

## คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* AS6 ที่คัด แยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต

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

นฤมล มีบุญ<sup>1\*</sup> และ อทิพันธ์ เสียมไหม<sup>2</sup>  
Naruemon Meeboon<sup>1\*</sup> and Atipan Saimmai<sup>2</sup>

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต จากการศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 หลังจากเลี้ยงในอาหาร mineral salt medium (MSM) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต กรด และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (chloroform: methanol) พบว่า การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ได้ผลิตสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.45 กรัมต่อลิตร มีค่า critical micelle concentration (CMC) 0.044 กรัมต่อลิตร สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ในช่วงพีเอช 6-9 อุณหภูมิระหว่าง 25-121 องศาเซลเซียส ช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-12 โดยน้ำหนัก และช่วงความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก ส่วนแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 0.06 โดยน้ำหนัก มีผลลบต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิว การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพถึงบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) และ Mass spectroscopy พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* AS6 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบโดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,032 m/z

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

#### 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). 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<sub>2</sub> up to 0.1% (w/v) and CaCl<sub>2</sub> up to 0.04% (w/v). The biosurfactant obtained was purified by using column chromatography. Structure elucidation of partially purified biosurfactant 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.

**Keyword:** *Bacillus subtilis*, mangrove sediment, biosurfactant

<sup>1</sup> คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ตำบลท่าม่วง อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80280

<sup>1</sup> Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Tha Ngio, Mueang, Nakhon Si Thammarat, 80280, Thailand

<sup>2</sup> สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ตำบลกระบุรี อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต 83000

<sup>2</sup> Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Technology, Phuket Rajabhat University, Ratsada, Muang, Phuket 83000, Thailand

ผู้รับผิดชอบงานไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail) : nam\_monna@hotmail.com

## 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 และใช้ในการปรับปรุงสภาพแวดล้อม เช่น ส่งเสริมการย่อยสลายและการเกิดอิมัลชันของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน การกำจัดโลหะหนัก การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) การกำจัดน้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในดิน การบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีข้อได้เปรียบกว่าสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ทางเคมีเนื่องจากมีความเป็นพิษน้อย มีโครงสร้างที่หลากหลาย ย่อยสลายได้ง่าย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Ehrhardt et al., 2015) สามารถปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ได้ดี เกิดฟองได้ดี มีความจำเพาะสูง และทนต่อสภาวะที่จำกัดได้ดี เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp, *Candida antartica*, *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น (Fakruddin, 2012) มีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* และนำสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตน้ำมัน (Gudina et al., 2015)

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยว คุณสมบัติและโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* AS6 ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1.วิธีการทดลอง

#### 1.1 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 ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้ได้ 7.0 (Saimmai et al., 2012)

## 1.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อ *B. subtilis* AS6 ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ร้อยละ 5 โดยปริมาตร เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อให้มีค่า OD<sub>660</sub> เท่ากับ 0.5

ถ่ายกล้าเชื้อ *B. subtilis* AS6 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก พี่เชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

## 1.3 วิธีการวิเคราะห์

### 1.3.1 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 วัดความกว้างของความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยง MSM บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้ในหน่วยมิลลิเมตร

### 1.3.2 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 จากนั้นเลื่อนวงแหวน platinum ขึ้นจากสารละลายช้าๆ จนวงแหวน platinum หลุดจากสารละลายส่วนใส อ่านค่าแรงตึงผิวที่ได้ (mN/m) (Kim et al., 2002) การหาค่า critical micelle concentration (CMC) หรือความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์ หรือลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุดในหน่วย กรัมต่อลิตร (g/l) โดยนำสารลดแรงตึงผิวที่ได้ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น จนถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ไม่สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้อีกต่อไป ทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง

## 1.4 การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

### 1.4.1 ตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช

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 จากนั้นเก็บตะกอน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน นำไปล้างด้วย 100 mM HCl หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นและ

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 2 N NaOH และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization โดยส่วนสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้ง เรียกว่า สารสกัดหยาบ (crude BS)

#### 1.4.2 สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำสารละลายส่วนสกัด 2 ครั้งด้วย chloroform/methanol ในอัตราส่วน 2:1 (ดัดแปลงจาก Mercade et al., 1996) โดยใช้กรวยแยก (separation funnel) นำขึ้นของตัวทำละลายกำจัดน้ำโดยการเติม anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในเครื่อง evaporator

