# คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* AS6 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต

# Characterization of Biosurfactant Produced by *Bacillus subtilis* AS6 Isolated from Mangrove Sediment in Phuket Province

นฤมล มีบุญ[1*] และ อทิพันธ์ เสียมไหม[2]

Naruemon Meeboon[1*] and Atipan Saimmai[2]

Received: 10 May 2018, Revised: 5 July 2018, Accepted: 22 November 2018

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต จากการศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 หลังจากเลี้ยงในอาหาร mineral salt medium (MSM) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (คลอโรฟอร์ม:เมทานอล) พบว่า การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ได้ผลผลิตสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.45 กรัมต่อลิตร มีค่า critical micelle concentration (CMC) 0.044 กรัมต่อลิตร สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ในช่วงพีเอช 6-9 อุณหภูมิระหว่าง 25-121 องศาเซลเซียส ช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-12 โดยน้ำหนัก ช่วงความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก และช่วงความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0-0.4 โดยน้ำหนัก การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) และ Mass spectroscopy พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* AS6 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบโดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,032 m/z

**คำสำคัญ:** *Bacillus subtilis*, ป่าชายเลน, ดินตะกอน, สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

---

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ตำบลท่างิ้ว อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80280

[1] Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Tha Ngio, Mueang, Nakhon Si Thammarat 80280, Thailand.

[2] คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ตำบลรัษฎา อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต 83000

[2] Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Technology, Phuket Rajabhat University, Ratsada, Muang, Phuket 83000, Thailand.

[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): nam_monna@hotmail.com

## ABSTRACT

This study was conducted to characterize the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* AS6 isolated from mangrove sediment in Phuket province. The extraction of biosurfactant from *B. subtilis* AS6 after cultured in mineral salt medium (MSM) for 54 hours was carried out by ammonium sulphate precipitation, acid precipitation and organic solvent extraction (chloroform: methanol). The results indicated that crude biosurfactant was recovered from the culture supernatant by chloroform: methanol (2:1) extraction with a yield of 0.45 g/l and had critical micelle concentration (CMC) of 0.044 g/l. The crude biosurfactant was capable to reduce surface tension of pH 6-9, temperature of 25-121°C and in the presence of NaCl up to 12% (w/v), $MgCl_2$ up to 0.1% (w/v) and $CaCl_2$ up to 0.04% (w/v). The biosurfactant obtained was purified by using column chromatography. Structure elucidation of partially purified biosurfactant performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Mass spectroscopy indicated that biosurfactant produced by *B. subtilis* AS6 consisted of amino acid and lipid with molecular mass of 1,032 m/z.


**Key words:** *Bacillus subtilis*, mangrove, sediment, biosurfactant

## บทนำ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา ซึ่งอยู่ในรูปของสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular) และที่ติดอยู่กับผนังเซลล์ (cell-bounded) (Abareethan *et al*., 2017) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแบบ amphipatic structure ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic portion) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีนและน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโนและฟอสเฟต เป็นต้น และส่วนที่ไม่มีขั้วหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) เป็นโมเลกุลกรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว (Santos *et al*., 2016) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียโดยมีโครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแตกต่างกันไป จึงต้องเลือกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ประโยชน์ตามความเหมาะสม สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น นอกจากนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงสภาพแวดล้อม เช่น ส่งเสริมการย่อยสลายและการเกิดอิมัลชั่นของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การกำจัดโลหะหนัก การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) การกำจัดน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน การบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อได้เปรียบกว่าสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากมีความเป็นพิษน้อย มีโครงสร้างที่หลากหลาย ย่อยสลายได้ง่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Ehrhardt *et al*., 2015) สามารถปรับสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ได้ดี เกิดฟองได้ดี มีความจำเพาะสูง และทนต่อสภาวะที่จำกัดได้ดี เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์

หลายชนิด เช่น *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp, *Candida antartica*, *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น (Fakruddin, 2012) แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อด้อยในส่วนของกระบวนการและต้นทุนการผลิต โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีกระบวนการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อนและมีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง จึงทำให้ไม่นิยมนำมาผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ แต่สามารถแก้ปัญหาโดยนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อลดต้นทุนในการผลิตซึ่งสามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก มีรายงานการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น กากน้ำตาล หางนม กากชานอ้อย เม็ดขนุน และเปลือกผลไม้ชนิดต่าง ๆ ไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Saimmai *et al*., 2014; Rane *et al*., 2017) มีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* และนำสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตน้ำมัน (Gudiña *et al*., 2015)

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยว คุณสมบัติและโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* AS6 ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต

## วิธีดำเนินการวิจัย

**1. อาหารเลี้ยงเชื้อ**

อาหาร Minimal Salt Medium (MSM) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): $K_2HPO_4$ 0.8; $KH_2PO_4$ 0.2; $CaCl_2$ 0.05; $MgCl_2$ 0.5; $FeCl_2$ 0.01; $(NH_4)_2SO_4$ 1.0; NaCl 5.0; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้ได้ 7.0 (Saimmai *et al*., 2012)

