาที เครื่องยนต์ประเภทนี้ไม่ต้องการน้ำมันดีเซลที่มีค่าซีเทนสูงมากนัก และการระเหยอาจช้ากว่าได้ ซึ่งในตลาดเป็นที่รู้จักกันว่า น้ำมันซีโล่ หากใช้กับเรือเดินสมุทรจะเรียกว่า Marine diesel oil (ประเสริฐ เทียนนิมิต และคณะ, 2554)

## (3) น้ำมันเบนซิน

น้ำมันเบนซิน เป็นน้ำมันที่ได้จากการปรุงแต่งคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการกลั่นน้ำมันโดยตรง และอาจได้จากการแยกก๊าซธรรมชาติเหลวหรือแก๊สโซลีนธรรมชาติ น้ำมันเบนซินจะผสมสารเพิ่มคุณภาพเพื่อให้เหมาะกับการใช้งาน เช่น สารเพิ่มค่าออกเทน สารต้านการรวมตัวกับอากาศ สารเคมีสำหรับป้องกันสนิม ป้องกันการกัดกร่อนในถังน้ำมันและท่อทางน้ำมัน รวมทั้งสารเคมีที่ช่วยทำความสะอาดคาร์บูเรเตอร์ จึงเหมาะที่จะใช้กับยานพาหนะ เช่น รถยนต์ รถจักรยานยนต์ หรือเครื่องยนต์ทั่วไป เช่น เครื่องสูบน้ำ เครื่องปั่นไฟขนาดเล็ก

## (4) น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์

น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ (Lubricating oil) เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทหนึ่งที่ได้จากการกลั่นปิโตรเลียม ทำหน้าที่หล่อลื่นอยู่ระหว่างผิวโลหะที่เสียดสีกันเพื่อลดความฝืด และลดการสึกหรอของชิ้นส่วนของเครื่องยนต์และเครื่องจักรกลที่มีลักษณะปิด น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์มีองค์ประกอบของคาร์บอนในโมเลกุลตั้งแต่ C<sub>18</sub>-C<sub>25</sub> อยู่หลายชนิด โดยองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นมี Aliphatic รวมทั้ง Alkanes และ Cycloalkanes อยู่ร้อยละ 73 - 80 ของน้ำหนักทั้งหมด มี Monoaromatic hydrocarbons อยู่ประมาณร้อยละ 11-15 ของน้ำหนักทั้งหมด มี Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) อยู่ประมาณร้อยละ 2-5 และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีขั้ว (Polar fraction) อยู่ประมาณ

ร้อยละ 4 - 8 โดยส่วนที่มีขั้วนี้เกิดจาก Aromatic compounds ซึ่งมีซัลเฟอร์ไนโตรเจนหรือออกซิเจนประกอบอยู่ (จิตติมา แก้วเรือง, 2551)

## 5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Youssef et al. (2004) ได้ทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือของวิธีที่ใช้สำหรับตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์จำนวน 3 วิธี ได้แก่ Drop collapsing test, Oil displacement test และ Hemolysis โดยนำแบคทีเรียจำนวน 205 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากสิ่งแวดล้อมที่มีสายวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน มาทำการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการทดสอบทั้ง 3 วิธีดังกล่าว ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าวิธีที่ใช้ทดสอบ 3 วิธีข้างต้นให้ผลการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจำนวน 205 สายพันธุ์ชัดเจน โดยพบว่าแบคทีเรีย 16 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ผลบวกในการทดสอบ ด้วยวิธี Hemolysis แต่ให้ผลลบในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับอีก 2 วิธี และ 38 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง แต่ให้ผลบวกสำหรับการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยอีก 2 วิธี จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการทดสอบด้วยวิธี Oil displacement test สามารถคาดการณ์การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีกว่าวิธี Drop collapsing test และ Hemolysis ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความเชื่อถือต่ำในการตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Abouseouda et al. (2008) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพโดย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ Migula 1895-DSMZ โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกันเพื่อเพิ่มผลผลิตในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการศึกษาพบว่า การใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรดเป็นแหล่งไนโตรเจน ร่วมกับการใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 มีความเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *P. fluorescens* สายพันธุ์ Migula 1895-DSMZ โดยการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเกี่ยวข้องกับการเจริญของแบคทีเรียและจลนศาสตร์ของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้สามารถลดแรงตึงผิวลงได้ต่ำกว่า 32 ดายน์ต่อเซนติเมตร และมีค่าดัชนี  $E_{24}$  เท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 36-48 ชั่วโมง และจากการตรวจสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ตกตะกอนด้วยอะซิโตน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แบคทีเรียดังกล่าวผลิตได้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด โดยผลการทดสอบจากการให้ผลบวกกับ Rhamnose assay นอกจากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้ยังแสดงคุณสมบัติเป็นสารที่เกิดฟองและเป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ชีวภาพ รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความเค็มเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรด - ด่างที่กว้าง

Cheng et al. (2008) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งแยกได้จากบริเวณพื้นที่สามเหลี่ยมปากแม่น้ำเหลืองที่ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนน้ำมัน ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ L1, L2 และ L3 โดยใช้การวัด Emulsification activity (EA) และ Emulsification stability (ES) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้

ค่า EA และ ES ที่ดีกว่าอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด (SDS และ Triton X-100) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Li et al. (2008) ได้ศึกษาโครงสร้างและลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ KO9 ที่คัดแยกจากดินใน Karamay oil filed ประเทศจีน ที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากสายพันธุ์นี้สามารถลดแรงตึงผิวได้ถึง 28 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีค่า  $E_{24}$  สูงเท่ากับ 81 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า Critical micelle concentration (CMC) ประมาณ 85.82 มิลลิกรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกอบแห้งเป็นผงสีเหลืองอ่อนและปริมาณผลผลิตที่ได้คือ 1.0866 กรัมต่อลิตร และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าองค์ประกอบหลักเป็นไกลโคไลปิดที่ประกอบด้วยไขมันและคาร์โบไฮเดรต ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหยาบมีความเสถียรค่อนข้างสูงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้างและที่ความเข้มข้นของเกลือสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางการค้าที่ใช้ทดสอบครั้งนี้ คือ SDS และ CTAB ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* สายพันธุ์ KO9 น่าจะมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรม

Nasr et al. (2009) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินที่มีการปนเปื้อนและดินที่ไม่มีการปนเปื้อนด้วยปิโตรเลียม โดยทำการตรวจคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธี Hemolysis, Oil displacement test และ Drop collapsing test แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทำให้ผลบวกอย่างน้อยหนึ่งในสามของวิธีที่ใช้ทดสอบทั้งหมด จะนำไปทำการวัดค่าแรงตึงผิวและทดสอบ Emulsification capacity จากผลการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยสามารถลดแรงตึงผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นอิมัลชันที่มีความเสถียร ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA จัดจำแนกได้เป็น *B. subtilis* และ *B. cereus*

Priya and Usharani (2009) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน 4 แหล่งในเมือง Mayiladuthurai จังหวัดทมิฬนาฑู ประเทศอินเดีย ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Oil displacement test และ Emulsification stability พบว่าจากการศึกษาโดยน้ำมันพืช น้ำมันก๊าด น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* ได้ถูกนำมาจำแนกชนิดโดยใช้วิธี Thin layer chromatography (TLC) จากการศึกษาเมื่อใช้น้ำมันทั้ง 4 ชนิด พบว่าน้ำมันดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้งใน *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *P. aeruginosa* มีกิจกรรมสูงกว่า *B. subtilis*

Arutchelvi and Doble (2010) ได้ทำการศึกษาลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไกลโคไลปิดที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* CPCL ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่ง *P. aeruginosa* CPCL (GenBank accession number GQ241355) เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดได้ โดยจากการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายกรด พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 เหลือเท่ากับ 44 มิลลินิวตันต่อเมตร และมี CMC เท่ากับ  $11.27 \pm 1.85$  มิลลิกรัมต่อ



ลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก ราสาย และแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ  $\leq 30 \leq 50$  และ  $\leq 125$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยไม่มีความเป็นพิษรุนแรงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง ( $HC_{50} = 38 \pm 8.22$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีไฮดรอกซิล ฟูนิลไฮดรอกซิล เอสเทอร์และพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งจากการวิเคราะห์ชนิดของสารลดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Liquid chromatography และ Mass spectrometry ร่วมกับ Electrospray ionization พบว่ามี Rhamnolipid ถึง 19 ชนิด ที่มีกรดไขมันอิ่มตัว และความยาวของสายที่แตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพกับ Phytopathogens (*Fusarium proliferatum* สายพันธุ์ NCIM 1105 และ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ NCIM 596) และไม่เหมาะสมสำหรับการใช้งานทางการแพทย์

Thavasi et al. (2010) ได้ทำการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียทางทะเลที่คัดแยกได้จากท่าเรือ Tuticorin ประเทศอินเดีย โดยทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง Bacterial Adherence To Hydrocarbons (BATH) การเกิดอิมัลชันกับน้ำมันดิบ และการทดสอบ Drop collapse test จากผลการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* และ *Pseudomonas aeruginosa* และจากการศึกษาศักยภาพในผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการทดสอบพบว่า น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและกากน้ำมันถั่วลิสงเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและเหมาะสมต่อการใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. megaterium*, *C. kutscheri* และ *P. aeruginosa* พบว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิด (Glycolipid) ไกลโคลิโปเปปไทด์ (Glycolipopeptide) และลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide) ตามลำดับ

Aparna et al. (2011) ได้ศึกษาจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนด้วยสารไฮโดรคาร์บอน เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการย่อยสลายน้ำมันดิบ ซึ่งจากแบคทีเรียทั้งหมด 16 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรีย 2B เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและย่อยสลายสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ *Pseudomonas* sp. จากการวิเคราะห์ของลำดับเบส 16S rRNA และลักษณะทางชีวเคมี อีกทั้งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระหว่างการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำมันดิบ ซึ่งประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้เท่ากับ 27 มิลลินิวตันต่อเมตร และจัดเป็นอิมัลชันที่มีความเสถียรภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ Basal salt medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันดิบ 1% สามารถเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบ จากผลการศึกษาสามารถบ่งชี้ได้ว่า *Pseudomonas* sp. สามารถใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอนได้และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกผลิตโดยแบคทีเรียชนิดนี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพได้

Jaysree et al. (2011) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนและน้ำที่ไม่มีการปนเปื้อน และได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้วิธีมาตรฐาน 2 วิธี คือ Oil displacement test และ Emulsification capacity ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจัดจำแนกได้เป็น *B. subtilis* และ *B. cereus* ซึ่งถูกคัดแยกได้จากน้ำและดิน ตามลำดับ ซึ่งจากการทดสอบศักยภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด โดยใช้น้ำมันดีเซลและเครื่องยนต์ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. subtilis* จะมีค่า %E<sub>24</sub> สำหรับน้ำมันดีเซลและเครื่องยนต์เท่ากับ 20% และ 15% ตามลำดับ และ *B. cereus* มีค่า %E<sub>24</sub> สำหรับน้ำมันดีเซลและเครื่องยนต์เท่ากับ 30% และ 20% ตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า *B. subtilis* และ *B. cereus* มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาการย่อยสลายน้ำมันต่อไปได้

Nur Asshifa et al. (2012) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการกลั่นน้ำมันดิบ โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* USM-AR2 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ Batch ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งให้ชีวมวลเท่ากับ 9.4 กรัมต่อลิตร และให้สารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด ความเข้มข้น 2.4 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (แรมโนลิปิด) ถูกตรวจพบด้วยวิธี Orcinol, Emulsification capacity และ Drop collapsing test จากการศึกษาการปรับสภาพ (Pretreatment) น้ำมันดิบ TK-1 และ AG-2 ด้วยแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* USM-AR2 ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการกลั่นน้ำมันโดยลดระยะเวลาแต่ไม่ลดคุณภาพของน้ำมันปิโตรเลียมที่กลั่นได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการลดระยะเวลาของกระบวนการกลั่นน้ำมันอย่างน้อย 2 ถึง 3 เท่า อีกทั้งยังพบว่าองค์ประกอบของน้ำมันดิบที่กลั่นจากแบบที่มีการปรับสภาพไม่แตกต่างจากองค์ประกอบในน้ำมันดิบที่ได้จากกระบวนการกลั่นแบบไม่ปรับสภาพจากการวิเคราะห์โดยเครื่อง Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) นอกจากนั้นจากการทดสอบด้วยวิธี Calorimetric แสดงให้เห็นว่าค่าพลังงานของน้ำมันที่กลั่นจากกระบวนการกลั่นแบบการปรับสภาพและที่ไม่ปรับสภาพมีค่าเท่ากัน ผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าคุณภาพของน้ำมันที่กลั่นได้ไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพจากการปรับสภาพ และแรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* USM-AR2 เป็นปัจจัยหลักในการเพิ่มประสิทธิภาพในการกลั่นน้ำมันดิบ

Nadhem (2012) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ NH22 ที่คัดแยกได้จากไรโซสเฟียร์ (Rhizosphere) ของดินในสวน ซึ่งพบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์ NH22 เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลชันที่ดี โดยการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารอิมัลชันกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าสารอิมัลชันที่แบคทีเรียดังกล่าวผลิตได้ประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดโมโนแรมโนลิปิด และไดแรมโนลิปิด ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.82 และ 0.32 ตามลำดับ จากการศึกษาประสิทธิภาพของแรมโนลิปิดในการต้านเชื้อรา โดยการวัดเปอร์เซ็นต์การลดลงของรัศมีของเชื้อรา น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (Laccase) ของเชื้อรา ซึ่งผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ามี การลดลงของรัศมีการเจริญของเชื้อราสูงสุด 76 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักสดและแห้งลดลงเมื่อได้รับแรมโนลิปิดที่ระดับ

ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งพบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมีค่าสูงสุดเหลือเพียง 0.921 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอีก 21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของแรมโนลิปิด เป็น 1,500 ไมโครกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาซึ่งพบว่าค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มีค่าประมาณ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถลดแรงตึงผิวได้ถึง 34 มิลลินิวตันต่อเมตร