#### 1.4.3 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายส่วนสกัดที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 40 ถึง 60 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือโดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 คาลตัน ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นเป็นเวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทั้งไขว้กัน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization

### 1.5 ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

#### 1.5.1 การหาค่า critical micelle concentration (CMC)

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการที่เลือกได้จากข้อ 1.4 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Triton X-100 ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้ววัดค่าแรงตึงผิว ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

#### 1.5.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดจากข้อ 1.4 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่ได้จากข้อ 1.5.1 ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการปรับพีเอชด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ แล้ววัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว

#### 1.5.3 ความคงตัวของอุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดจากข้อ 1.4 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่ได้จากข้อ 1.5.1 ละลายด้วยน้ำกลั่น นำตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ 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

#### 1.5.4 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดจากข้อ 7 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC ที่ได้จากข้อ 1.5.1 ละลายด้วยน้ำกลั่นที่มี NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 ตามลำดับ หรือ  $\text{CaCl}_2$  หรือ  $\text{MgCl}_2$  ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ หรือละลายสารสกัดหยาบที่ได้ในน้ำทะเล จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว

### 1.6 ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

#### 1.6.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

ตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการข้อ 1.4 ด้วย TLC ที่มี silica gel 60 F254 เป็น stationary phase โดยนำไปใช้ใน mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล ในอัตราส่วนต่างกันเพื่อหา mobile

phase ที่ดีที่สุด หรือตรวจสอบองค์ประกอบในสารสกัดหยาบด้วย TLC RP-18 F254s เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ acetonitrile : น้ำ ในอัตราส่วนต่างกันเพื่อหา mobile phase ที่ดีที่สุด จากนั้นนำไปให้แห้ง แล้วใช้ spraying reagent ชนิดต่าง ๆ ในการตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ rhodamine B เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกรดไขมัน (McInerney et al., 1990) ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ (Wilkinson, 1972) ใช้ anisaldehyde ในการวิเคราะห์น้ำตาล (Schulz et al., 1991) เลือก mobile phase ที่สามารถแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป

#### 1.6.2 การแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ

ใช้คอลัมน์ SEP-PAK ( $C_{18}$ ) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ด้วยเมทานอล 100% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาดคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย acetonitrile 100% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการข้อ 1.4 มาละลายด้วย acetonitrile:น้ำ (1:1) และใส่ในคอลัมน์ จากนั้นชะด้วย acetonitrile:น้ำ (1:1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรและลดความเข้มข้นของตัวเคลื่อนที่โดยใช้อัตราส่วนของ acetonitrile:น้ำ เป็น 2:1, 3:1 และ 4:1 ตามลำดับ ปริมาตรที่ใช้ชะคอลัมน์อัตราส่วนละ 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนที่แยกได้จากโครมาโตกราฟีแบบดูดซับแต่ละส่วนตรวจสอบองค์ประกอบด้วยวิธี TLC นำส่วนที่มีโครมาโตแกรมเหมือนกันรวมเข้าด้วยกัน ทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวและเก็บส่วนที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวสูงที่สุดไปตรวจสอบองค์ประกอบเบื้องต้น

#### 1.6.3 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารที่พบกิจกรรมการลดแรงตึงผิวในข้อ 1.6.2 โดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) และ mass spectroscopy โดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### ผลและวิจารณ์ผล

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

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* AS6 เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ทำการเหวี่ยงเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสมากำเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนด้วยกรด และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (chloroform/ methanol) จากวิธีการเก็บเกี่ยวทั้งสามวิธี พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด (ตารางที่ 1) สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบได้ 0.45 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุด (CMC) ที่ 0.044 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น CMC สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์จาก 72 เป็น 28 mN/m

เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (chloroform/methanol) และสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ซึ่งเป็นตัวแทนของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มมีประจุลบและไม่มีประจุลบ ตามลำดับ พบว่ามีค่า CMC เท่ากับ 0.218 และ 1.75 กรัมต่อลิตร สำหรับ SDS และ Triton X-100 ตามลำดับ โดยมีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวของน้ำบริสุทธิ์ที่ค่า CMC จาก 72 mN/m เป็น 49 mN/m และ 45 mN/m สำหรับ SDS และ Triton X-