**2. การเตรียมกล้าเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ**

นำเชื้อ *B. subtilis* AS6 ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ร้อยละ 5 โดยปริมาตร เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อให้มีค่า OD660 เท่ากับ 0.5 แล้วถ่ายกล้าเชื้อ *B. subtilis* AS6 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

**3. วิธีการวิเคราะห์**

3.1 การทดสอบ Drop collapse ของหยดน้ำมัน (Bodour and Maier, 1998)

หยดน้ำมันปาล์ม 2 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ 96-microwell plate วางพักไว้นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบโดยเติมตัวอย่างสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 5 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มนาน 1 นาที สังเกตลักษณะของหยดสารละลายส่วนใส การแผ่ออกของสารละลายแสดงถึงการมีสารลดแรงตึงผิวในตัวอย่าง วัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมลบ คือ อาหารเลี้ยง MSM บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้ในหน่วยมิลลิเมตร

3.2 การวัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายส่วนใส (Yakimov *et al*., 1995)

วัดค่าแรงตึงผิวโดยใช้เครื่อง Ring Tensiometer (Torsion balance Model OS, Torsion Balance Supplies, Warwickshire, England) โดยนำตัวอย่างสารละลายส่วนใสที่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน plate วางวงแหวน platinum ลงในสารละลาย จากนั้นเลื่อนวง

แหวน platinum ขึ้นจากสารละลายช้าๆ จนวงแหวน platinum หลุดจากสารละลายส่วนใส อ่านค่าแรงตึงผิวที่ได้ (มิลลินิวตันต่อเมตร) (Kim *et al*., 2002) การหาค่า critical micelle concentration (CMC) หรือความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์หรือลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุดในหน่วยกรัมต่อลิตร (g/l) โดยนำสารลดแรงตึงผิวที่ได้ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ไม่สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้อีกต่อไป ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง

**4. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ**

4.1 การตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช โดยใช้ 6 M HCl ปรับพีเอช เป็น 2.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน นำไปล้างด้วย 100 mM HCl ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 2 N NaOH และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization โดยส่วนสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้ง เรียกว่า สารสกัดหยาบ (crude BS)

4.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำสารละลายส่วนใสสกัด 2 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (ดัดแปลงจาก Mercade *et al*., 1996) โดยใช้กรวยแยก (separation funnel) นำชั้นของตัวทำละลายกำจัดน้ำโดยการเติม anhydrous $Na_2SO_4$ แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในเครื่อง evaporator

4.3 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 40 ถึง 60 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือโดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 ดาลตัน ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization

**5. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้**

5.1 การหาค่า critical micelle concentration (CMC)

นำสารสกัดหยาบและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ sodiumdedocyl sulfate (SDS) และ Triton X-100 ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้ววัดค่าแรงตึงผิว ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

5.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารสกัดหยาบและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่เหมาะสมละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการปรับพีเอชด้วย 1N HCl หรือ 1 N NaOH ให้มีค่าพีเอช เท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ แล้ววัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว

5.3 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารสกัดหยาบและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่เหมาะสมละลายด้วยน้ำกลั่น นำตัวอย่างบ่มที่

อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและบ่มที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว

5.4 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารสกัดหยาบและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่เหมาะสม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่มีชนิดของเกลือและความเข้มดังนี้

5.4.1 NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 โดยน้ำหนัก

5.4.2 $CaCl_2$ ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 โดยน้ำหนัก

5.4.3 $MgCl_2$ ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 โดยน้ำหนัก

5.4.4 ละลายสารสกัดหยาบและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ในน้ำทะเล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวในตัวอย่างแต่ละข้อ

**6. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้**

6.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

ตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบด้วย TLC ที่มี silica gel 60 F254 เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 ตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบด้วย TLC RP-18 F254s เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ acetonitrile : น้ำ ในอัตราส่วนต่างกันเพื่อหา mobile phase ที่ดีที่สุด จากนั้นเป่าให้แห้ง แล้วใช้ spraying reagent ชนิดต่างๆ ในการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ rhodomine B เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกรดไขมัน (McInerney *et al*., 1990) ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ (Wilkinson, 1972) ใช้ anisaldehyde ในการวิเคราะห์น้ำตาล (Schulz *et al*., 1991) เลือก mobile phase ที่สามารถแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป

6.2 การแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ

ใช้คอลัมน์ SEP-PAK ($C_{18}$) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ด้วยเมทานอลร้อยละ 100 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาดคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย acetonitrile ร้อยละ100 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำสารสกัดหยาบ 0.5 กรัม มาละลายด้วย acetonitrile:น้ำ (1:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และใส่ในคอลัมน์ จากนั้นชะด้วย acetonitrile:น้ำ (1:1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรและลดความมีขั้วของตัวเคลื่อนที่โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile:น้ำ เป็น 2:1, 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ ปริมาตรที่ใช้ชะคอลัมน์อัตราส่วนละ 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนที่แยกได้จากโครมาโตกราฟีแบบดูดซับแต่ละส่วนตรวจสอบองค์ประกอบด้วยวิธี TLC นำส่วนที่มีโครมาโตแกรมเหมือนกันรวมเข้าด้วยกัน ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวและเก็บส่วนที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวสูงที่สุดไปตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้น