Onwosi and Odibo (2012) ทำการศึกษาศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด โดย *Pseudomonas nitroreducens* ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม โดยทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ Mineral salt medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับการทดสอบ รวมทั้งทำการศึกษาค้นคว้าถึงคุณสมบัติที่เรียกว่า การลดแรงตึงผิว (Tensio-active) และค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวที่แบคทีเรียผลิตขึ้น จากการศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เอื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดได้ดีที่สุดคือ น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 5.28 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไนเตรดความเข้มข้นเท่ากับ 4.38 กรัมต่อลิตร โดยที่อัตราส่วนของน้ำตาลกลูโคสและโซเดียมไนเตรดเท่ากับ 22 สามารถทำให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดได้สูงสุดเท่ากับ 5.46 กรัมต่อลิตร และสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงเหลือประมาณ 37 มิลลินิวตันต่อเมตร รวมทั้งสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดมีค่า CMC ประมาณ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจากรายงานการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดที่ผลิตจาก *P. nitroreducens* สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพต่าง ๆ ยกตัวอย่าง เช่น เพื่อทำให้การได้น้ำมันดิบกลับคืนมาเพิ่มขึ้นและเพิ่มการย่อยสลายน้ำมันปิโตรเลียม

Saravanan and Vijayakumar (2012) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน โดยใช้วิธี Hemolysis, Drop collapsing test, Emulsification capacity และ Methylene blue agar plate จากการศึกษาพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และเมื่อทำการศึกษาลักษณะสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง FT-IR พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* คือ แรมโนลิปิด

Chioma et al. (2013) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันในบริเวณอู่ซ่อมรถยนต์ในรัฐ Owerri Imo สหพันธ์สาธารณรัฐไนจีเรีย จำนวน 4 แหล่ง ซึ่งนำมาทำการเพิ่มปริมาณ (Enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar และทำการคัดแยกแบคทีเรียด้วยเทคนิค Pour plate พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท (X1 - X9) จากตัวอย่างดินทั้ง 4 ตัวอย่าง (A, B, C, D) จากนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้ถูกนำมาคัดกรองการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการทดสอบด้วยวิธี Hemolysis และ Oil displacement test และพบว่า X4 และ X8 เป็นเชื้อที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวดีที่สุด ซึ่งจัดจำแนกได้เป็น *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ตามลำดับ

Gomathy and Senthilkumar (2013) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดจาก *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทางทะเลที่คัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณท่าเรือ เมือง Cuddalore โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญของเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9 และความเค็ม 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน และ *P. aeruginosa* มีการเจริญสูงสุดใช้ระยะเวลาในการบ่ม 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า *P. aeruginosa* มีศักยภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เท่ากับ 1.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า และสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ และจากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพข้างต้นเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิด

Hošková et al. (2013) ได้ทำการศึกษาลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิด โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค 2 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter calcoaceticus* และ *Enterobacter asburiae* และโดยทำการเปรียบเทียบกับลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งสารในกลุ่มแรมโนลิปิดที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทำการแยกมาจากส่วนใสและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Thin layer chromatography ร่วมกับชุด Negative electrospray ionization ซึ่งพบว่าสารแรมโนลิปิดที่ผลิตได้ในครั้งนี้มีความแตกต่างกันที่ความยาวโซ่และความอึดตัวของสาร และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Tandem mass spectrometry พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดเป็นโมโนแรมโนลิปิด และไดแรมโนลิปิด ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของกรดไขมัน 3-hydroxy จำนวน 1 หรือ 2 โมเลกุล และได้ทำการศึกษาศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดโดยใช้สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (น้ำมันดอกทานตะวัน กลีเซอรอลและโซเดียมซิเตรต) แหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมไอออนและไนเตรต) และแหล่งฟอสฟอรัส ที่แตกต่างกันในการเจริญ จากผลการศึกษาพบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดสามารถผลิตได้ดีที่สุดเท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ในเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน อีกทั้งยังพบว่าสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิปิดที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเกิด Emulsification ได้ดีกับสารในกลุ่มอะโรมาติกและอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน และน้ำมันพืชอีกหลายชนิด รวมทั้ง *Acinetobacter* และ *Enterobacter* ทั้งสองสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคกับมนุษย์แตกต่างจาก *P. aeruginosa* ที่ก่อโรคในมนุษย์

Janek et al. (2013) ได้ทำการจัดจำแนกและศึกษาลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ BD2 ที่แยกได้จากดินในทวีปอาร์คติก บนหมู่เกาะ Svalbard Archipelago จากการศึกษาพบว่า *P. putida* สายพันธุ์ BD2 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 2 ชนิด คือ ฟอสฟาติลเอทานอลามีน (Phosphatidylethanolamine) และแรมโนลิปิด เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometer (UPLC-MS) ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดจากส่วนใสของ *P. putida* สายพันธุ์ BD2 ด้วยเอทิลเอซิเตรต พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย Rhamnolipid Rha-Rha-C10-C10 และฟอสฟาติลเอทานอลามีน ที่มีโครงสร้าง

คล้ายกันจำนวน 2 ชนิด ซึ่ง Rhamnolipid Rha-Rha-C10-C10 สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้เท่ากับ 31 มิลลินิวตันต่อเมตร และมีค่า CMC เท่ากับ 0.130 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้ง Rhamnolipid Rha-Rha-C10-C10 มีศักยภาพที่จะสร้างมวลรวมที่มีความเสถียร (80-121 นาโนเมตร) จากการปรับสภาพพื้นผิวของโพลิสไตรีน (Polystyrene) โดยใช้แรมโนลิปิด ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียได้ 43-79 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการก่อโรคของเชื้อราสายพันธุ์ *C. albicans* ได้ 89-90 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าในความเข้มข้นเดียวกันของฟอสฟาติลเอทาโนลามีนสามารถยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียระหว่าง 23-72 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้ง *C. albicans* ระหว่าง 96-98 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาที่ผ่านมาถือเป็นรายงานครั้งแรกที่พบว่า *P. putida* สายพันธุ์ BD2 ที่แยกจากดินในทวีปอาร์คติกสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแรมโนลิปิดจำนวน 1 ชนิด และฟอสฟาติลเอทาโนลามีนที่มีโครงสร้างคล้ายกันจำนวน 2 ชนิด

Nalini and Parthasarathi (2013) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Serratia rubidaea* สายพันธุ์ SNAU02 ที่แยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจากตำบล Cuddalore เมือง Tamilnadu ประเทศอินเดีย ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *S. rubidaea* สายพันธุ์ SNAU02 สามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium เหลือเท่ากับ 34.3 มิลลินิวตันต่อเมตร และจากการศึกษาลักษณะของสารลดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง FTIR และเครื่อง GC-MS พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไตรแรมโนลิปิด มากกว่าโมโนแรมโนลิปิด และในขั้นตอนการศึกษการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้วิธี Response surface methodology (RSM) - Central composite design (CCD) พบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วย แมนนิทอลเท่ากับ 29.31 กรัมต่อลิตร Yeast extract เท่ากับ 2.06 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.97 และปริมาณโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 5.69 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้มีค่าดัชนี Emulsification สูงที่สุด นอกจากนี้พบที่พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *S. rubidaea* สามารถกักคือน้ำมันเครื่องที่ดูดซับกับตัวอย่างทรายได้สูงสุด 92 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *S. rubidaea* สายพันธุ์ SNAU02 น่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการกักคือน้ำมันโดยจุลินทรีย์และการฟื้นฟูสภาพทางชีวภาพ

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

#### วัสดุอุปกรณ์

##### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.1 Mineral salt medium (ประกอบด้วย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$  และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  และธาตุอาหารรอง ประกอบด้วย  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  และ  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

1.2 Tryptic Soy Agar (TSA; Difco, USA)

1.3 Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, USA)

1.4 Sodium dodecyl sulfate (GE Healthcare, Sweden)

1.5 น้ำตาลกลูโคส (Merck, Germany)

1.6 กลีเซอรอล

1.7 น้ำมันปาล์ม

1.8 น้ำมันดีเซล

1.9 โซเดียมไนเตรด (VWR, England)

1.10 ยูเรีย (Merck, Germany)

1.11 Yeast extract (Difco, USA)

1.12 โซเดียมคลอไรด์ (Loba Chemie, India)

1.13 Surfactin (Sigma-Aldrich, USA)

##### 2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อ

2.2 ขวดรูปخمพู่

2.3 ไมโครปิเปต

2.4 ทิป

2.5 ปีกเกอร์

2.6 หลอดปั่นเหวี่ยง

##### 3. เครื่องมือ

3.1 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave; Tomy autoclave, Model SS-325, Tokyo, Japan)

3.2 เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Rotary shaker; JSR, Model JSSI-300C, Cheongju, South Korea)

3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge; Eppendorf, Model Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany)

3.4 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer; Vortex genie 2, Scientific Industries, Model G560E, USA)

3.5 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (Denver instrument, Model UB-10, Bangkok, Thailand)

3.6 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Shimadzu, Model SHIMADZU LC-10, Japan)

3.7 เครื่อง Surface tensiometer (Kyowa Interface Science, Model DY-300, Japan)

## วิธีดำเนินการทดลอง

### 1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารปิโตรเลียม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาต่อเนื่องถึงปัจจัยต่าง ๆ ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และวิเคราะห์ค่าความตึงผิวชีวภาพ ดังนี้

#### 1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ดัดแปลงมาจาก Khehra et al., 2005)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (3.6),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.0),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.0),  $\text{MgSO}_4$  (1.0),  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$  (0.01) และ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.1) และเติม 10 มิลลิลิตรต่อลิตรของธาตุอาหารรองที่ประกอบด้วย (มิลลิกรัมต่อลิตร)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (10.0),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (3.0),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1.0),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2.0),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3.0),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (30.0) และ  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.0) จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และปรับสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสมเพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม และความเข้มข้นของหัวเชื้อ (ตามวิธีการทดลองข้อ 1.2-1.7) การศึกษาปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในห้องปฏิบัติการจะใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และนำไปป้อนในเครื่องเขย่าสาร ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาวัดปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)



ภาพที่ 10 เครื่องเขย่าสาร

1.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Onwosi and Odibo, 2012; Jaysree et al., 2011; Sifour et al., 2007)

เพื่อศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ทำโดยเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในอาหาร Mineral salts medium (MSM) ที่เติมแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันคือ น้ำตาลกลูโคส กลีเซอรอล น้ำมันปาล์ม และน้ำมันดีเซล โดยให้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารเป็น 1% (v/v) และนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญตามข้อ 1.1 และเก็บสารละลายส่วนใส โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมันเพื่อประเมินผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



ภาพที่ 11 เครื่องปั่นเหวี่ยง



**1.3 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ** (Onwosi and Odiibo, 2012; Jaysree et al., 2011; Sifour et al., 2007)

จากผลการศึกษาข้อ 1.2 จะใช้ผลของแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดมาศึกษาต่อเนื่องถึงแหล่งของไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำโดยเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในอาหาร Mineral salts medium (MSM) ที่เติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งได้จากผลการศึกษาข้อ 1.2 และเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ โซเดียมไนเตรต ยูเรีย และ Yeast extract โดยให้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเป็น 1% (v/v) และนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญตามข้อ 1.1 และเก็บสารละลายส่วนใส โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมันเพื่อประเมินผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

**1.4 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ** (ดัดแปลงจาก Joice and Parthasarathi, 2014; Jaysree et al., 2011; Sifour et al., 2007)

จากผลการศึกษาข้อ 1.3 จะใช้ผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดีที่สุดมาศึกษาต่อเนื่องถึงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำโดยเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในอาหาร Mineral salts medium (MSM) ที่เติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งได้จากผลการศึกษาข้อ 1.2 และ 1.3 และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้แตกต่างกัน คือ 5, 6, 7, 8 และ 9 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญตามข้อ 1.1 และเก็บสารละลายส่วนใส โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมันเพื่อประเมินผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

**1.5 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ** (ดัดแปลงจาก Joice and Parthasarathi, 2014; Jaysree et al., 2011; Sifour et al., 2007)

จากผลการศึกษาข้อ 1.4 จะใช้ผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ให้ผลการศึกษาที่ดีที่สุดมาศึกษาต่อเนื่องถึงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำโดยเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในอาหาร Mineral salts medium (MSM) ที่เติมแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งได้จากผลการศึกษาข้อ 1.2-1.4 และนำไปเพาะเลี้ยงตามข้อ 1.1 แต่ปรับในอุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใส โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมันเพื่อประเมินผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

**1.6 ผลของความเค็มต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ** (Tabatabaee et al., 2005; Jaysree et al., 2011; Sifour et al., 2007)

จากผลการศึกษาข้อ 1.5 จะใช้ผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่ดีที่สุดมาศึกษาต่อเนื่องถึงผลของความเค็มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำโดยเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในอาหาร Mineral salts medium (MSM) ที่เติมแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ ให้เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งได้จากผลการศึกษาข้อ 1.2-1.5 และปรับค่าความเค็มโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 5, 10 และ 15 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญตามข้อ 1.1 และเก็บสารละลายส่วนใสโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมันเพื่อประเมินผลของความเค็มที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

**1.7 ผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ** (ดัดแปลงจาก Ghribi and Ellouze-Chaabouni, 2011; Jaysree et al., 2011; Sifour et al., 2007)

จากผลการศึกษาข้อ 1.6 จะใช้ผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและค่าความเค็ม ที่ให้ผลการศึกษาดีที่สุดมาศึกษาต่อเนื่องถึงผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำโดยเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในอาหาร Mineral salts medium (MSM) ที่เติมแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และความเค็มให้เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งได้จากผลการศึกษาข้อ 1.2-1.6 และเติมหัวเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่  $10^4$ ,  $10^6$  และ  $10^8$  CFU/mL และนำไปเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญตามข้อ 1.1 และเก็บสารละลายส่วนใส โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมันเพื่อประเมินผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

**1.8 การวัดปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)** (Jaysree et al., 2011)

นำส่วนใสปราศจากเซลล์จากการทดลองในข้อ 1.2-1.7 มาวัดปริมาณการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน ดังนี้