100 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก เชื้อ *B. subtilis* AS6 แสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการค้าได้

**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*	1.850	45.2±2.1*
	pH 3	2.18±0.04	0.775	37.1±1.2
	pH 4	0.94±0.02	0.538	30.5±2.0
Ammonium	40 %	0.63±0.01	0.219	30.2±1.5
sulfate	50 %	0.86±0.01	0.219	38.4±2.3
precipitation	60 %	1.20±0.01	0.438	42.0±2.0
CHCl <sub>3</sub> : MEOH extraction (2:1)		0.45±0.02	0.044	28.0±0.2

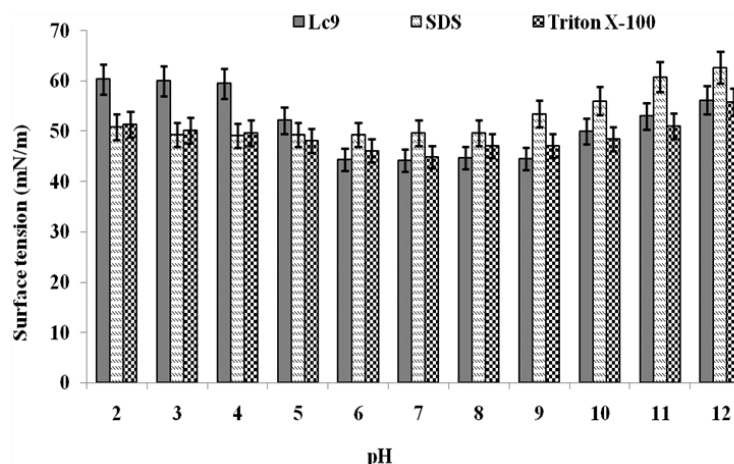
\* Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

## 2. คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

### 2.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *B. subtilis* AS6 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC คือ 0.044, 0.218, และ 1.75 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 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเกิดการตกตะกอนในสถานะที่เป็นกรดสูงและด่างสูง (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 ลดแรงตึงผิวได้น้อยลงในช่วงพีเอชเป็นกรดและค่าแรงตึงผิวจะคงตัวเมื่อมีพีเอชเป็นกลางถึงเป็นด่าง เนื่องจากเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น NaOH ทำให้ความคงตัวของไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีขึ้น โดย Na<sup>+</sup> จะจับกับโครงสร้างของกรดไขมันในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวทำให้เกิดไมเซลล์ดีขึ้น (Li et al., 2009) ซึ่งผลของพีเอชต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย (Klein and Wagner, 1987; Abouseoud et al., 2008) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Vaz และคณะ (2012) ศึกษาพีเอชต่อกิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. subtilis* เปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางการค้า ได้แก่ Glucopone®215, Glucopone®650, Findet®1214N/23 และ linear alkylbenzene sulfonates (LAS) พบว่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวทางการค้าอยู่ในพีเอชช่วงกว้าง 3.0-10.0 แต่กิจกรรมการลดแรงตึงผิวของสารลดแรง

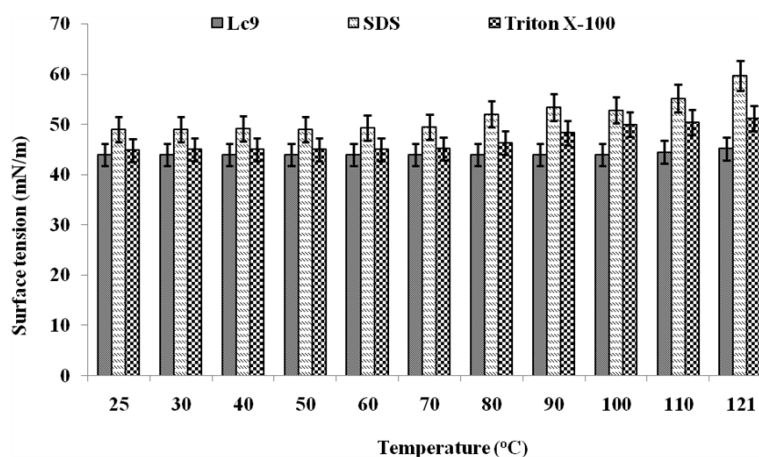
ดึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นที่ พีเอช 5.0-10.0 และลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 เนื่องจากสารลดแรงดึงผิวชีวภาพบางส่วนจะตกตะกอนทำให้ค่าแรงดึงผิวเพิ่มขึ้น (Nitschke and Pastore, 2006)