6.3 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารที่พบกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยใช้ Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) และ Mass spectroscopy โดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป R (https://cran.r-project.org/bin/windows/base/) SPSS version 3.5.0

(Venables *et al*., 2009) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) พร้อมทั้งคำนวณหาค่าความถี่ ร้อยละ และค่าเฉลี่ย โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

## ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

### 1. ศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* AS6 เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ทำการเหวี่ยงเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสมาเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (1 N) และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (chloroform/ methanol) จากวิธีการเก็บเกี่ยวทั้งสามวิธีพบว่าการตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการปรับค่าพีเอชของสารละลายส่วนใสให้เท่ากับ 2.0 สามารถเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 4.51 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่า CMC และกิจกรรมในการลดแรงตึงผิวพบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด (ตารางที่ 1) สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบได้ 0.45 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุด (CMC) ที่ 0.044 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น CMC สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์จาก 72 เป็น 28 มิลลินิวตันต่อเมตร สอดคล้องกับ Saimmai *et al*. (2015) ที่ศึกษาการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Serratia marcescens* ST2 พบว่าวิธีการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุด (5.51) แต่เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวพบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ให้ค่ากิจกรรมที่สูงกว่า

เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (chloroform/methanol) และสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ซึ่งเป็นตัวแทนของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มมีประจุลบและไม่มีประจุ (nonionic) ตามลำดับ พบว่ามีค่า CMC เท่ากับ 0.218 และ 1.750 กรัมต่อลิตร สำหรับ SDS และ Trition X-100 ตามลำดับ โดยมีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ที่ค่า CMC จาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 49 และ 45 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก เชื้อ *B. subtilis* AS6 แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในทางการค้าได้

**ตารางที่ 1** เปรียบเทียบวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6

| Method of recovery | | Biosurfactant production (g/l)* | CMC (g/l)* | Surface tension at CMC (mN/m)* |
|---|---|---|---|---|
| pH precipitation | pH 2 | 4.51±0.10$^{a**}$ | 1.850±0.00$^{a**}$ | 45.2±2.10$^{a**}$ |
| | pH 3 | 2.18±0.04$^{b}$ | 0.775±0.00$^{b}$ | 37.1±1.20$^{b}$ |
| | pH 4 | 0.94±0.02$^{d}$ | 0.538±0.00$^{c}$ | 30.5±2.00$^{c}$ |
| Ammonium sulfate | 40 % | 0.63±0.01$^{f}$ | 0.219±0.00$^{e}$ | 30.2±1.50$^{c}$ |
| precipitation | 50 % | 0.86±0.01$^{e}$ | 0.219±0.00$^{e}$ | 38.4±2.30$^{b}$ |
| | 60 % | 1.20±0.01$^{c}$ | 0.438±0.00$^{d}$ | 42.0±2.00$^{a}$ |
| $CHCl_3$ : MEOH extraction (2:1) | | 0.45±0.02$^{g}$ | 0.044±0.00$^{f}$ | 28.0±0.20$^{d}$ |

*Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

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

**2. คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้**

2.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

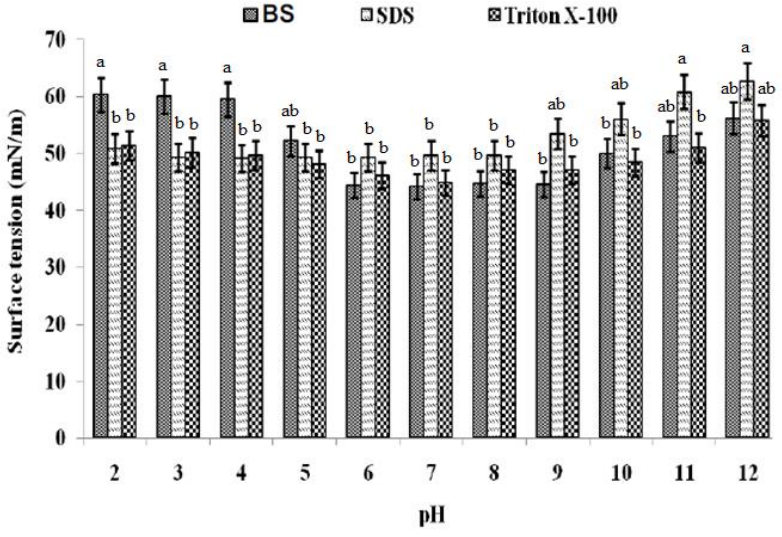
การมีกิจกรรมในช่วงของพีเอชที่กว้างเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Mulligan, 2009) งานวิจัยนี้จึงเลือกช่วงพีเอชระหว่าง 2.0-12.0 ในการทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* AS6 นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *B. subtilis* AS6 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC คือ 0.044, 0.218 และ 1.750 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับพีเอชของตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 2.0-12.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วทดสอบกิจกรรมในการลดแรงตึงผิว ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 1 พบว่าค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 เพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชลดลงต่ำกว่า 5.0 และมากกว่า 10.0 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเกิดการตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรดสูงและด่างสูง (Sutthivanitchakul *et al*., 1999) แต่กิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงพีเอช 6.0-9.0 ในขณะที่ SDS และ Triton X-100 มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวคงตัวในช่วงพีเอช 3.0-8.0 และพีเอช 5.0-8.0 ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* AS6 ลดแรงตึงผิวได้น้อยลงในช่วงพีเอชเป็นกรดและค่าแรงตึงผิวจะคงตัวในช่วงค่าพีเอช 7-10 เนื่องจากเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น NaOH ทำให้ความคงตัวของไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีขึ้น โดย $Na^+$ จะจับกับโครงสร้างของกรดไขมันในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทำให้การเกิดไมเซลล์ดีขึ้น (Li and Chen, 2009) ซึ่งผลของพีเอชต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย (Klein and Wagner, 1987; Abouseoud *et al*., 2008) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Vaz *et al*. (2012) ศึกษาพีเอชต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางการค้า ได้แก่ Glucopone®215, Glucopone®650, Findet®1214N/23 และ linear alkylbenzene sulfonates (LAS) พบว่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวทางการค้าอยู่ในพีเอชช่วงกว้าง 3.0-10.0 แต่

กิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นที่พีเอช 5.0-10.0 และลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางส่วนจะตกตะกอนทำให้ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น (Nitschke and Pastore, 2006) สอดคล้องกับ Silva *et al.* (2014) และ Saimmai *et al.* (2018) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas cepacia* CCT6659 และ *Labrenzia aggregate* KP-5 ตามลำดับ พบว่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากเชื้อทั้งสองชนิดมีค่าคงที่ในช่วงพีเอช 6.0-10.0

2.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

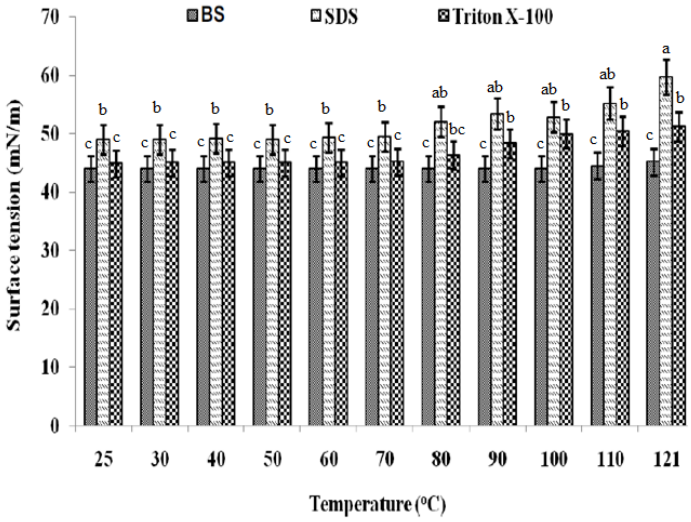
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งในสภาวะอุณหภูมิห้อง เช่น ยา อาหาร หรือการบำบัดของเสียในธรรมชาติ และสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน (Singh *et al*., 2018) งานวิจัยนี้จึงเลือกช่วงอุณหภูมิระหว่าง 25-121 องศาเซลเซียส ในการทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* AS6 เมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *B. subtilis* AS6 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC คือ 0.044, 0.218, และ 1.750 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วตั้งไว้ให้อุณหภูมิกลับลงมาที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบกิจกรรมในการลดแรงตึงผิว ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 2

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ซึ่งเห็นได้จากค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25-110 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$>0.05) และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ยังคงต่ำกว่า 50 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งแตกต่างกับผลของอุณหภูมิต่อสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SDS และ Triton X-100 ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25-80 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมในการลดแรงตึงผิวน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *B. subtilis* AS6 เนื่องจากเกิดปฏิกิริยา




**ภาพที่ 1** ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 (BS) และสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Triton X-100)

Different superscript letters in the picture indicate significant differences ($p$<0.05)




**ภาพที่ 2** ผลของระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 (BS) และสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Triton X-100)

Different superscript letters in the picture indicate significant differences ($p$<0.05)

ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สายของไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล SDS และ Triton X-100 จากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (autoclave) ทำให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวลดลง (Pornsunthorntawee *et al*., 2008) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษา Wang *et al*. (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* JA-1 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 4-121 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแรงตึงผิวต่ำกว่า 35 มิลลินิวตันต่อเมตร เช่นเดียวกับ Saimmai *et al*. (2018) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Labrenzia aggregate* KP-5 โดยใช้แป้งจากเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ลดลงเล็กน้อย (3 มิลลินิวตันต่อเมตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