นำน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร เติมนลงในจานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 90 มิลลิเมตร จำนวน 4 จาน จากนั้นเติมน้ำมันดีเซลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวของน้ำ และเติมส่วนใสของเซลล์ (ชุดทดสอบ) น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุมผลลบ) 1% SDS (ชุดควบคุมผลบวก) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปราศจากเชื้อ (ชุดควบคุมผลบวกเทียม) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวของน้ำมันในแต่ละจานและตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้น (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) และบันทึกผลการทดลอง

## 2. การตรวจหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ (ดัดแปลงจาก Wei et al., 2010; Mandai et al., 2013)

ทำการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salts medium (MSM) ที่ได้ปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการทดลองในข้อ 1 (ได้แก่ เต็ม 1% (v/v) น้ำตาลกลูโคส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาส บ่มในเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการห่อด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันตัวอย่างจากแสง นำตัวอย่างส่วนใสไปตรวจหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Shimadzu, Model SHIMADZU LC-10, Japan) ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและมาตรฐานสถาน มหาวิทยาลัยรังสิต โดยวิธี Reverse phase โดยมี Mobile phase คือ อะซิโตรไนไทรล์ และ 0.1% ไตรฟลูออโรอะซิติก แอซิด (9:1 v/v) และใช้คอลัมน์ Inersil ODS-C18 (250 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร x 5 ไมโครเมตร) ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร มีอัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที โดยทำการฉีดสารตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร (ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ) และนำมาเทียบกับสารมาตรฐานเซอแฟกติน (Surfactin) ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 12 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)  
(Shimadzu, Model SHIMADZU LC-10, Japan)  
(ที่มา: <https://www.labx.com/item/shimadzu-lc-10a/LV39057579>)

### 3. การวิเคราะห์ค่าความตึงผิวชีวภาพ (ดัดแปลงจาก Onwosi and Odibo, 2012)

ทำการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salts medium (MSM) ที่ได้ปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการทดลองก่อนหน้านี้ ได้แก่ เติมน้ำตาลกลูโคส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 6 ฟลาส บ่มในเครื่องเขย่าสารที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างส่วนใสที่ได้มาปรับความเข้มข้นที่ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ของส่วนใสที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร และทำการห่อด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันตัวอย่างจากแสง ก่อนนำไปวัดค่าความตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี Du Nouy Ring method โดยใช้เครื่อง Surface tensiometer (Kyowa Interface Science, Model DY-300, Japan) ของบริษัท อินเตอร์ แล็บ เทคโนโลยี จำกัด โดยใช้ปริมาตร 10 ml ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ซ้ำ การทดลอง หน่วยของการวัดรายงานเป็นค่ามิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m)

นำค่าความตึงผิวที่ได้ไปวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความตึงผิวและความเข้มข้นของส่วนใสที่ไม่มีเซลล์แบคทีเรีย เพื่อทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการเกิดไมเซลล์ Critical micelle concentration (CMC) ซึ่งเป็นจุดที่มีการเกิดการเปลี่ยนแปลงของแรงตึงผิวอย่างฉับพลัน โดยค่า CMC จะถูกประมาณจากกราฟของความตึงผิวที่อยู่ในรูปของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและความตึงผิวที่จุดนี้ถูกกำหนดให้เป็น CMC



ภาพที่ 13 เครื่อง Surface tensiometer (Kyowa Interface Science, Model DY-300, Japan) (ที่มา: [http://www.facekyowa.co.jp/english/en\\_products/en\\_surface\\_tension/](http://www.facekyowa.co.jp/english/en_products/en_surface_tension/))

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม และความเข้มข้นของหัวเชื้อ ที่แตกต่างกัน และตรวจหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปโพลีไทด์ รวมทั้งวิเคราะห์ค่าความตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

#### 1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

##### 1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM) สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM)

ชนิด	ปริมาณ
Basal medium (กรัม/ลิตร)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.60
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
MgSO <sub>4</sub>	1.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.10
Trace element (มิลลิกรัม/ลิตร) (เติม Trace element 10 มิลลิลิตร ใน Basal medium 990 มิลลิลิตร)	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.0
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3.00
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.00
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0
CuSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.00

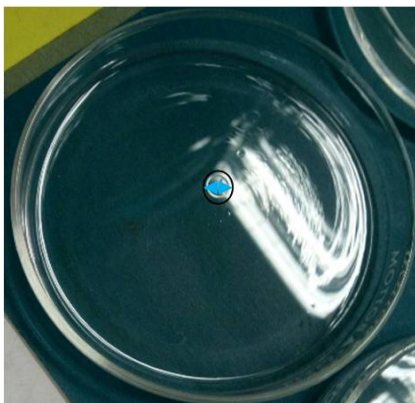
## 1.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษาถึงผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันดีเซล 1% กลีเซอรอล 1% น้ำมันปาล์ม 1% และน้ำตาลกลูโคส 1% ผลการทดลองพบว่า น้ำตาลกลูโคส 1% เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันปาล์ม 1% และกลีเซอรอล 1% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

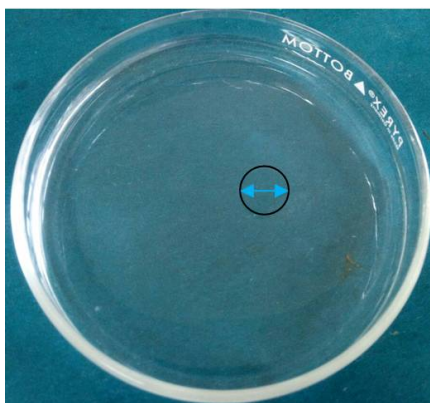
**ตารางที่ 3** ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (cm/20 $\mu$ l)
ชุดควบคุมที่ 1 (น้ำกลั่น)	0.00 $\pm$ 0.00
ชุดควบคุมที่ 2 (1% SDS)	4.20 $\pm$ 0.30
ชุดควบคุมที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM)	0.10 $\pm$ 0.10
ชุดการทดลองที่ 1 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำมันดีเซล 1%)	1.00 $\pm$ 0.00
ชุดการทดลองที่ 2 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + กลีเซอรอล 1%)	2.50 $\pm$ 0.00
ชุดการทดลองที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำมันปาล์ม 1%)	3.80 $\pm$ 0.20
ชุดการทดลองที่ 4 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1%)	7.30 $\pm$ 0.30

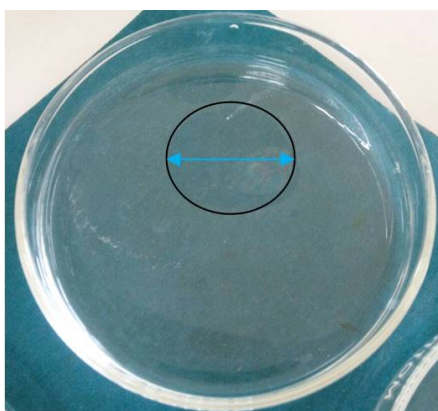
**หมายเหตุ :** ชุดควบคุมที่ 1 คือ ชุดที่มีการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลลบ  
 ชุดควบคุมที่ 2 คือ ชุดที่มีการเติม 1% SDS แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวก  
 ชุดควบคุมที่ 3 คือ ชุดที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวกเทียม



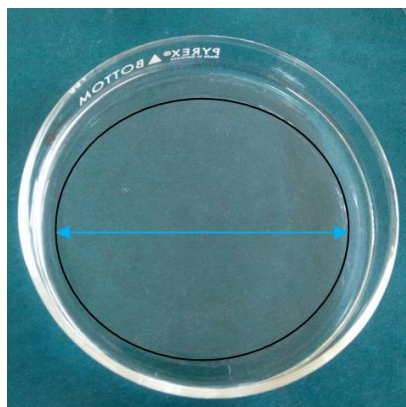
ภาพที่ 14 การทดสอบผลของน้ำมันดีเซล 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 15 การทดสอบผลของกลีเซอรอล 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 16 การทดสอบผลของน้ำมันปาล์ม 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 17 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่เติมแหล่งคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอน

ชนิด	ปริมาณ
Basal medium (กรัม/ลิตร)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.60
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
MgSO <sub>4</sub>	1.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.10
Trace element (มิลลิกรัม/ลิตร) (เติม Trace element 10 มิลลิลิตร ใน Basal medium 990 มิลลิลิตร)	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3.00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.00
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0
CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.00
แหล่งคาร์บอน	
น้ำตาลกลูโคส	1 %



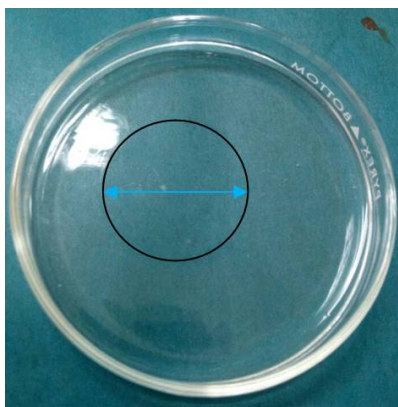
### 1.3 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดจากการทดลองในข้อ 1.2 และเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมไนเตรต 1% Yeast extract 1% และยูเรีย 1% ผลการทดลองพบว่า Yeast extract 1% เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด รองลงมาคือ ยูเรีย และโซเดียมไนเตรต ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

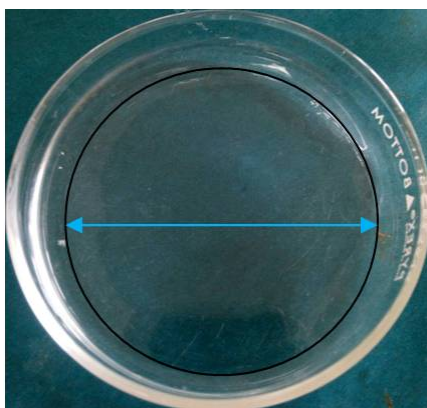
ตารางที่ 5 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (cm/20 $\mu$ l)
ชุดควบคุมที่ 1 (น้ำกลั่น)	0.00 $\pm$ 0.00
ชุดควบคุมที่ 2 (1% SDS)	4.20 $\pm$ 0.30
ชุดควบคุมที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM)	0.10 $\pm$ 0.00
ชุดควบคุมที่ 4 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1%)	7.30 $\pm$ 0.20
ชุดการทดลองที่ 1 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + โซเดียมไนเตรต 1%)	3.50 $\pm$ 0.00
ชุดการทดลองที่ 2 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + Yeast extract 1%)	7.30 $\pm$ 0.40
ชุดการทดลองที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + ยูเรีย 1%)	6.00 $\pm$ 0.00

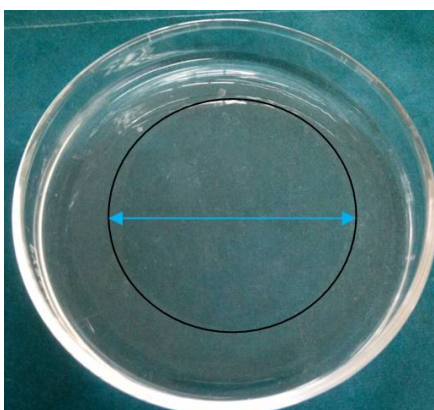
หมายเหตุ : ชุดควบคุมที่ 1 คือ ชุดที่มีการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการทดสอบและเป็นชุดควบคุมผลลบ  
 ชุดควบคุมที่ 2 คือ ชุดที่มีการเติม 1% SDS แทนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวก  
 ชุดควบคุมที่ 3 คือ ชุดที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM แทนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวกเทียม  
 ชุดควบคุมที่ 4 คือ ชุดที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM และน้ำตาลกลูโคสแทนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวกเทียม



ภาพที่ 18 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และโซเดียมไนเตรต 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 19 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และ Yeast extract 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 20 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และยูเรีย 1% ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

ชนิด	ปริมาณ
Basal medium (กรัม/ลิตร)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.60
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
MgSO <sub>4</sub>	1.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.10
Trace element (มิลลิกรัม/ลิตร) (เติม Trace element 10 มิลลิลิตร ใน Basal medium 990 มิลลิลิตร)	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3.00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.00
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0
CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.00
แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	
น้ำตาลกลูโคส	1 %
Yeast extract	1 %

จากผลการศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ Yeast extract 1 % แต่ให้ผลการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเทียบเท่ากับการเติมแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส 1 %) เพียงอย่างเดียว ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปในการศึกษาถึงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ จึงไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

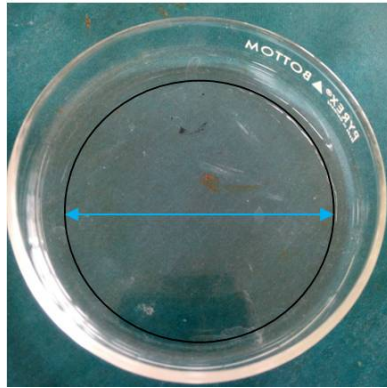
#### 1.4 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษาถึงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือ น้ำตาลกลูโคส 1% และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความแตกต่างกัน 5 ค่า คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 ผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีผลให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 และ 9 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

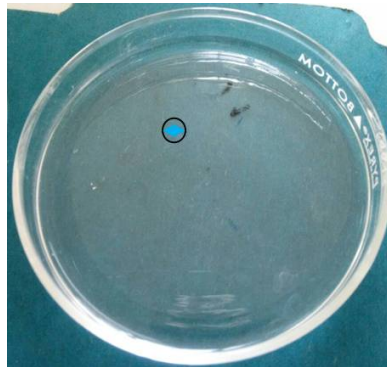
**ตารางที่ 7** ผลของ pH ต่างๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (cm/20 $\mu$ l)
ชุดควบคุมที่ 1 (น้ำกลั่น)	0.00 $\pm$ 0.00
ชุดควบคุมที่ 2 (1% SDS)	4.50 $\pm$ 0.30
ชุดควบคุมที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM)	0.10 $\pm$ 0.00
ชุดควบคุมที่ 4 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1%, pH 6.8 (ไม่ปรับค่า pH))	7.30 $\pm$ 0.30
ชุดการทดลองที่ 1 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 5)	0.50 $\pm$ 0.20
ชุดการทดลองที่ 2 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 6)	2.60 $\pm$ 0.40
ชุดการทดลองที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7)	9.00 $\pm$ 0.00
ชุดการทดลองที่ 4 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 8)	5.90 $\pm$ 0.50
ชุดการทดลองที่ 5 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 9)	4.50 $\pm$ 0.10