ภาพที่ 1 ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 (BS) และสารลดแรงดึงผิวทางการค้า (SDS และ Triton X-100)

## 2.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

เมื่อนำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *B. subtilis* AS6 และสารลดแรงดึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับค่า CMC คือ 0.044, 0.218, และ 1.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วตั้งไว้ให้อุณหภูมิกลับลงมาถึง 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบกิจกรรมในการลดแรงดึงผิว ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลของระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 (BS) และสารลดแรงดึงผิวทางการค้า (SDS และ Triton X-100)

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ซึ่งเห็นได้จากค่าแรงดึงผิวของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25-110 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ค่าแรงดึงผิวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ยังต่ำกว่า 50

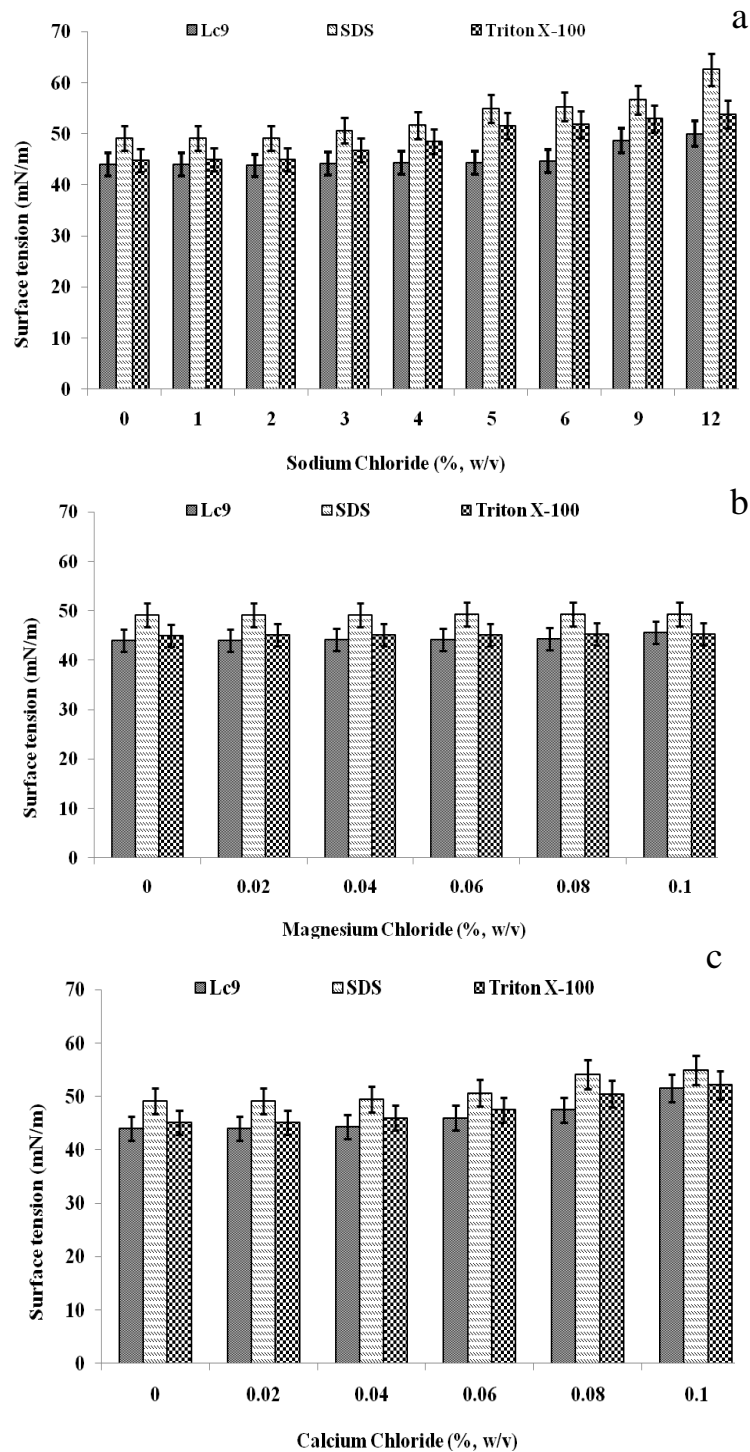
mN/m ซึ่งแตกต่างกับผลของอุณหภูมิต่อการลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ SDS และ Triton X-100 ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25-80 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมในการลดแรงตึงผิวน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จาก *B. subtilis* AS6 เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สายของไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล SDS และ Triton X-100 จากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (autoclave) ทำให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวลดลง (Pornsunthornthawee et al., 2008) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษา Wang และคณะ (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* JA-1 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 4-121 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแรงตึงผิวน้อยกว่า 35 mN/m