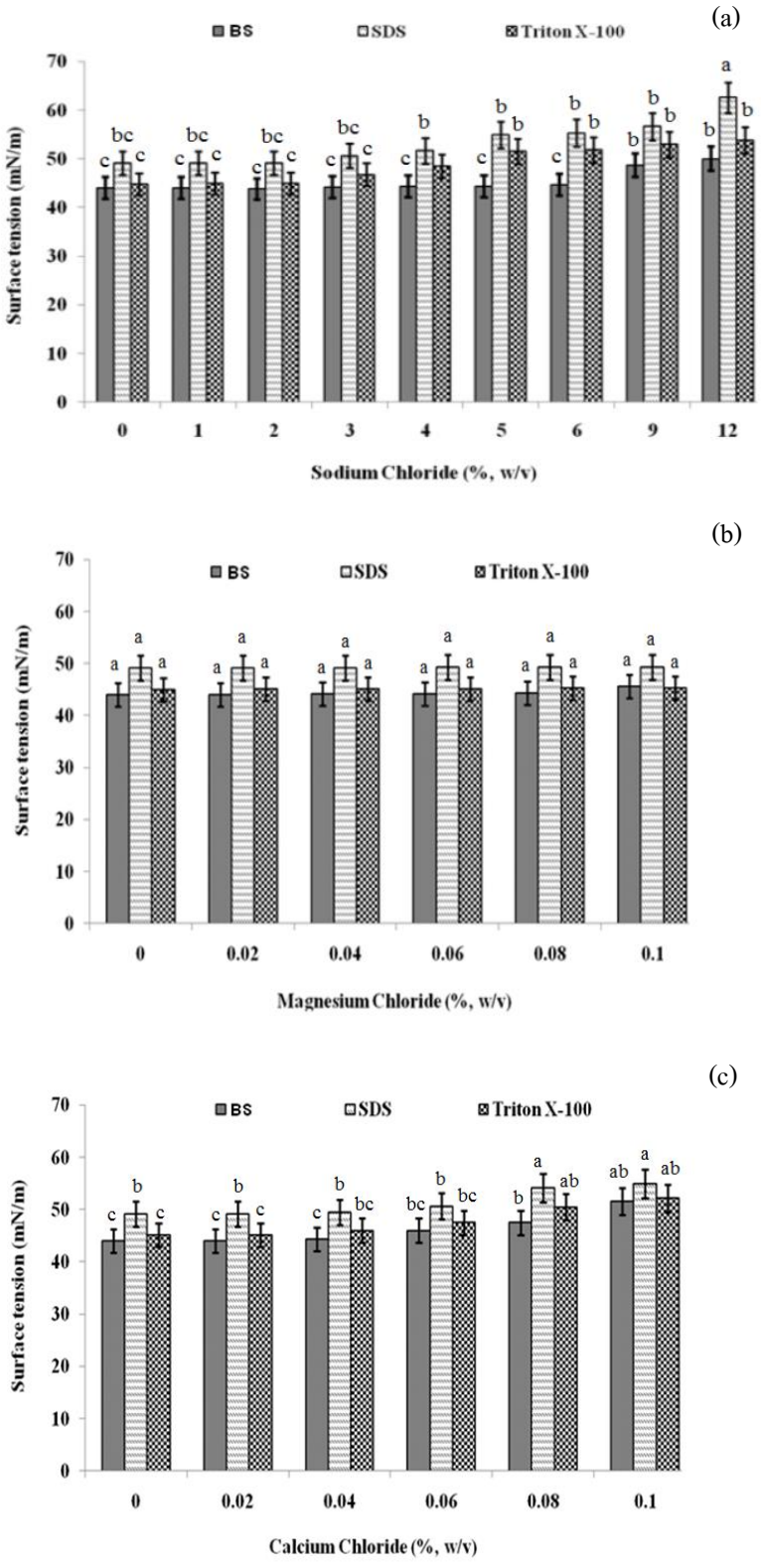
2.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเล โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำทะเลอาจมีผลต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นจึงต้องศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* AS6 พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1-6 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) แต่กิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 9 และ 12 โดยน้ำหนัก โดยค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจาก 44 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 48.66 และ 50.00 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมการลดแรงตึงผิวมีประสิทธิภาพลดลง สำหรับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีก็ให้ผลสอดคล้องในทิศทางเดียวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้โดยพบว่า

กิจกรรมในการลดแรงตึงผิวของ SDS และ Triton X-100 มีประสิทธิภาพลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น จากรายงานของ Thimon *et al*. (1992) พบว่าไอออนของเกลือจะมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากไอออนของเกลือจะจับหมู่คาร์บอกซิลิกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่งผลให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวมีประสิทธิภาพลดลง (ภาพที่ 3a) ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Li and Chen (2009) ศึกษาผลของ $Na^+$ (monovalention) ต่อการเกิดไมเซลล์ของ surfactin พบว่า $Na^+$ มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย $Na^+$ จะจับกับสายของกรดไขมันที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ มีผลต่อประจุไฟฟ้าสุทธิ (electrostatic repulsions) ของ surfactin ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์ได้ง่ายขึ้น ค่า CMC ของ surfactin จึงลดลง

ผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* AS6 (ภาพที่ 3b) แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี SDS และ Triton X-100 โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าแรงตึงผิวอยู่ในช่วง 44-46 มิลลินิวตันต่อเมตร และจากภาพที่ 3c ศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก พบว่าที่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.04 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี SDS และ Triton X-100 (ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95) แต่เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 0.06 ค่าแรงตึงผิวค่อย ๆ เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองของ Maneerat and Phetrong (2007) ศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ซึ่งแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากเชื้อ *Myroides* sp. SM1 มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-9 โดยน้ำหนัก และการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้เพียงเล็กน้อย แต่การเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4-18 มิลลิโมล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูญเสียกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน

นอกจากการทดสอบผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้วยังมีการศึกษาการใช้น้ำทะเลในการทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* AS6 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ด้วย เพื่อดูผลโดยรวมขององค์ประกอบต่างๆ ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งสามชนิด ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังคงมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวในน้ำทะเลโดยให้ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 44.3 มิลลินิวตันต่อเมตร กิจกรรมสูงกว่า Triton X-100 และ SDS ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 48.3 และ 50.0 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการลดแรงตึงผิวในสภาวะปกติ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด คือ 44.0 มิลลินิวตันต่อเมตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* AS6 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเลได้ (ตารางที่ 2)




**ภาพที่ 3** ผลของเกลือชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 (BS) และสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Triton X-100)

Different superscript letters in the picture indicate significant differences ($p$<0.05)

**ตารางที่ 2** ผลของน้ำทะเลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 และสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Triton X-100)

| Surfactant | Surface tension (mN/m) * | |
|---|---|---|
| | Dissolved in seawater | Dissolved in distilled water |
| Crude extract | 44.3±0.50$^{c**}$ | 44.0±0.00$^{c**}$ |
| SDS | 50.0±1.00$^{a}$ | 49.1±0.20$^{a}$ |
| Triton X-100 | 48.3±0.70$^{b}$ | 45.0±0.00$^{b}$ |

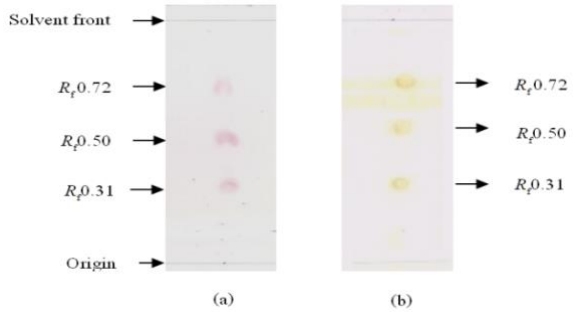
* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

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

**3. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้**

3.1 Normal-phase chromatography

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย TLC ที่มี silica gel 60 F254 เป็น stationary phase นำไปแช่ใน mobile phase คือ hexane:ethyacetate (2:1) โดยปริมาตรเมื่อตรวจสอบด้วย spaying reagent ทั้ง 3 ชนิด คือ anisaydehyde, ninhydrin และ iodine vapor เพื่อตรวจหาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารที่เป็นหมู่น้ำตาล กรดอะมิโน และไขมัน ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 มีปฏิกิริยากับ ninhydrin และ iodine vapor (ภาพที่ 4) แสดงว่าองค์ประกอบของสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบจึงน่าจะมี โครงสร้างเป็นชนิดลิโปเปบไทด์ จากการแยกองค์ประกอบของสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึง ผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 โดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟีแบบ normal phase โดยใช้ hexane:ethyacetate อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตรเป็น mobile phase พบว่าสามารถ แยกสารสกัดหยาบออกได้เป็น 3 กลุ่มโดยใช้ ninhydrin และ iodine เป็น spaying reagent โดยมีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.31, 0.50 และ 0.72 (ภาพที่ 4) เมื่อตรวจวัดกิจกรรมโดยใช้วิธี drop collapsing test พบว่ากลุ่มสารที่มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.50 มีค่ากิจกรรมมากที่สุด (ตารางที่ 3) จึงเลือกใช้สารกลุ่มนี้ในการทำบริสุทธิ์ขั้นต่อไป




**ภาพที่ 4** ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 หลังจากการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี normal-phase chromatography โดยใช้ ninhydrin (a) และ iodine vapor (b) เป็น spraying reagent

**ตารางที่ 3** วิธีการทำบริสุทธิ์และกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน

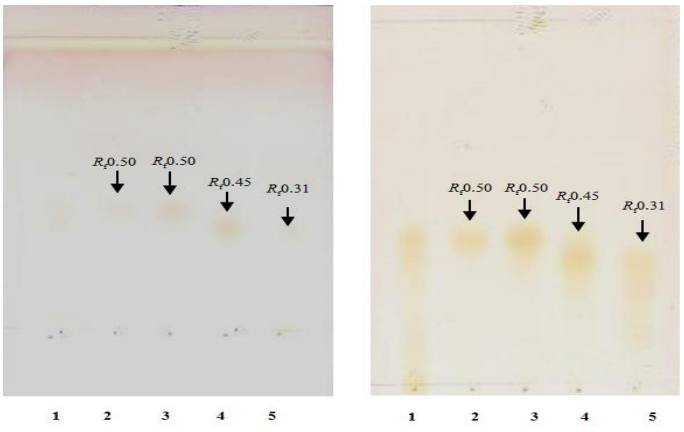
| Solvents used as eluent | Proportion | $R_f$ | Drop-collapsing test (mm)* |
|---|---|---|---|
| Normal-phase | | | |
| $CH_2Cl_2$ : $CHCl_3$ | 1:1 | 0.72 | 1.50±0.50 |
| EtOAc : $CHCl_3$ | 1:1 | 0.50 | 3.85±0.90 |
| EtOAc : $CHCl_3$ | 1:2 | 0.31 | 0 |
| Reverse-phase** | | | |
| $H_2O$ : MEOH | 9:1 | 0.50 | 3.85±0.50 |
| | 9:2 | 0.45 | 1.50±0.50 |
| | 9:4 | 0.31 | 0 |

* Values are given as means±SD from triplicate determinations.