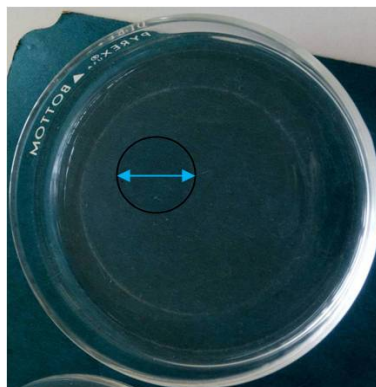
**หมายเหตุ :** ชุดควบคุมที่ 1 คือ ชุดที่มีการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลลบ  
 ชุดควบคุมที่ 2 คือ ชุดที่มีการเติม 1% SDS แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวก  
 ชุดควบคุมที่ 3 คือ ชุดที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวกเทียม



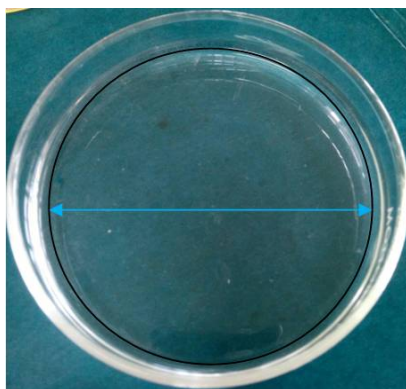
ภาพที่ 21 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ไม่ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



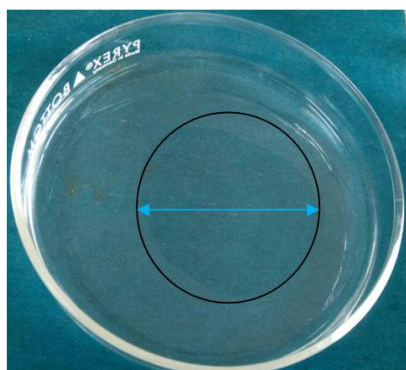
ภาพที่ 22 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



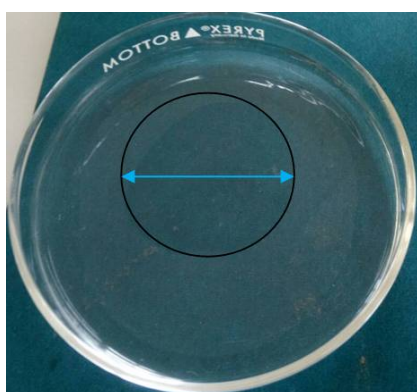
ภาพที่ 23 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 24 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 25 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8 ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 26 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9 ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง แสดงดังตารางที่ 8

**ตารางที่ 8** อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอนและปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ชนิด	ปริมาณ
Basal medium (กรัม/ลิตร)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.60
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
MgSO <sub>4</sub>	1.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.10
Trace element (มิลลิกรัม/ลิตร) (เติม Trace element 10 มิลลิลิตร ใน Basal medium 990 มิลลิลิตร)	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3.00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.00
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0
CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.00
แหล่งคาร์บอน	
น้ำตาลกลูโคส	1%
สภาวะ	
pH	7

### 1.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

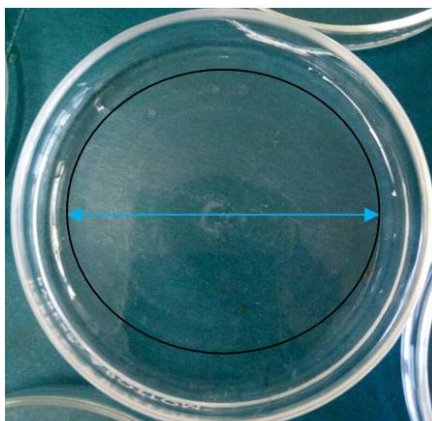
จากการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือ น้ำตาลกลูโคส 1% ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 7 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า การบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ การบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

**ตารางที่ 9** ผลของอุณหภูมิต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

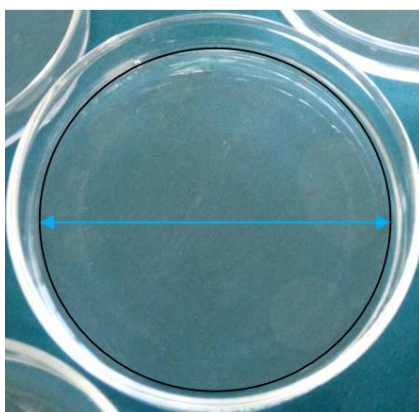
ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (cm/20 $\mu$ l)
ชุดควบคุมที่ 1 (น้ำกลั่น)	0.00 $\pm$ 0.00
ชุดควบคุมที่ 2 (1% SDS)	4.50 $\pm$ 0.50
ชุดควบคุมที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM)	0.10 $\pm$ 0.10
ชุดการทดลองที่ 1 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 25 °C)	7.20 $\pm$ 0.30
ชุดการทดลองที่ 2 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C)	มากกว่า 9.00 $\pm$ 0.00
ชุดการทดลองที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 37 °C)	6.00 $\pm$ 0.30
ชุดการทดลองที่ 4 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 45 °C)	3.30 $\pm$ 0.00

**หมายเหตุ :** ชุดควบคุมที่ 1 คือ ชุดที่มีการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลลบ  
 ชุดควบคุมที่ 2 คือ ชุดที่มีการเติม 1% SDS แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวก  
 ชุดควบคุมที่ 3 คือ ชุดที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวกเทียม

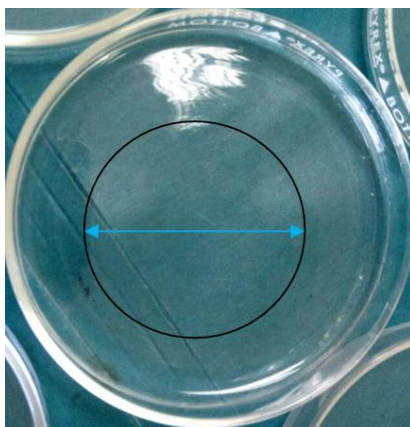




ภาพที่ 27 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 28 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



**ภาพที่ 29** การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



**ภาพที่ 30** การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และปมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ แสดงดังตารางที่ 10

**ตารางที่ 10** อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ

ชนิด	ปริมาณ
Basal medium (กรัม/ลิตร)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.60
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
MgSO <sub>4</sub>	1.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.10
Trace element (มิลลิกรัม/ลิตร) (เติม Trace element 10 มิลลิลิตร ใน Basal medium 990 มิลลิลิตร)	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3.00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.00
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0
CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.00
แหล่งคาร์บอน	
น้ำตาลกลูโคส	1 %
สภาวะ	
pH	7
อุณหภูมิ	30 องศาเซลเซียส

### 1.6 การศึกษาผลของความเค็มที่ระดับต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษาถึงผลของความเค็มต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือ น้ำตาลกลูโคส 1% ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 7 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0, 1, 2, 3, 5, 10 และ 15 % ผลการทดลองพบว่าค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0% โซเดียมคลอไรด์ มีผลให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 และ 2 % โซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลของความเค็มที่ระดับต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (cm/20 $\mu$ l)
ชุดควบคุมที่ 1 (น้ำกลั่น)	0.00 $\pm$ 0.00
ชุดควบคุมที่ 2 (1% SDS)	5.20 $\pm$ 0.30
ชุดควบคุมที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM)	0.60 $\pm$ 0.20
ชุดการทดลองที่ 1 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 0% NaCl)	มากกว่า 9.00 $\pm$ 0.00
ชุดการทดลองที่ 2 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 1% NaCl)	8.40 $\pm$ 0.37
ชุดการทดลองที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 2% NaCl)	6.80 $\pm$ 0.33
ชุดการทดลองที่ 4 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 3% NaCl)	4.50 $\pm$ 0.56
ชุดการทดลองที่ 5 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 5% NaCl)	3.50 $\pm$ 0.55
ชุดการทดลองที่ 6 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 10% NaCl)	1.20 $\pm$ 0.29
ชุดการทดลองที่ 7 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 15% NaCl)	0.60 $\pm$ 0.17

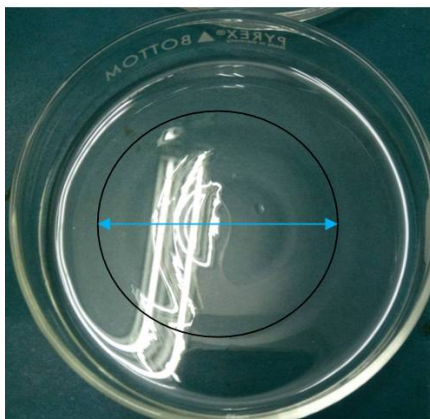
หมายเหตุ : ชุดควบคุมที่ 1 คือ ชุดที่มีการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลลบ  
ชุดควบคุมที่ 2 คือ ชุดที่มีการเติม 1% SDS แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวก  
ชุดควบคุมที่ 3 คือ ชุดที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวกเทียม



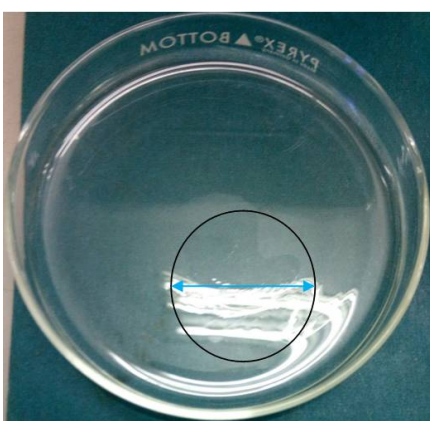
ภาพที่ 31 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 0% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



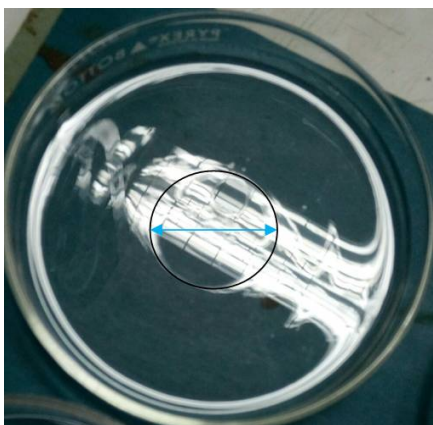
ภาพที่ 32 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 1% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 33 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 2% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



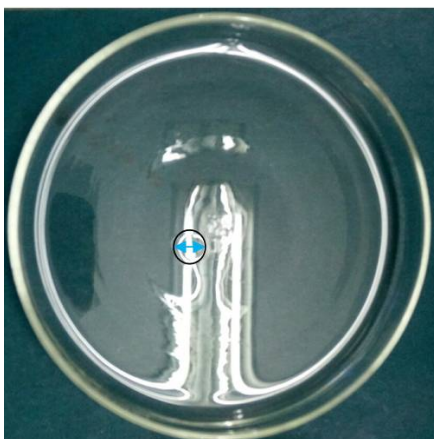
ภาพที่ 34 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 3% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 35 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 5% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 36 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 10% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 37 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 15% NaCl ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระดับความเค็ม แสดงดังตารางที่ 12



**ตารางที่ 12** อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระดับความเค็ม

ชนิด	ปริมาณ
Basal medium (กรัม/ลิตร)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.60
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
MgSO <sub>4</sub>	1.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.10
Trace element (มิลลิกรัม/ลิตร) (เติม Trace element 10 มิลลิลิตร ใน Basal medium 990 มิลลิลิตร)	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3.00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.00
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0
CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.00
แหล่งคาร์บอน	
น้ำตาลกลูโคส	1 %
สภาวะ	
pH	7
อุณหภูมิ	30 องศาเซลเซียส
ความเค็ม	0 % NaCl

### 1.7 การศึกษาผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ระดับต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว

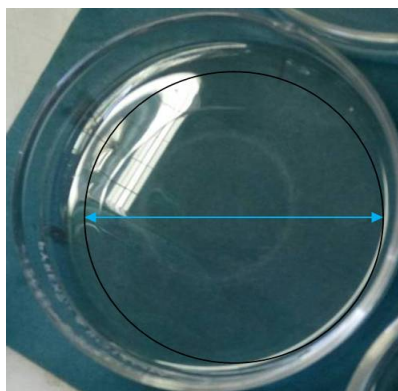
#### ชีวภาพ

จากการศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือ น้ำตาลกลูโคส 1% ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0% โซเดียมคลอไรด์ และเติมหัวเชื้อที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> และ 10<sup>9</sup> CFU/mL ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 13

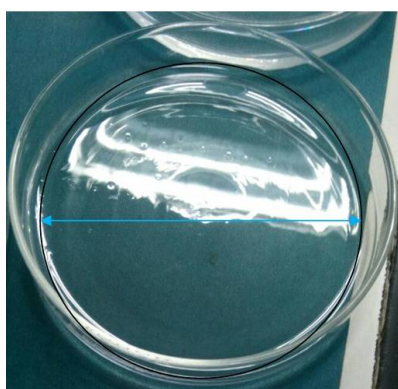
**ตารางที่ 13** ผลของความเข้มข้นหัวเชื้อที่ระดับต่าง ๆ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ชุดการทดลอง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (cm/20 $\mu$ l)
ชุดควบคุมที่ 1 (น้ำกลั่น)	0.00 $\pm$ 0.00
ชุดควบคุมที่ 2 (1% SDS)	5.10 $\pm$ 0.0
ชุดควบคุมที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM)	0.50 $\pm$ 0.10
ชุดการทดลองที่ 1 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 0% NaCl + ความเข้มข้นหัวเชื้อ 10 <sup>7</sup> CFU/mL)	8.40 $\pm$ 0.20
ชุดการทดลองที่ 2 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 0% NaCl + ความเข้มข้นหัวเชื้อ 10 <sup>8</sup> CFU/mL)	มากกว่า 9.00 $\pm$ 0.00
ชุดการทดลองที่ 3 (อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM + น้ำตาลกลูโคส 1% + pH 7 + 30 °C + 0% NaCl + ความเข้มข้นหัวเชื้อ 10 <sup>9</sup> CFU/mL)	มากกว่า 9.00 $\pm$ 0.00