## 2.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเล โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำทะเลอาจมีผลต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นจึงต้องศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* AS6 พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1-6 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ แต่กิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 9 และ 12 โดยน้ำหนัก โดยค่าแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจาก 44 mN/m เป็น 48.66 และ 50.00 mN/m ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ค่าแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมการลดแรงตึงผิวมีประสิทธิภาพลดลง สำหรับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมีก็ให้ผลสอดคล้องในทิศทางเดียวกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้โดยพบว่ากิจกรรมในการลดแรงตึงผิวของ SDS และ Triton X-100 มีประสิทธิภาพลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น จากรายงานของ Thimon และคณะ (1992) พบว่าไอออนของเกลือจะมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากไอออนของเกลือจะจับหมู่คาร์บอกซิลิกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่งผลให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวมีประสิทธิภาพลดลง (ภาพที่ 3a) ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Li และคณะ (2009) ศึกษาผลของ  $\text{Na}^+$  (monovalent ion) ต่อการเกิดไมเซลล์ของ surfactin พบว่า  $\text{Na}^+$  มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย  $\text{Na}^+$  จะจับกับสายของกรดไขมันที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ มีผลต่อประจุไฟฟ้าสถิต (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 mN/m และจากภาพที่ 3c ศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก พบว่าที่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.04 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี SDS และ Triton X 100 แต่เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 0.06 ค่าแรงตึงผิวน้อย ๆ เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองของ Maneerat และ Phetrong (2007) ศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ซึ่งแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าสารสกัดที่ได้จากเชื้อ *Myroides*

sp. SM1 มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-9 โดยน้ำหนัก และการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้เพียงเล็กน้อย แต่การเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4-18 มิลลิโมล สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูญเสียกิจกรรมการอิมัลซิไฟค์น้ำมัน



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

นอกจากการทดสอบผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้วยังมีการศึกษาการใช้ น้ำทะเล ในการทดสอบความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* AS6 และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี คือ SDS และ Triton X-100 ด้วย เพื่อดูผลโดยรวมขององค์ประกอบต่างๆ ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวทั้งสาม ชนิด ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังคงมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวในน้ำทะเลโดยให้ ค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 44.3 mN/m กิจกรรมสูงกว่า Triton X-100 และ SDS ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 48.3 และ 50.0 mN/m ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การลดแรงตึงผิวในสภาวะปกติ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงมีค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุด คือ 44.0 mN/m จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* AS6 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเลได้ (ตารางที่ 2)

**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±0.5 <sup>c**</sup>	44.0±0.0 <sup>c**</sup>
SDS	50.0±1.0 <sup>a</sup>	49.1±0.2 <sup>a</sup>
Triton X-100	48.3±0.7 <sup>b</sup>	45.0±0.0 <sup>b</sup>

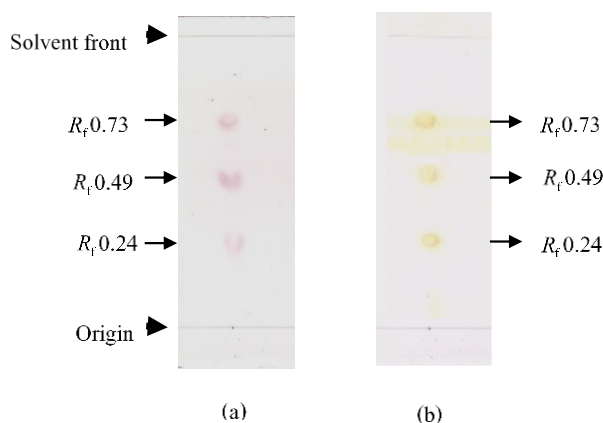
\* Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