** Reverse-phase chromatography was performed by using fraction B (Rf = 0.49) from first step.

Commercial surfactants have drop-collapsing test as 4.00±0.50 mm.

3.2 Reverse-phase chromatography ทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบโดยใช้คอลัมน์ SEP-PAK ($C_{18}$) ที่มี mobile phase เป็นน้ำและเมทานอลในอัตราส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าสามารถ แยกสาร $R_f$0.50 ออกได้เป็น 3 กลุ่มโดยใช้ ninhydrin และ iodine เป็น spaying reagent โดยมีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.50, 0.45 และ 0.31 (ภาพที่ 5) เมื่อตรวจวัดกิจกรรมโดยใช้วิธี drop collapsing test พบว่ากลุ่มสารที่มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.50 มีค่ากิจกรรมมากที่สุด (ตารางที่ 3) จึงเลือกใช้สารกลุ่มนี้ในการศึกษาขั้นต่อไป




(a) (b)

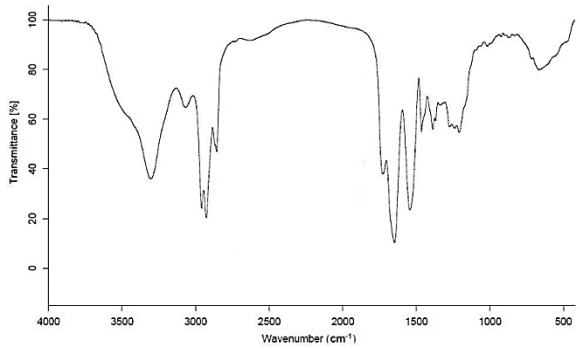
**ภาพที่ 5** ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 หลังจากการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี reverse-phase chromatography โดยใช้ ninhydrin (a) และ iodine vapor (b) เป็น spraying reagent

3.3 Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

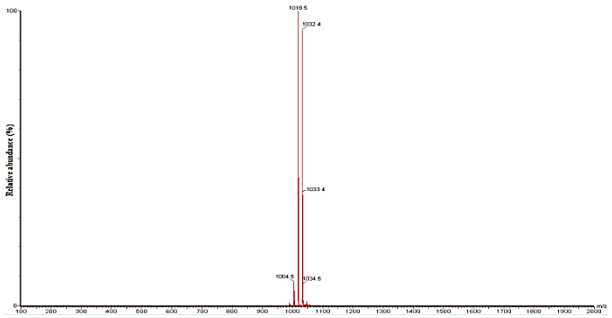
เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย FT-IR ซึ่งใช้ในการศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสาร ผลจาก FT-IR spectrum พบการยืดตัวของ O-H ที่ 3305 $cm^{-1}$, การยืดตัวของ C-H ที่ 2926 และ 1425 $cm^{-1}$ การยืดตัวของ C-O ที่ 1648 และ 1736 $cm^{-1}$ และการยืดตัวของ C-O-C ที่ 1072 $cm^{-1}$ ซึ่งการวิเคราะห์ผลจาก FT-IR spectrum บ่งบอกถึงการมีน้ำตาลและไขมันเป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 6)

3.4 Mass spectroscopy

ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 หลังจากการทำบริสุทธิ์ด้วย liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS) พบว่าสามารถตรวจพบสัญญาณที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 1,004, 1,018 และ 1,032 m/z (ภาพที่ 7) โดยสัญญาณที่ห่างกัน 14 m/z มาจากการแตกตัวของหมู่เมทิล ($CH_2$) มวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 มีค่าเท่ากับ 1,032 m/z เนื่องจากเป็นมวลโมเลกุลสูงสุดที่วิเคราะห์พบอย่างชัดเจน สอดคล้องกับรายงานของ Roongsawang *et al.* (2002) ที่ศึกษาพบว่ามวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จะอยู่ในช่วง 1,007-1,035 m/z รายงานนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่กล่าวถึงการผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จากเชื้อแบคทีเรียในจีนัส Inquilinus




**ภาพที่ 6** FT-IR spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 หลังจากการทำบริสุทธิ์




**ภาพที่ 7** Mass spectrum ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 หลังจากการทำบริสุทธิ์

## สรุป

วิธีการที่เหมาะสมในเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *subtilis* AS6 คือการสกัดด้วยด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 0.45 กรัมต่อลิตร โดยมีค่า CMC และค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 0.044 กรัมต่อลิตร และ 28.0 มิลลินิวตันต่อเมตร ตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวต่อค่าพีเอช อุณหภูมิ และเข้มข้นของเกลือชนิดต่างๆ เทียบเท่าสารลดแรงตึงผิวทางการค้า (SDS และ Triton X-100) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีความคงตัวต่อน้ำทะเลสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวทางการค้า หลังจากการทำบริสุทธิ์แล้ววิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก จากคุณสมบัติและความคงตัวต่อปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวทางการค้าผนวกกับความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการนำไปใช้ในด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร การเกษตร การบำบัดสารพิษในสิ่งแวดล้อม โดยการวิจัยเพื่อลดต้นทุนในการผลิตรวมทั้งการใช้แหล่งวัตถุดิบราคาถูกเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้การผลิตและใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพทางการค้าเกิดขึ้นได้

## เอกสารอ้างอิง


Abareethan, M., Venkatesh, R., Leelavathi, P. and Suganya, A. 2017. Isolation and biochemical characterization of biosurfactant from soil sample. **International Journal of Zoology and Applied Biosciences** 2(3): 137-144.