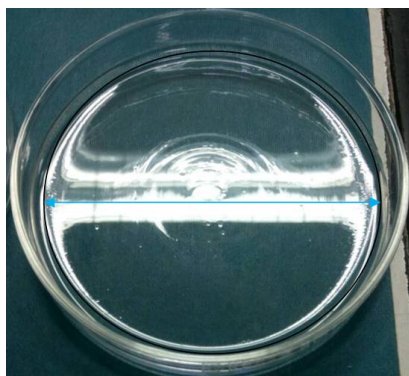
**หมายเหตุ :** ชุดควบคุมที่ 1 คือ ชุดที่มีการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลลบ  
 ชุดควบคุมที่ 2 คือ ชุดที่มีการเติม 1% SDS แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวก  
 ชุดควบคุมที่ 3 คือ ชุดที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM แทนแหล่งคาร์บอนในการทดสอบ และเป็นชุดควบคุมผลบวกเทียม



**ภาพที่ 38** การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0% NaCl และระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อที่  $10^7$  CFU/mL ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



**ภาพที่ 39** การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0% NaCl และระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อที่  $10^8$  CFU/mL ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 40 การทดสอบผลของน้ำตาลกลูโคส 1% และอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0% NaCl และระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อที่  $10^9$  CFU/mL ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระดับความเค็ม และความเข้มข้นของหัวเชื้อ แสดงดังตารางที่ 14

**ตารางที่ 14** อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่เติมแหล่งคาร์บอน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระดับความเค็ม และความเข้มข้นของหัวเชื้อ

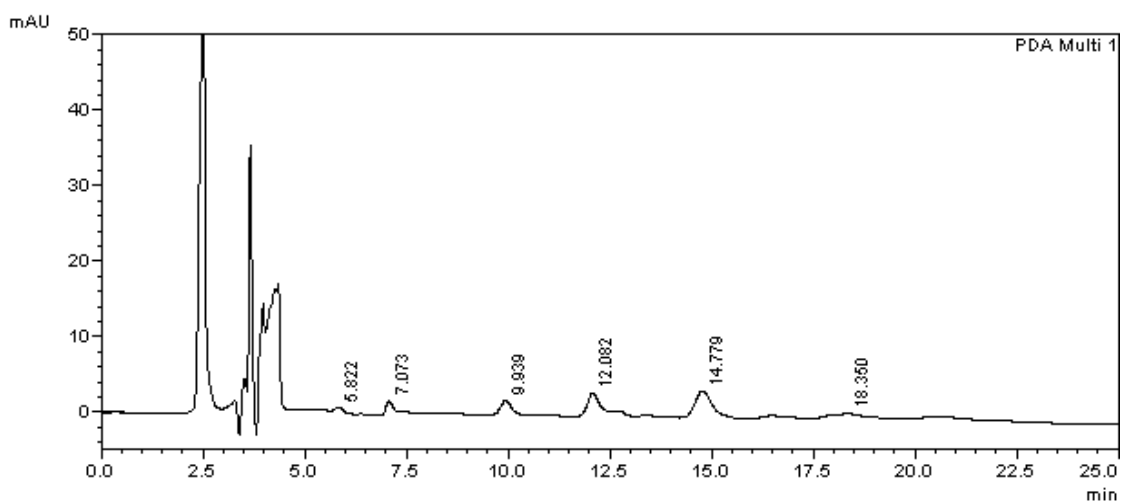
ชนิด	ปริมาณ
Basal medium (กรัม/ลิตร)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.60
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.00
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
MgSO <sub>4</sub>	1.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.10
Trace element (มิลลิกรัม/ลิตร) (เติม Trace element 10 มิลลิลิตร ใน Basal medium 990 มิลลิลิตร)	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3.00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.00
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0
CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.00
แหล่งคาร์บอน	
น้ำตาลกลูโคส	1 %
สภาวะ	
pH	7
อุณหภูมิ	30 องศาเซลเซียส
ความเค็ม	0 % NaCl
ความเข้มข้นของหัวเชื้อ	10 <sup>8</sup> CFU/mL

## 2. การตรวจหาปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์

จากการศึกษาถึงปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการทดลองข้อ 1 (ได้แก่ เติมน้ำตาลกลูโคส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL) และตรวจวัดด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ผลการทดลองพบว่าในช่วงเวลาที่ 14.779 14.771 และ 14.772 มีพื้นที่พีคสูงสุด เท่ากับ 102,945 108,423 และ 106,558 ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถผลิตได้ พบว่ามีค่าเท่ากับ  $66.00 \pm 1.54$  มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 15-22 และภาพที่ 41-49

**ตารางที่ 15** ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารทดสอบจากการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 1)

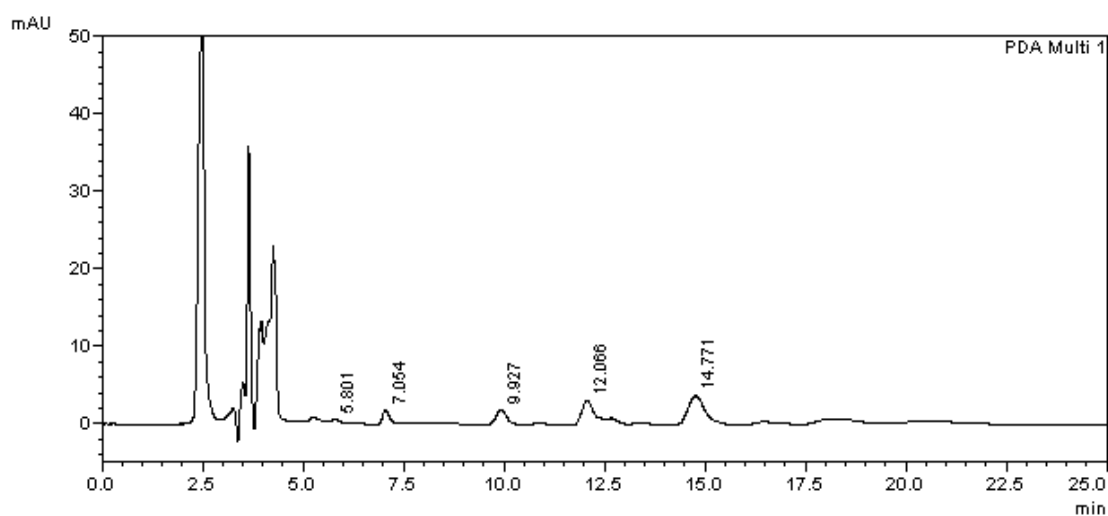
Peak	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.822	8371	641	3.415	5.774
2	7.073	18160	1669	7.410	15.022
3	9.939	35872	1908	14.637	17.171
4	12.082	53126	2816	21.677	25.350
5	14.779	102945	3522	42.005	31.709
6	18.350	26606	553	10.856	4.975
Total		245079	11109	100.000	100.000



ภาพที่ 41 โครมาโทแกรมของสารทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 1)

ตารางที่ 16 ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารทดสอบจากการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 2)

Peak	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.801	4329	347	1.933	3.262
2	7.054	19765	1754	8.828	16.476
3	9.927	37515	1993	16.756	18.715
4	12.066	53860	2875	24.056	27.000
5	14.771	108423	3679	48.427	34.547
Total		223891	10649	100.000	100.000

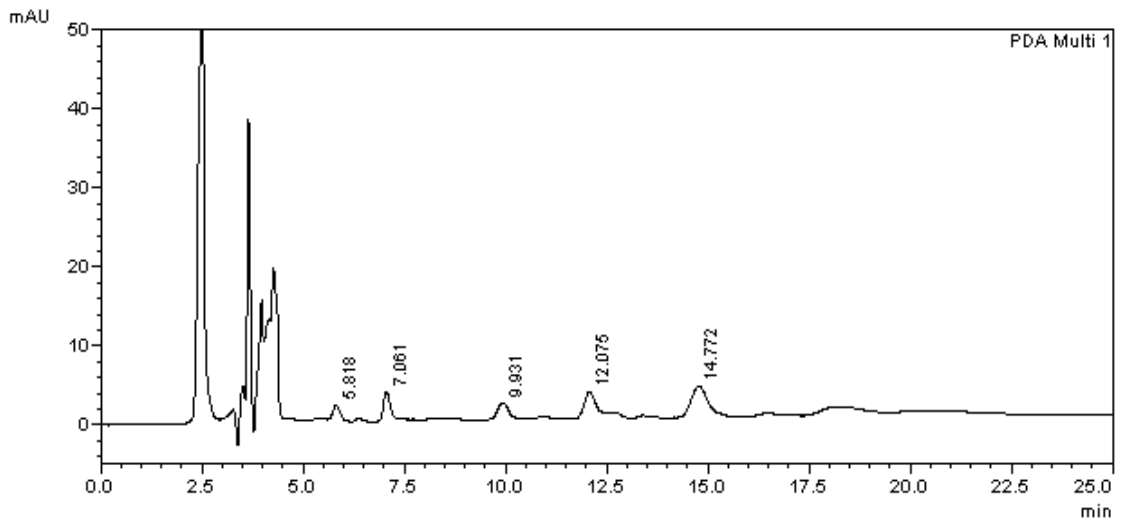


ภาพที่ 42 โครมาโทแกรมของสารทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 2)

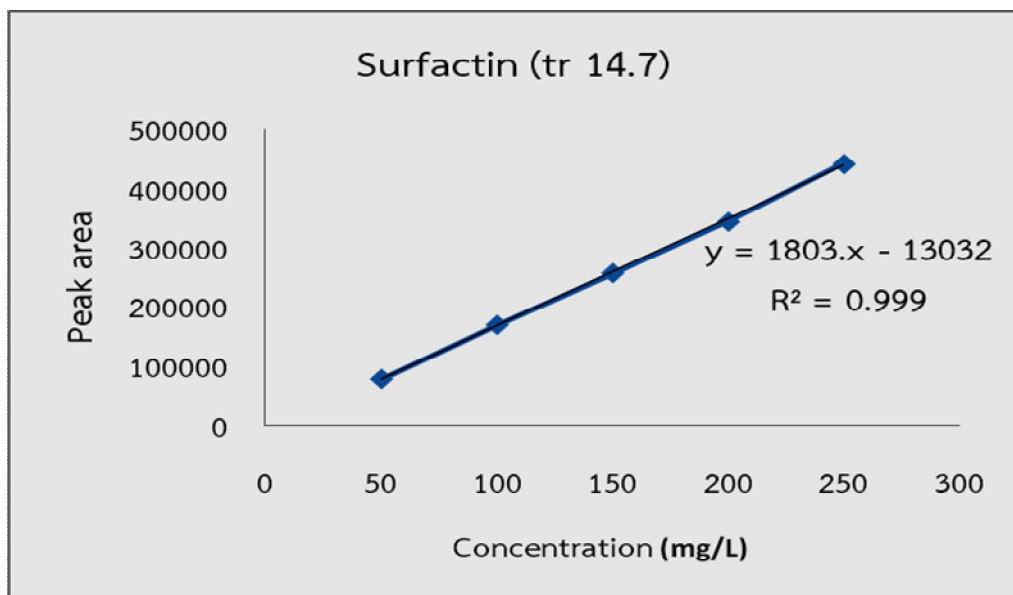
ตารางที่ 17 ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารทดสอบจากการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 3)

Peak	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.818	23778	1848	8.915	12.730
2	7.061	42726	3723	16.019	25.650
3	9.931	37042	2075	13.888	14.297
4	12.075	56611	3054	21.225	21.043
5	14.772	106558	3815	39.952	26.281
Total		266714	14515	100.000	100.000





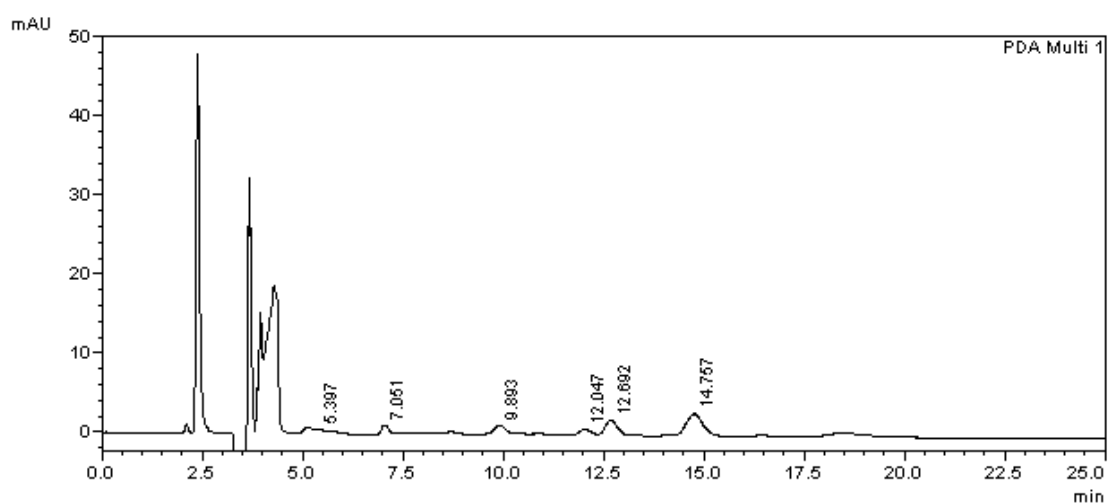
ภาพที่ 43 โครมาโทแกรมของสารทดสอบสำหรับการตรวจวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่ม ลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 (การทดลองครั้งที่ 3)