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

### 3. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

#### 3.1 Normal-phase chromatography

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย TLC ที่มี silica gel 60 F254 เป็น stationary phase นำไปแช่ใน mobile phase คือ hexane:ethylacetate (2:1) โดยปริมาตรเมื่อตรวจสอบด้วย spaying reagent ทั้ง 3 ชนิด คือ anisaydehyde, ninhydrin และ iodine vapor เพื่อตรวจหาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารที่เป็นหมูนํ้าตาล กรดอะมิโน และไขมัน ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 มีปฏิกิริยากับ ninhydrin และ iodine vapor (ภาพที่ 4) แสดงว่าองค์ประกอบของสารลดแรง ตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบจึงน่าจะมี โครงสร้างเป็นชนิดลิโปเปปไทด์ จากการแยก องค์ประกอบของสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึง ผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 โดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโท กราฟฟีแบบ normal phase โดยใช้ hexane:ethylacetate อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตรเป็น mobile phase พบว่าสามารถ แยกสารสกัดหยาบออกได้เป็น 3 กลุ่มโดยใช้ ninhydrin และ iodine เป็น spaying reagent โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.24, 0.49 และ 0.73 (ภาพที่ 4) เมื่อตรวจวัดกิจกรรมโดยใช้วิธี drop collapsing test พบว่ากลุ่มสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.49 มี ค่ากิจกรรมมากที่สุด (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			
$\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CHCl}_3$	1:1	0.73	1.05±0.2
$\text{EtOAc} : \text{CHCl}_3$	1:1	0.49	3.76±0.4
		0.24	0
Reverse-phase**			
$\text{H}_2\text{O} : \text{MEOH}$	9:1	0.42	3.58±0.5
	9:2	0.40	1.27±0.3
	9:4	0.38	0

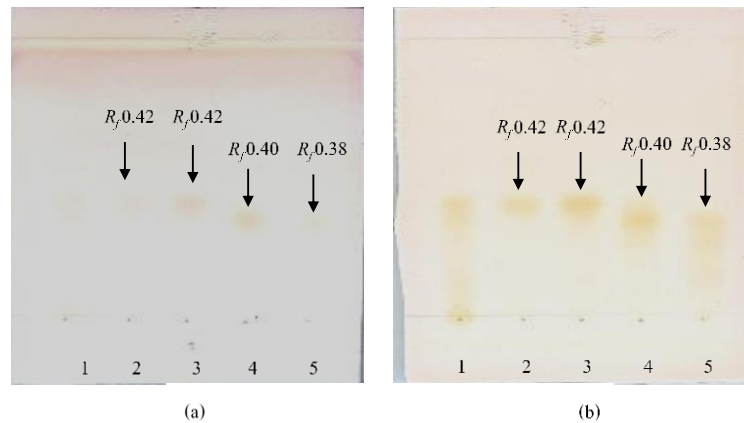
\*Values are given as means±SD from triplicate determinations.

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

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

### 3.2 Reverse-phase chromatography

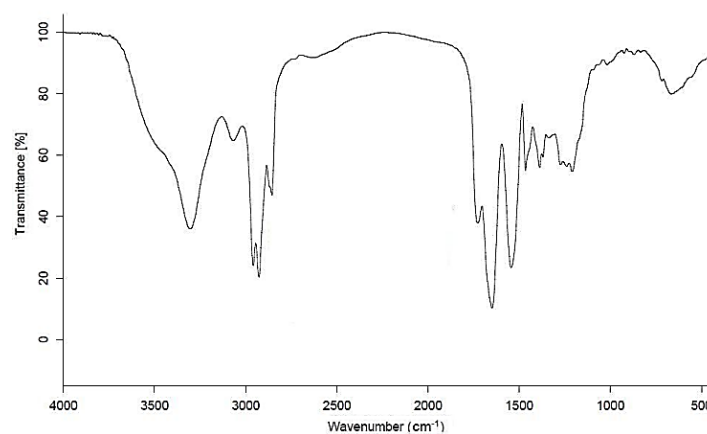
ทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบโดยใช้คอลัมน์ SEP-PAK ( $\text{C}_{18}$ ) ที่มี mobile phase เป็นน้ำและเมทานอลในอัตราส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าสามารถ แยกสาร  $R_f 0.49$  ออกได้เป็น 3 กลุ่มโดยใช้ ninhydrin และ iodine เป็น spraying reagent โดยมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.42, 0.40 และ 0.38 (ภาพที่ 5) เมื่อตรวจวัดกิจกรรมโดยใช้วิธี drop collapsing test พบว่ากลุ่มสารที่มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.42 มีค่ากิจกรรมมากที่สุด (ตารางที่ 3) จึงเลือกใช้สารกลุ่มนี้ในการศึกษาต่อไป