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabi, A. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination** 223: 143-151.

Bodour, A.A. and Maier, R.M. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods** 32: 273-280.

Ehrhardt, D.D., Secato, J.F.F. and Tambourgi, E.B. 2015. Biosurfactant production by *bacillus subtilis* using the residue from processing of pineapple, enriched with glycerol, as substrate. **Chemical Engineering Transactions** 43: 277-282.

Fakruddin, M. 2012. Biosurfactant: Production and application. **Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology** 3(4): 1-5.

Gudiña, E.J., Fernandes, E.C., Rodrigues, A.I., Teixeira, J.A. and Rodrigues, L.R. 2015. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in Microbiology** 6(59): 1-7.

Kim, H.S., Jeon, J.W., Lee, H.W., Park, Y., Seo, W.T., Oh, H.M., Katsuragi, T., Tani, Y. and Yoon, B.D. 2002. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters** 24: 225-229.

Klein, J. and Wagner, F. 1987. Different strategies to optimize the production phase of immobilised cells. **Annals of the New York Academy of Sciences** 501: 306-316.

Li, J.L. and Chen, B.H. 2009. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Materials** 2: 76-94.

Maneerat, S. and Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** 29: 781-791.

McInerney, M.J., Javaheri, M. and Nagle Jr., D.N. 1990. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Journal of Industrial Microbiology** 5: 95-102.

Mercade, M.E., Monleon, L., de Andres, C., Rodon, I., Martinez, E., Espuny, M.J. and Manresa, A. 1996. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. **Journal of Applied Bacteriology** 81: 161-166.

Mulligan, C.N. 2009. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science** 14: 372-378.

Nitschke, M. and Pastore, G. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology** 97: 336-341.

Pornsunthorntawee, O., Arttaweeporn, N., Paisanjit, S., Somboonthanate, P., Abe, M., Rujiravanit, R. and Chavadej, S. 2008. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochemical Engineering Journal** 42: 172-179.

Rane, A.N., Baikar, V.V., Kumar, V.R. and Deopurkar, R.L. 2017. Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *bacillus subtilis* ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. **Frontiers in Microbiology** 8: 1-7.

Roongsawang, N., Thaniyavarn, J., Thaniyavarn, S., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M. and Kanaya, S. 2002. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. **Extremophiles** 6(6): 499-506.

Saimmai, A., Maneerat, S. and Chooklin, C.C. 2018. Using corn husks powder as a novel substrate to produce a surface active compound from *Labrenzia aggregate* KP-5. **Journal of Surfactants and Detergents** 21(4): 523-539.

Saimmai, A., Riansa-ngawong, W., Maneerat, S. and Dikit, P. 2015. Isolation and screening of bioemulsifier-producing bacteria using used palm oil as a substrate, pp. 49-53. *In* **Biotechnology International Congress (BIC) 2015 (Biotechnology for Healthy Society).** National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Saimmai, A., Chooklin, C.S., Petmeaun, S. and Maneerat, S. 2014. Isolation and characterization of a biosurfactant from *Deinococcus caeni* PO5 using jackfruit seed powder as a substrate. **Annals of Microbiology** 1: 1-14.

Saimmai, A., Tani, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2012. Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant producing bacteria. **Annals of Microbiology** 62: 1757-1767.

Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A. and Sarubbo, L.A. 2016. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st

century. **International Journal of Molecular Sciences** 17: 1-31.

Schulz, D., Pasheri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Gunkel, W. 1991. Marine biosurfactants, I. screening for biosurfactant among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea. **Zeitschrift für Naturforschung C** 46: 197-203.

Silva, N.M.P.R., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A. and Sarubbo, L.A. 2014. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 3: 132-139.

Singh, R., Glick, B.R. and Rathore, D. 2018. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: a review. **Pedosphere** 28(2): 170-189

Sutthivanitchakul, B., Thaniyavorn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Biosurfactant production by *Bacillus lichenisformis* F2.2. **Thai Journal Biotechnology** 1: 46-53.

Thimon, L., Peypoux, F. and Michel, G. 1992. Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis* with inorganic cations. **Biotechnology Letters** 14: 713-718.

Vaz, D.A., Gudinab, E.J., Alameda, E.J., Teixeira, J.A. and Rodrigues, L.R. 2012. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 89: 167-174.

Venables, W.N., Smith, D.M. and The R development core team. 2009. **An introduction to R, notes on R: a programming environment for data analysis and graphics, Version 3.5.0.** Available Source: http://cran.r-project.org, April 23, 2018.

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. **Petroleum Science** 8: 353-356.

Wilkinson, S.G. 1972. Composition and structure of the ornithine-containing lipid from *Pseudomonas rubescens*. **Biochimica et Biophysica Acta** 270: 1-17.

Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H.L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology** 61: 1706-1713.