ภาพที่ 44 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Surfactin

ตารางที่ 18 ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 50 ppm

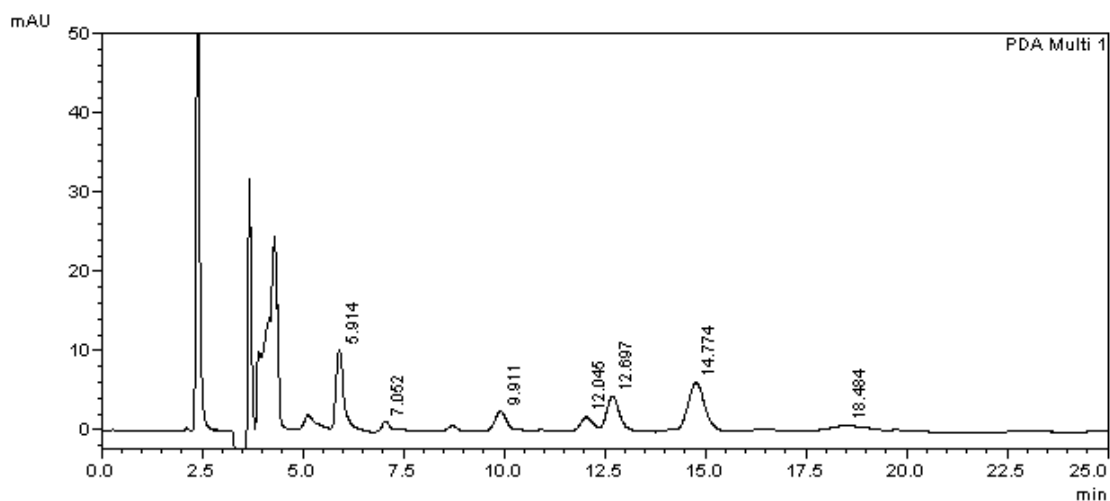
Peak	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.397	2099	79	1.237	1.015
2	7.051	13796	1142	8.129	14.719
3	9.893	20626	1114	12.154	14.357
4	12.047	14600	754	8.603	9.716
5	12.692	40847	1933	24.070	24.912
6	14.757	77734	2737	45.806	35.281
<b>Total</b>		<b>169703</b>	<b>7759</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>



ภาพที่ 45 โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 50 ppm

ตารางที่ 19 ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 100 ppm

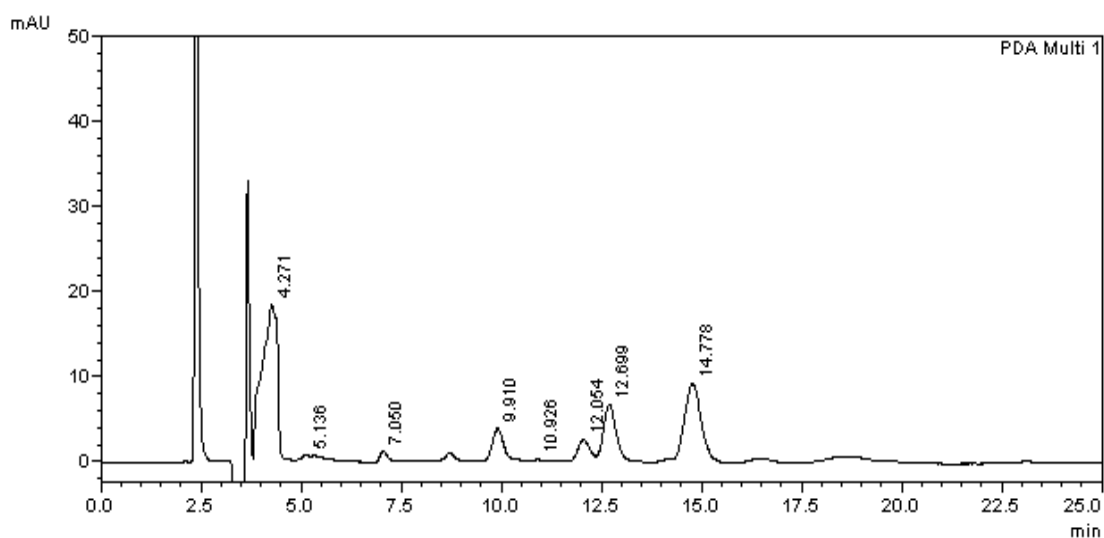
Peak	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.914	133928	10027	25.076	37.915
2	7.052	13777	1189	2.579	4.494
3	9.911	45622	2460	8.542	9.303
4	12.045	36418	1762	6.819	6.664
5	12.697	100224	4414	18.766	16.691
6	14.774	168749	5958	31.596	22.527
7	18.484	35363	636	6.621	2.407
Total		534080	26446	100.000	100.000



ภาพที่ 46 โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 100 ppm

ตารางที่ 20 ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 150 ppm

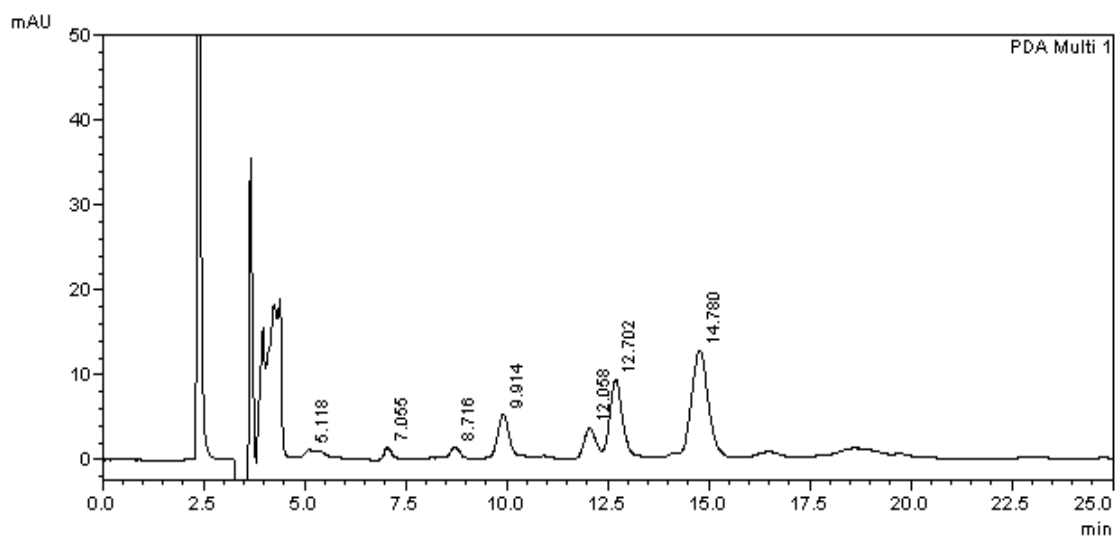
Peak	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.271	483045	18138	46.411	43.151
2	5.136	2531	230	0.243	0.547
3	7.050	16544	1303	1.590	3.100
4	9.910	74417	3791	7.150	9.020
5	10.926	1992	141	0.191	0.335
6	12.054	54647	2659	5.251	6.327
7	12.699	151613	6707	14.567	15.956
8	14.778	255998	9065	24.957	21.565
Total		1040787	42034	100.000	100.000



ภาพที่ 47 โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 150 ppm

ตารางที่ 21 ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 200 ppm

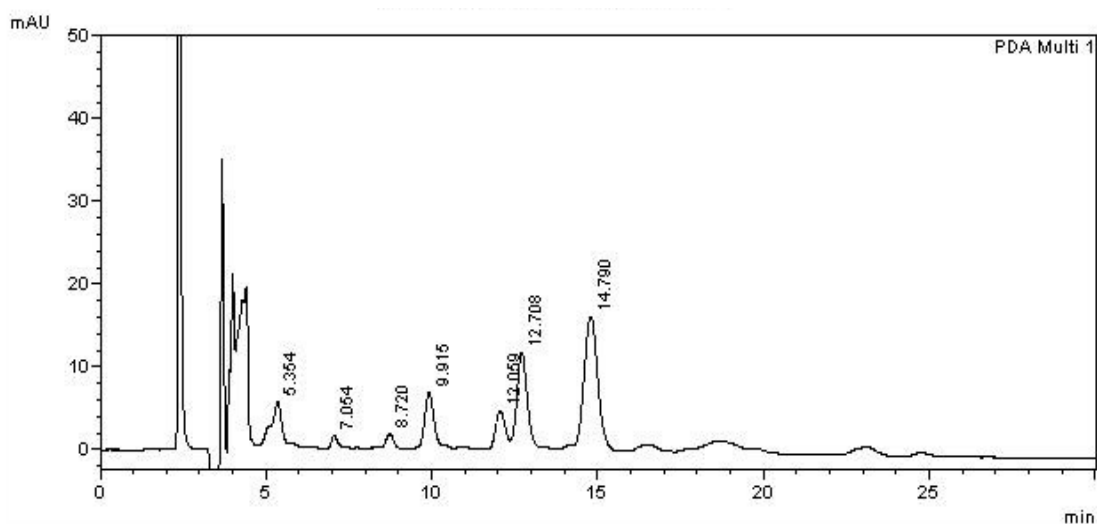
Peak	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.118	5088	451	0.675	1.350
2	7.055	17325	1376	2.299	4.122
3	8.716	20889	1357	2.772	4.067
4	9.914	100940	5177	13.395	15.512
5	12.058	71781	3590	9.525	10.757
6	12.702	193895	9068	25.730	27.172
7	14.780	343656	12354	45.604	37.020
Total		753574	33372	100.000	100.000



ภาพที่ 48 โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 200 ppm

ตารางที่ 22 ค่า Retention time และพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 250 ppm

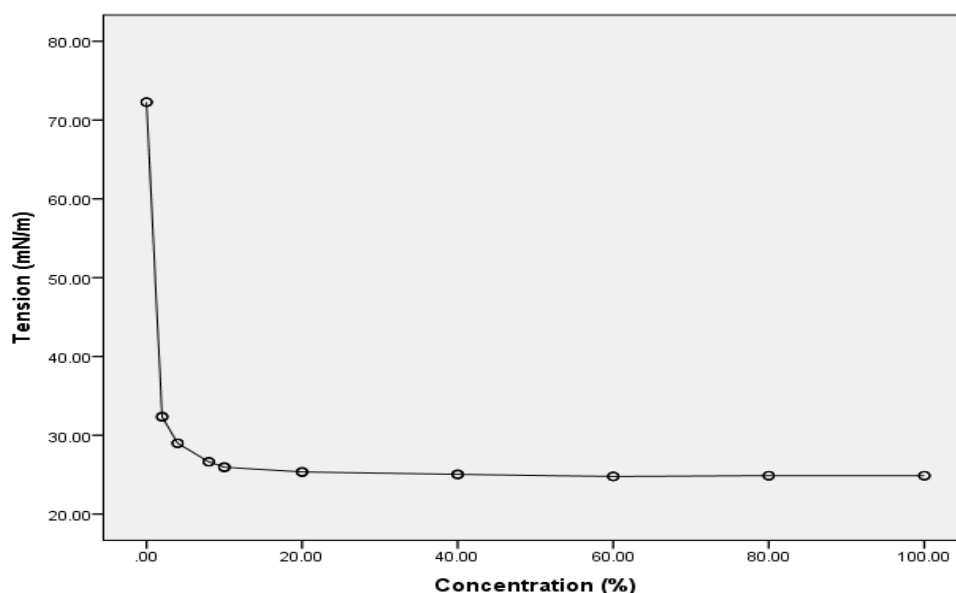
Peak	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	5.354	47187	3856	4.706	8.390
2	7.054	24109	1633	2.404	3.554
3	8.720	26454	1746	2.638	3.798
4	9.915	128688	6648	12.833	14.464
5	12.059	92901	4638	9.264	10.092
6	12.708	242366	11565	24.169	25.161
7	14.790	441069	15877	43.985	34.542
<b>Total</b>		1002776	45963	100.000	100.000



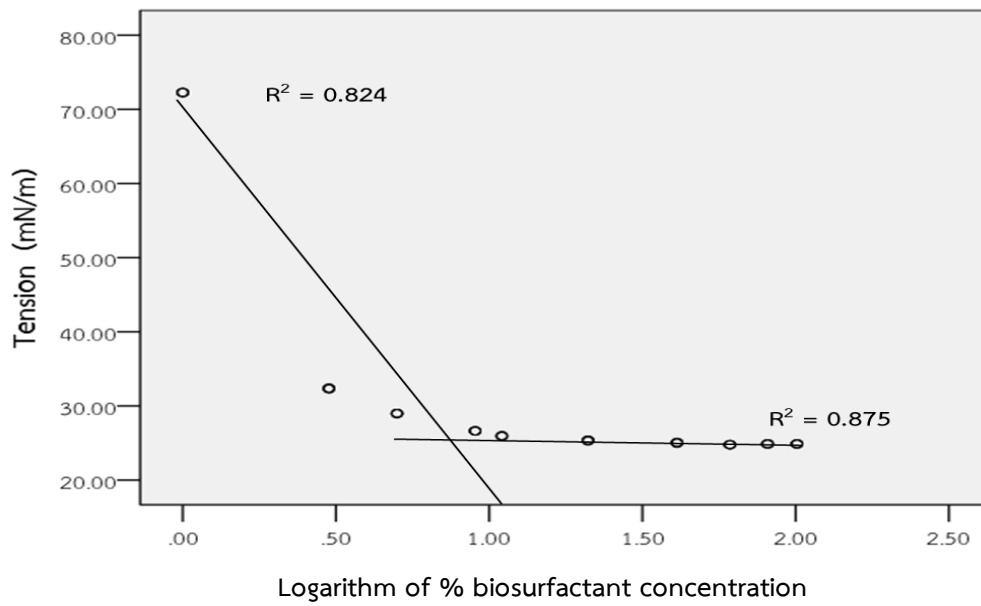
ภาพที่ 49 โครมาโทแกรมของของสารมาตรฐาน Surfactin ความเข้มข้น 250 ppm

### 3. การวิเคราะห์ค่าความตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1

จากการศึกษาถึงค่าความตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการทดลองในข้อ 1 (ได้แก่ เต็ม 1% (v/v) น้ำตาลกลูโคส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL) ผลการทดลองพบว่าค่าความตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีค่าความตึงผิวอยู่ระหว่าง 32.35 มิลลินิวตันต่อเมตร ถึง 24.87 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการฟอร์มตัวของไมเซลล์ที่ความเข้มข้นของส่วนใสเท่ากับ 7.11% และมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่พบในส่วนใสเท่ากับ 4.69 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 50-51



ภาพที่ 50 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของส่วนใสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



ภาพที่ 51 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log ความเข้มข้นของส่วนใสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1



## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

#### สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาถึงผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันดีเซล 1% กลีเซอรอล 1% น้ำมันปาล์ม 1% และน้ำตาลกลูโคส 1% ผลการทดลองพบว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันปาล์ม กลีเซอรอล และน้ำมันดีเซล ตามลำดับ

2. จากการศึกษาถึงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือ น้ำตาลกลูโคส 1% และเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมไนเตรต 1% Yeast extract 1% และยูเรีย 1% ผลการทดลองพบว่า Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด แต่ให้ผลการทดลองที่เท่ากับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน รองลงมาคือ ยูเรีย และโซเดียมไนเตรต ตามลำดับ

3. จากการศึกษาถึงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือ น้ำตาลกลูโคส 1% และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความแตกต่างกัน 5 ค่า คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 ผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีผลให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 และ 9 ตามลำดับ

4. จากการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือ น้ำตาลกลูโคส 1% ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 7 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า การบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด รองลงมาคือ การบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

5. จากการศึกษาถึงผลของความเค็มต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือ น้ำตาลกลูโคส 1% ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0, 1, 2, 3, 5, 10 และ 15 % ผลการทดลองพบว่าค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0% โซเดียมคลอไรด์ มีผลให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 และ 2 % โซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับ

6. จากการศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของหัวเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือ น้ำตาลกลูโคส 1% ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0% โซเดียมคลอไรด์ และเติมหัวเชื้อที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันคือ  $10^7$ ,  $10^8$

และ  $10^9$  CFU/mL ผลการทดลองพบว่าหัวเชื้อที่ระดับความเข้มข้น  $10^8$  และ  $10^9$  CFU/mL ให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ หัวเชื้อที่ระดับความเข้มข้น  $10^7$  CFU/mL

7. จากการศึกษาถึงปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการทดลอง (1% (v/v) น้ำตาลกลูโคส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ความเข้มข้นของหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0% โซเดียมคลอไรด์) ผลการทดลองพบว่าในช่วงเวลาที่ 14.779 14.771 และ 14.772 มีพื้นที่ผิวสูงสุด 102,945 108,423 และ 106,558 ตามลำดับ ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 เท่ากับ  $66.00 \pm 1.54$  มิลลิกรัมต่อลิตร

8. จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของส่วนใสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ได้ มีค่าความตึงผิวอยู่ระหว่าง 32.35 มิลลินิวตันต่อเมตร ถึง 24.87 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการฟอร์มตัวของไมเซลล์ที่ความเข้มข้นของส่วนใสเท่ากับ 7.11% และมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่พบในส่วนใสเท่ากับ 4.69 มิลลิกรัมต่อลิตร

9. ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium ที่เติม 1% (v/v) น้ำตาลกลูโคส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ความเข้มข้นของหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อ 0% โซเดียมคลอไรด์ ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่ามีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ เท่ากับ  $66.00 \pm 1.54$  มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าความตึงผิวอยู่ระหว่าง 32.35 มิลลินิวตันต่อเมตร ถึง 24.87 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการฟอร์มตัวของไมเซลล์ที่ความเข้มข้นของส่วนใสเท่ากับ 7.11% และมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่พบในส่วนใสเท่ากับ 4.69 มิลลิกรัมต่อลิตร

## อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ณ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็มเท่ากับ 0% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาณหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL ความเร็วในการบ่ม 180 rpm ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ และจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* หลายสายพันธุ์ ยกตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ MUV4, *B. subtilis* สายพันธุ์ SPB1, *B. subtilis* สายพันธุ์ JA-1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ ส่วน *B. subtilis* สายพันธุ์ MUV4, *B. subtilis* สายพันธุ์ SPB1 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ JA-1 ยังใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสเหมือนกับแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้ (รุจา สารคุณ, 2548; Suwansukho et al., 2008; Ghribi and Ellouze-Chaabouni, 2011; Wang et al., 2011) นอกจากนั้นพบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ ยังมีสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้เช่นกัน ทั้งในด้านความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและความเค็ม ยกเว้นแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ JA-1 ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบความเค็มคือ ใช้ความเค็ม 8 - 10% ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า แหล่งคาร์บอนที่ให้ผลทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีที่สุดคือน้ำตาลกลูโคส รองลงมาคือ น้ำมันปาล์ม กลีเซอรอลและน้ำมันดีเซล ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่านอกจากการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วยังสามารถมีการประยุกต์ใช้การฟื้นฟูสภาพในกรณีที่มีน้ำมันปาล์มและ/หรือน้ำมันดีเซลก็สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ก็อาจจะเป็นไปได้ว่าเมื่อมีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์มและ/หรือน้ำมันดีเซลที่พบอยู่ในดินนั้นและมีการเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่ม เพื่อช่วยในการฟื้นฟูสภาพได้

นอกจากแบคทีเรียชนิด *B. subtilis* แล้วยังพบว่ามีแบคทีเรีย *Bacillus* สปีชีส์อื่นๆ คือ *B. salmalaya* สายพันธุ์ 139SI, *Bacillus* sp. BMN 14 และ BMN 27, *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ SH20, *B. thuringiensis* สายพันธุ์ SH20, *B. megaterium* สายพันธุ์ MG20 และ *B. velezensis* สายพันธุ์ KLP2016 (Dadrastia and Ismail, 2015; Heryania and Putra, 2017; Barakata et al., 2017; Ghazal et al., 2017; Meena et al., 2018) ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ นอกจากนั้นยังพบรายงานของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ที่คัดแยกมาจากประเทศไทย ยกตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. subtilis/amyoliquefaciens* และ *Pseudomonas fluorescens* (นิรันดร์ รุ่งสว่าง, 2542; รุจา สารคุณ, 2548; Rachamontree et al., 2015; กฤษฎา บุญชัย และคณะ, 2552) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ อาจจะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่อีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและมีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่าง ๆ ซึ่งน่าจะประยุกต์ใช้ได้ในการฟื้นฟูสภาพโดยวิธีทางชีวภาพซึ่งเป็นวิธีที่ปลอดภัยและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าวิธีการใช้สารเคมี แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีความสามารถในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงกว้างคือ  $7.30 \pm 0.30$  ถึง  $9.00 \pm 0.00$  cm/20  $\mu$  แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ Yeast extract 1% แต่ให้ผลเทียบเท่ากับการเติมแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงไม่เติมแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป ต่างจากแบคทีเรียหลาย

ชนิดที่แยกได้จากต่างประเทศ เช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ DM-03 และสายพันธุ์ DM-04, *B. subtilis* สายพันธุ์ SPB1, *Pseudomonas fluorescens* Migula สายพันธุ์ 1895, *Brevibacterium aureum* สายพันธุ์ MSA13 และ *P. nitroreducens* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Das and Mukherjee, 2007; Ghribi and Ellouze-Chaabouni, 2011; Abouseoud et al., 2008; Kiran et al., 2010; Onwosi and Odibo, 2012) และแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-9 ซึ่งสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ติดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 แสดงว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในดินหรือน้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6-9 และสามารถทำการฟื้นฟูสภาพได้ทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม สอดคล้องกับแบคทีเรียบางชนิด ยกตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ SPB1, *B. subtilis* สายพันธุ์ JA-1, *B. atrophaeus* สายพันธุ์ 5-2a, *B. subtilis*, *B. velezensis* สายพันธุ์ KLP2016 และ *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK1 ที่มีความสามารถในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 (Ghribi and Ellouze-Chaabouni, 2011; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2016; Mehmood et al., 2018; Meena et al., 2018; รุจา สารคุณ, 2548) และการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลให้ *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดสอดคล้องกับแบคทีเรียหลายชนิดที่แยกได้ในต่างประเทศ ยกตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ MUV4, *B. atrophaeus* สายพันธุ์ 5-2a, *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ SH20, *B. thuringiensis* สายพันธุ์ SH20, *B. megaterium* สายพันธุ์ MG20, *B. subtilis* สายพันธุ์ MG13 และ *B. velezensis* สายพันธุ์ KLP2016 (Suwansukho et al., 2008; Zhang et al., 2016; Barakata et al., 2017; Ghazal et al., 2017; Meena et al., 2018) รวมถึงแบคทีเรียหลายชนิดที่แยกได้ในประเทศไทย ยกตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สายพันธุ์ BBK-1, *B. subtilis* / *amyloliquefaciens* และ *P. fluorescens* (นิรันดร์ รุ่งสว่าง, 2542; กฤษณา บุญชัย และคณะ, 2552; ปวีณา ดิกิจ และอทิพันธ์ เสียมไหม, 2557) แบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีความเหมาะสมต่อการเจริญและสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีความสามารถในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสภาวะที่ไม่มีความเค็ม จึงทำให้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 น่าจะมีความสามารถในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยทั่วไปที่ปนเปื้อนด้วยน้ำมันชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำมันทอด น้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว เป็นต้น ทั้งในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปและสิ่งแวดล้อมทางอุตสาหกรรมซึ่งความสามารถของด้านนี้น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการประยุกต์ใช้เพื่อการฟื้นฟูสภาพโดยวิธีทางชีวภาพซึ่งเป็นวิธีที่ปลอดภัยและมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าวิธีการใช้สารเคมี นอกจากนี้ความเข้มข้นของหัวเชื้อของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 ที่ระดับความเข้มข้น  $10^8$  และ  $10^9$  CFU/mL ให้ผลดีที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ สอดคล้องกับแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SPB, *Bacillus* sp. BMN 14 และ BMN 27 (Ghribi and Ellouze-Chaabouni, 2011; Heryania and Putra, 2017) ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสมที่ระดับความเข้มข้น  $10^8$  CFU/mL มีความเหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยพบว่าแม้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเท่ากับ  $10^7$  CFU/mL ก็ยังสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ แสดงให้เห็นว่าเมื่อผ่านไปสักระยะหนึ่งเมื่อจำนวนของเชื้อลดลงก็

สามารถช่วยในการฟื้นฟูสภาพได้ แม้จะมีการลดจำนวนของหัวเชื้อลงในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นสภาวะต่าง ๆ เช่น แหล่งคาร์บอน ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม และความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสม จึงมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มีสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ต้องการน้ำตาลกลูโคส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ณ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 0% โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นของหัวเชื้อ  $10^8$  CFU/mL ความเร็วในการบ่ม 180 rpm แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 สามารถที่จะเจริญภายใต้สภาวะที่มีความเค็มเท่ากับ 1 และ 2 % โซเดียมคลอไรด์ จึงทำให้สามารถนำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 มาประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลได้เช่นกัน

การศึกษาถึงปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 พบว่าปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ SE1 เท่ากับ  $66.00 \pm 1.54$  มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าความตึงผิวอยู่ระหว่าง 32.35 มิลลินิวตันต่อเมตร ถึง 24.87 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการฟอรัมตัวของไมเซลล์ที่ความเข้มข้นของส่วนใสเท่ากับ 7.11% และมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่พบในส่วนใสเท่ากับ 4.69 มิลลิกรัมต่อลิตร การศึกษาในครั้งนี้ให้ผลการทดลองต่างจากการศึกษาของ Deleu et al. (1999) ที่ศึกษาค่าความตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ S499 พบว่า Surfactin มีค่าความตึงผิวที่ 2.03 มิลลินิวตันต่อเมตร และมีความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการฟอรัมตัวของไมเซลล์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาของ Pathak and Keharia (2014) ได้ศึกษาแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ K1 ที่คัดแยกได้จากอากาศของต้นไทร ประเทศอินเดีย พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ K1 มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ได้และมีค่าความตึงผิวอยู่ระหว่าง 42.5 มิลลินิวตันต่อเมตร ถึง 27.9 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการฟอรัมตัวของไมเซลล์ที่ความเข้มข้น 17.50 ไมโครกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของ Jha et al. (2016) ที่ศึกษาแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ R1 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณทะเลทรายคัทซ์ ประเทศอินเดีย พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ R1 มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มลิโปเปปไทด์ได้และมีค่าความตึงผิวอยู่ระหว่าง 30 มิลลินิวตันต่อเมตร ถึง 29 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการฟอรัมตัวของไมเซลล์ที่ความเข้มข้น 19-20 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าเมื่อค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดการฟอรัมตัวเป็นไมเซลล์ต่ำจะให้ค่าความตึงผิวที่ดี

## ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ และรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

สุบัณฑิต นิมรรัตน์, สุปราณี พันธุ์วิสัย, สมฤทัย ลูกจันทร์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2561). ผลของ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ SE1. การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม วันที่ 24-25 พฤษภาคม พ.ศ. 2561. หน้า BI 28-35.

2. การยื่นจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้ โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-

## เอกสารอ้างอิง

- กฤษฎา บุญชัย จรุงธร สารินทร์ และศิริพรรณ สารินทร์. (2552). คุณสมบัติเป็นโพรของแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12 มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ 12-13 กุมภาพันธ์ 2552 หน้า 1510-1518.
- จิตติมา แก้วเรือง. (2551). การแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วและการประยุกต์ใช้ที่ดิน. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิรันดร์ รุ่งสว่าง. (2542). การผลิตและสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประเสริฐ เทียนนิมิต, ขวัญชัย สันทิพย์สมบูรณ์ และปานเพชร ชินินทร. (2554). เชื้อเพลิงและสารหล่อลื่น. กรุงเทพฯ: วี. พริน.
- ปวีณา ดิกิจ และอภิพันธ์ เสียมไหม. (2557). การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้. รายงานการวิจัยปีงบประมาณ 2557 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- รุจา สารคุณ (2548). ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิไซตลิกแอโรแมติกไฮโดรคาร์บอนในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิสาชา ภูจินดา. (2548). การใช้ประโยชน์สารลดแรงตึงผิวในการบำบัดน้ำเสีย. *วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม*, 1(1), 1-15.
- สำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 16. (2556). *น้ำมันดิบรั่วไหล คราบน้ำมันในทะเล อันตรายต่อสุขภาพ*. วันที่ค้นข้อมูล 1 กันยายน พ.ศ. 2557, เข้าถึงได้จาก <http://reo16.mnre.go.th/reo16/knowledge/detail/175>
- Abdel-Mawgoud, M. A., Hausmann, R., Lepine, F., Muller, M. M., and Deziel, E. (2011). Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production, In G. Soberon-Chavez (Ed.), *Biosurfactants* (p. 17). New York : Springer Berlin Heidelberg.
- 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(1-3), 143-151.
- Aparna, A., Srinikethan, G., and Hegde, S. (2011). Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. on biodegradation of crude oil. *2nd International Conference on Environmental Science and Technology*, 6, 71-75.