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)

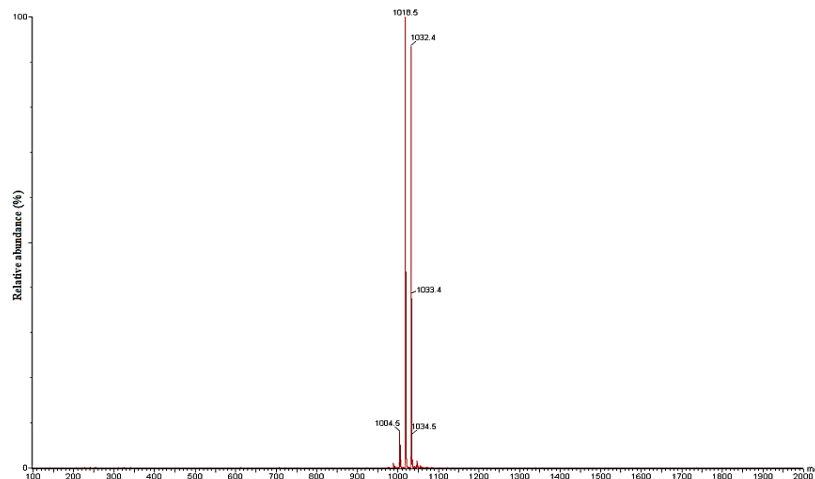
เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย FT-IR ซึ่งใช้ในการศึกษา หมู่ฟังก์ชันของสาร ผลจาก FT-IR spectrum พบการยืดตัวของ O-H ที่  $3305\text{ cm}^{-1}$ , การยืดตัวของ C-H ที่  $2926$  และ  $1425\text{ cm}^{-1}$ , การยืดตัวของ C-O ที่  $1648$  และ  $1736\text{ cm}^{-1}$  และการยืดตัวของ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



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

### 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 ( $\text{CH}_2$ ) มวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 มีค่าเท่ากับ 1,032 m/z สอดคล้องกับรายงานของ Roongsawang และคณะ (2002) ที่ศึกษาพบว่ามวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จะอยู่ในช่วง 1,007-1,035 m/z รายงานนี้เป็นรายงานฉบับแรกที่กล่าวถึงการผลิตสาร ลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์จากเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Inquilinus*



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

จากการศึกษาวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 พบว่าการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform/methanol ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร ให้สารลดแรงตึงผิวที่มีค่ากิจกรรมในการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด มีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดไมเซลล์เท่ากับ 0.044 กรัมต่อลิตร และมีค่าความสามารถในการลดแรงตึงผิวเท่ากับ 44 mN/m โดยสามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 0.45 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัว ในช่วงพีเอช 6-9 อุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 44-47 mN/m สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยพบว่ามีค่าแรงตึงผิวน้อยกว่า 50 mN/m มีความคงตัวต่อแมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 และ 0-0.04 ตามลำดับ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ยังคงมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวในน้ำทะเล โดยมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 44 mN/m

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์และศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตรวจสอบโดย Thin Layer Chromatography, Fourier Transform Infrared Spectrometer และ Mass spectroscopy พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *B. subtilis* AS6 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีกรดอะมิโนและไขมันเป็นองค์ประกอบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,032 m/z

## เอกสารอ้างอิง

- Abareethan, M., Venkatesh, R., Leelavathi, P. and Suganya, A. 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., 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.
- 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.
- Pornsunthornatwee, 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.
- 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., 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.
- Sutthivanitchakul, B., Thaniyavorn, J. and Thaniyavarn, S. 1999. Biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* 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.
- 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.