- Arima, K., Kahinuma, A., and Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of brin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, 488-494.
- Arutchelvi, J., and Doble, M. (2010). Characterization of glycolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL isolated from petroleum contaminated soil. *Applied Microbiology*, 51, 75-82.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (2000a). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, 51, 1-12.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (2000b). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.
- Barakata, K. M., Hassana, S. W. M., and Darweshb, O. M. (2017). Biosurfactant production by haloalkaliphilic *Bacillus* strains isolated from Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43, 205-211.
- Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M. A., and Moreaes, I. O. (2002). Rhampolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 54, 283-288.
- Bernheimer, A. W., and Avigad, L. S. (1970). Nature and properties of acytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 61, 361-369.
- Bhardwaj, G., Cameotra, S. S., and Chopra, H. K. (2013). Biosurfactants from Fungi: A Review. *Petroleum & Environmental Biotechnology*, 4(6), 1-6.
- Bodour, A. A., Drees, K. P., and Maier, R. M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3280-3287.
- Bottom, C. B., Hanna, S. S., and Siehr, D. J. (2010). Mechanism of the ninhydrin reaction. *Biochemical Education*, 6(1), 4-5.
- Burgos-Díaz, C., Piqué, N., Manresa, A., and Marqués, A. M. (2012). Advances in the research of new biosurfactants and their potential use in the biomedical and pharmaceutical industry. *Transworld Research Network 37/661*, 2, 151-167.
- Chaerun, S. K., Tazaki, K., Asada, R., and Kogure, K. (2004). Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30, 911-922.



- Chakrabarti, S. (n.d.). *Bacterial biosurfactant: Characterization, antimicrobial and metal remediation properties*. Master of science in life. Department of life science. National Institute of Technology Rourkela.
- Chayabutra, C., and Ju, L. K. (2000). Degradation of *n*-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 493-498.
- Chen, S. Y., Wei, Y. H., and Chang, J. S. (2007). Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (1), 67-74.
- Cheng, K. B., Jian, Z., and Wang, Z. (2008). *Emulsification properties of bacterial biosurfactants native to the Yellow River Delta on hexadecane and diesel oil*. Research Paper. Clarkson University. Retrieved June 19, 2013, from <http://web2.clarson.edu>.
- Chioma, O., Ogechukwu, M., Bright, O., Simon, O., and Chinyere, A. F. (2013). Isolation and characterization of biosurfactants producing bacteria from oil polluted soil. *Natural Sciences Research*, 3(5), 119-122.
- Christova, N., Tuleva, B., and Lalchev, Z. (2004). Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on *n*-hexadecane. *Zeitschrift für Naturforschung (C)*, 59(1-2), 70-74.
- Cooper, D. G., and Goldenberg, B. G. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2, 224 -229.
- Cooper, D. G., MacDonald, C. R., Du, S. J. B., and Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin of *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 408-412.
- Costa, S. G. V. A. O., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N., and Contiero, J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, 41, 483-488.
- Cubitto, M. A., Moran, A. C., Commendatore, M., Chiarello, M. N., Baldini, M. D., and Sineriz, F. (2004). Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*, 15(5), 281-287.
- Dadrasnia, A., and Ismail, S. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus salmalaya* for lubricating oil solubilization and biodegradation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 9848-9863.
- 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. *Process Biochemistry*, 42, 1191–1199.
- Das, P., Mukherjee, S., and Sen, R. (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresource Technology*, 100, 1015–1019.
- De'ziel, E., Le'pine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A., and Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1440, 244–252.
- Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., and Paquot, M. (1999). Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 3-10.
- Edwards, K. R., Lepo, J. E., and Lewis, M. A. (2003). Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 1309-1316.
- Fakruddin, M. (2012). Biosurfactant: Production and application. *Petroleum and Environmental Biotechnology*, 3, 1-5.
- Franzetti, A., Tamburini, E., and Banat, I. M. (2009). *Applications of biological surface active compounds in remediation technologies*. In: Sen, R. (Ed.), *Biosurfactants Bioscience Chapter Database: 3526 Chapters Now Online*. LANDES Bioscience.
- Gharaei-Fathabad, E. (2011). Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. *Drug Discovery and Development*, 1, 58-69.
- Ghazal, M. F., Moussa, L. A., Makboul, H. E., and Fayed, S. A. (2017). Screening of Some Bacilli Strains for their Abilities to Produce Biosurfactants. *Der Pharma Chemica*, 9(8), 6-12.
- Ghribi, D., and Ellouze-Chaabouni, S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology Research International*, Article ID 653654, doi:10.4061/2011/653654
- Gomathy, C., and Senthilkumar, R. (2013). Production of rhamnolipid biosurfactant from a marine *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology*, 3(3), 86-91.
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O., and Fiechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 301-305.

- Gunther, N. W., Nuñez, A., Fett, W., and Solaiman, D. K. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2288–2293.
- Heryania, H., and Putra, M. D. (2017). Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 49–54.
- Hommel, R. K. (1990). Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodegradation*, 1, 107-119.
- Hošková, H., Schreiberová, O., Jezdík, R., Chudoba J., Masák J., Sigler, K., and Rezanka, T. (2013). Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. *Bioresource Technology*, 130, 510-516.
- Hua, Z., Chen, Y., Du, G., and Chen, J. (2004). Effects of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on the biodegradation of petroleum compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 25-29.
- Ilori, M. O., Amobi, C. J., and Odocha, A. C. (2005). Factors effecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from tropical environment. *Chemosphere*, 61, 985-992.
- Ilori, M. O., Amund, O. O., Ezeani, C. J., Omoijiahina, S., and Adebusoye, S. A. (2006). Occurrence and growth potential of hydrocarbon degrading bacteria on the phylloplane of some tropical plants. *African Journal of Biotechnology*, 5, 542-545.
- Janek, T., Lukaszewicz, M., and Krasowska, A. (2013). Identification and characterization of biosurfactants produced by the arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 379-386.
- Jaysree, R. C., Basu, S., Singh, P. P., Ghosal, T., Patra, P. A., Keerthi, Y., and Rajendran, N. (2011). Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples. *Pharmacology online*, 3, 1427-1433.
- Jha, S. S., Joshi, S. S., and Geetha S. J (2016). Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 955-964.
- Joice A. P., and Parthasarathi, R. (2014). Production and characterization of biosurfactant form *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1 isolated from mangrove ecosystem. *African Journal of Biotechnology*, 13(33), 3394-3401.

- Kaeppli, O., and Finnerty, W. R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology*, 140, 707-712.
- Karant, N. G. K., Deo, P. G., and Veenanadig, N. K. (n.d.). *Microbial production of biosurfactants and their importance*. Retrieved November 24, 2013, from <http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles19.htm>
- Khehra, M. S., Saini, H. S., Sharma, D. K., Chadha, B. S., and Chimmi, S. S. (2005). Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*, 67, 55-61.
- Kiran, G. S., Thomas, T. A. Selvin, J. Sabarathnam, B., and Lipton, A. P. (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresource Technology*, 101, 2389-2396.
- Kister, H. Z. (1992). *Distillation Design*. McGraw Hill, Inc., New York
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A., and Santas, R. (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 677-686.
- Kosaric, N. (1993). *Biosurfactants: Production, properties and applications*. Marcel Dekker, New York.
- Lang, S., and Philp, J. C. (1998). Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 74, 59-70.
- Li, Z., Zhao, C., Zhang, Y., and Zhao, D. (2008). *Structure and characterization of a biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa strain KO9*. Research Paper. Chaina University. Retrieved March 31, 2014, from <http://www.zhaodongfeng.com/UploadFiles/201268103637.pdf>
- MacDonald, C. R., Cooper, D. G., and Zajic, J. E. (1981). Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 117-123.
- Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20, 48-52.
- Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58, 428-434.

- Mandai, S. M., Sharmar, S., Pinnaka, A. K., Kumari, A., and Korpole, S. (2013). Isolation and characterization of diverse antimicrobial lipopeptides produced by *Citrobacter* and *Enterobacter*. *BMC Microbiology*, 13(152), 1-9.
- Meena, K. R., Tandon, T., Sharma, A., and Kanwar, S. S. (2018). Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(03), 91-98.
- Mehmood, N., Iqbal, M., and Asgher, M. (2018). Production and optimization of biosurfactants from *Bacillus subtilis*. *EC Microbiology Research Article*, 14.5, 211-224.
- Mohan, P. K., Nakhla, G., and Yanful, E. K. (2006). Biogenetics of biodegradability of surfactants under aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.*, 40, 533-540.
- Morikawa, M., Hirata, Y., and Imanaka, T. (2000). A study on the structure function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488, 211-218.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183–198.
- Nadhem, H. H. G. (2012). Inhibitory activity of Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NH22 against *Rhizoctonia solani*. *Journal Biotechnology Research Center*, 6(1), 32-44.
- Nalini, S., and Parthasarathi, R. (2013). Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource Technology*, 147, 619-622.
- Nasr, S., Soudi, M. R., Mehrnia, M. R., and Sarrafzadeh, M. H. (2009). Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus* spp. isolated from petroleum contaminated soil. *Microbiology*, 1, 54-61.
- Noudeh, G. D., Sharififar, F., Khatib, M., Behravan, E., and Afzadi, M. A. (2010). Study of aqueous extract of three medicinal plants on cell membrane–permeabilizing and their surface properties. *African Journal of Biotechnology*, 9(1), 110-116.
- Nur Asshifa, M. N. (2009). The effects of *Pseudomonas aeruginosa* (USM-AR2) on crude oil biomodification and its potential in facilitating distillation. Dissertation (M.Sc, Industrial Biotechnology), Universiti Sains Malaysia.
- Nur Asshifa, M. N., Amirul Al-Ashraf, A., Mohamad Nasir, M. I., and Ahmad Ramli, M. Y. (2012). Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 facilitates crude oil distillation. *General and Applied Microbiology*, 58, 153-161.

- Okoliegbe, I. N., and Agarry, O. O. (2012). Application of microbial surfactant : A review. *Biotechnology*, 1, 15-23.
- Onwosi, C. O., and Odibo, F. J. C. (2012). Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 937-942.
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., and Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 633-654.
- Panilaitis, B., Castro, G. R., Solaiman, D., and Kaplan, D. L. (2007). Biosynthesis of emulsion biopolymers from agro-based feedstocks. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 531-537.
- Pathak, K. V., and Keharia, H. (2014). Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolate from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). *Biotech*, 4, 41-48.
- Perfumo, A., Banat, I. M., Canganell, F., and Marchant, R. (2006). Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 132-138.
- Persson, A., and Molin, G. (1987). Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and Vibrionaceae growing on carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26, 439-442.
- Plaza, G., Zjawiony, I., and Banat, I. (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 50(1), 71-77.
- Priya, T., and Usharani, G. (2009). Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Botany Research International*, 2, 284-287.
- Raaijmakers, J. M., Bruijn, D. I., and Kock, D. M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 699-710.
- Rachamontree, P., Tantayotai, P., and Sririyanun, M. (2015). The optimization of biosurfactant production by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. *Prawarun Agricultural Journal*, 12 (1), 67-75.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., and Banat, I. M. (2003). Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using

- bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, 90, 159-168.
- Rashedi, H., Assadi, M. M., Bonakdarpour, B., and Jamshidi, E. (2005). Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. *International Journal of Environmental Science*, 2, 121-127.
- Rehm, H. J., and Rei, I. (1981). Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 19, 73.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., and Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: Potential application in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 609-618.
- Ron, E. Z., and Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3, 229-236.
- Ron, E. Z., and Rosenberg, E., (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 249-252.
- Rosenberg, E., and Ron, E. Z. (1998). *Surface active polymers from the genus Acinetobacter*. In: D. L. Kaplan (Ed). *Biopolymers from renewable resources* (pp. 281-291). New York: Springer Berlin Heidelberg.
- Rosenberg, E., and Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 154-162
- Santa-Anna, L. M., Sebastian, G. V., Menezes, E. P., Alves, T. L. M., Santos, A. S., Pereira, N. J., and Freire, D. M. G. (2002). Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19, 159-166.
- Saravanan, V., and Vijayakumar, S. (2012). Isolation and screening of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil. *Academia and Industrial Research*, 1, 264-268.
- Schulz, D., Passeri, A., and Schmidt, M. (1991). Marine biosurfactants 1 Screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the North-Sea. *Zeitschrift für Naturforschung (C.)*, 46(3-4), 197-203.
- Shaw, N. (1970). Bacterial glycolipids. *Bacteriological Reviews*, 34(4), 365-377
- Sifour, M., Al-Jilawi, M. H., and Aziz, G. M. (2007). Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(8), 1331-1335.

- Siegmund, I., and Wagner, F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4), 265–268.
- Singh, A., Van Hamme, J. D., and Ward, O. P. (2006). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25, 99-121.
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., and Banat, I. M. (2010). Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 3687-3704.
- Suwansukho, P., Rukachisirikul, V., Kawai, F. and H-Kittikun, A. (2008). Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 87-93.
- Tahzibi, A., Kamal, F., and Assadi, M. M., (2004). Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Iranian Biomedical Journal*, 8(1), 25-31.
- Thavasi, R. Jayalakshmi, S., and Banat, I. M. (2010). *Biosurfactants from marine bacterial isolates*. In A. Mendez-Vilas (Ed), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2, 1367-1373.
- Tabatabaee, A., Mazaheri, A. M., Noohi, A. A., and Sajadian, V. A. (2005). Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2,(1), 6-12.
- Tuleva, B. K., Ivanov, G. R., and Christova, N. E. (2002). Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift für Naturforschung (C)- A Journal of Biosciences*, 57(3-4), 356–360.
- Tuleva, B., Christova, N., Jordanov, B., Nikolova-Damyanova, B., and Petrov, P. (2005). Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Zeitschrift für Naturforschung (C)*, 60(7-8), 577-582.
- Van Ginkel, C. G. (1989). Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortium of aerobic microorganisms. *Biodegradation*, 7(2), 151-164.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., and Ward, O. P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24, 604–620.
- Vasileva-Tonkova, E., and Gesheva, V. (2007). Biosurfactant production by Antarctic Facultative Anaerobe *Pantoea* sp. During growth on hydrocarbons. *Current Microbiology*, 54, 136-141.



- Vollenbroich, D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R. M., and Pauli, G. (1997). Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25, 289-297.
- Youssef, N., Duncan, K., and Nagle, D. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347.
- 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. *China University of Petroleum (Beijing) and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011*, 8, 353-356.
- Wei, Y. H., Wang, L. C., Chen, W. C., and Chen, S. Y. (2010). Production and Characterization of Fengycin by Indigenous *Bacillus subtilis* F29-3 Originating from a Potato Farm . *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 4526-4538.
- Zhang, J., Xue, Q, Gao, H., Lai, H. and Wang, P. (2016). Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. *Microbial Cell Factories*, 15(168), 1-11.