**รายงานการวิจัย**

# การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

# Screening and optimization of cultural conditions for bioemulsifier production from isolated bacteria

**ปวีณา ดิกิจ**
**อทิพันธ์ เสียมไหม**

**รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย**
**มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา**
**พ.ศ. 2557**

# บทที่ 1

# บทนำ

## ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารลดแรงตึงผิวสามารถผลิตโดยสิ่งมีชีวิต โดยส่วนใหญ่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Microbial surface-active compound) ซึ่งมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา ทำให้โครงสร้างทางเคมี คุณสมบัติและหน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดแตกต่างกัน สารลดแรงตึงผิวสามารถจำแนกตามน้ำหนักโมเลกุลได้ 2 ประเภท คือ สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low-molecular-weight compound) หรือเรียกว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ “biosurfactant” คุณสมบัติสำคัญของสารในกลุ่มนี้ คือ การลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนอีกกลุ่มเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high-molecular-weight compound) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ (bioemulsifier) คุณสมบัติที่สำคัญของสารกลุ่มนี้ คือ การทำให้เกิดความคงตัวของอิมัลชัน (Banat et al., 2010) ซึ่งอิมัลชันเกิดจากของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวในลักษณะเป็นหยดขนาดเล็กในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เช่น อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion) หรืออิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) (Ron and Rosenberg, 2002) ปัจจุบันมีการนำสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ยาและเครื่องสำอาง เพื่อทดแทนสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และนอกจากนี้ยังใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ทางชีวภาพ (biocontrol) มีรายงานพบว่าสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพบางกลุ่มมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อทดแทนยาที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี (Singh and Cameotra, 2004) สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมีข้อดีกว่าสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี คือ ย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ และมีความคงตัวในสภาวะอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างและเกลือความเข้มข้นสูงๆ ได้ (Banat et al., 2000)

เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลากหลายชนิดและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันทั้งลดแรงตึงผิวและทำให้เกิดความคงตัวของอิมัลชัน ซึ่งแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถควบคุมสภาวะในการเลี้ยงได้ง่ายและสามารถใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูกหรือวัสดุเศษเหลือในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ รวมทั้งศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ ตลอดจนคุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่เก็บเกี่ยวได้ ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้อิมัลซิไฟด์เออร์ที่ผลิตได้เพื่อทดแทนสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี

## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูง ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ วิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพรวมทั้ง ศึกษาคุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่เก็บเกี่ยวได้

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ ทราบองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพรวมทั้งคุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่เก็บเกี่ยวได้

**ขอบเขตของโครงการวิจัย**

คัดแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูง และศึกษาสภาวะและองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ รวมทั้งศึกษาวิธีการสกัดสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่เก็บเกี่ยวได้

**นิยามศัพท์เฉพาะ**

Bioemulsifier สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ คือ กลุ่มสารที่มีสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้อิมัลชันคงตัวได้นานขึ้น

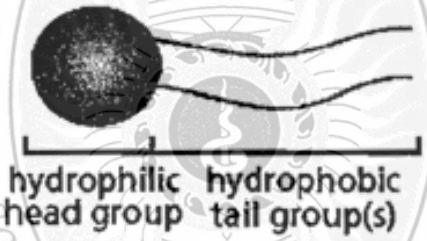
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

# บทที่ 2

# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 1. สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ (Microbial biemulsifiers)

สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ หมายถึง กลุ่มสารที่มีสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้อิมัลชันคงตัวได้นานขึ้นสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์ เป็นสารประกอบ amphipathic ที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (ภาพที่ 1) โดยส่วนที่ชอบน้ำจะมีทั้งที่เป็นประจุและไร้ประจุ ประกอบไปด้วยหมู่ของโมโน (mono-), ได (di-) หรือโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และเปปไทด์ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะประกอบไปด้วยสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัวหรือกรดไขมัน (Banat et al., 2010) สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิต เช่น mannoprotein จากเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* bioemulsans และ alasan จากเชื้อ *Acinetobacter* sp. liposan จากเชื้อ *Candida lipolytica* (Ron and Rosenberg, 2002; Shete et al., 2006)




**ภาพที่ 1:** ลักษณะโครงสร้างของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์
**ที่มา:** Frazer (2000)

## 2. การจัดกลุ่มสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ (Microbial surface-active compounds)

สารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ จำแนกตามโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล

### 2.1 การจำแนกสารลดแรงตึงผิวตามน้ำหนักโมเลกุลเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

#### 2.1.1 สารลดแรงตึงผิวน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low-molecular-weight compounds)

หรือเรียกว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ “biosurfactant” คุณสมบัติที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้ คือ การลดแรงตึงผิวและแรงตึงระหว่างผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไกลโคลิปิดและลิโปเปปไทด์ ซึ่งนอกจากคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวแล้วสารลิโปเปปไทด์บางชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย

**2.2.2 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพน้ำหนักโมเลกุลสูง (High-molecular-weight compounds)**

หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ “bioemulsifier” เป็นโพลีเมอร์น้ำหนักโมเลกุลสูงที่ติดกับพื้นผิวโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำอย่างแข็งแรง ทำให้จุลินทรีย์สามารถอยู่ติดกับสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ และนำสารตั้งต้นนั้นไปเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนได้ดีขึ้น (กุลนรี เพชรรงค์, 2550) คุณสมบัติที่สำคัญของสารในกลุ่มนี้ คือ มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวน้อย แต่มีความสามารถในการยึดเกาะกับหยดน้ำมันหรือมีความสามารถในการป้องกันการรวมตัวกันของหยดน้ำมันได้ดี ซึ่งก่อให้เกิดความคงตัวของอิมัลชันสูง โดยความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ก่อให้เกิดอิมัลชันอยู่ในช่วง 0.01-0.001% เมื่อเทียบเป็นอัตราส่วนระหว่างสารก่อให้เกิดอิมัลชันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะมีค่าอยู่ในช่วงอัตราส่วน 1:100-1:1000 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ ได้แก่ โพลีแซคคาร์ไรด์ โปรตีน ลิโพโพลีแซคคาไรด์ ลิโพโปรตีน หรือสารละลายเชิงซ้อน (Ron and Rosenberg, 2002)

**2.2 การจำแนกตามโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิว** สามารถแบ่งกลุ่มสารลดแรงตึงผิวได้ 4 กลุ่ม ดังนี้

**2.2.1 ไกลโคลิปิด (Glycolipid)**

สารลดแรงตึงผิวที่พบส่วนใหญ่มักอยู่ในกลุ่มนี้ มีโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต/น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น rhamnose, trehalose, sucrose และ glucose เชื่อมต่อกับ long chain aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids สารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคลิปิด ที่พบและรู้จักกันดี ได้แก่ rhamnolipids, trehalolipids และ sophorolipids เป็นต้น

**2.2.2 ลิโปเปปไทด์ (Lipopeptide)**

จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* มักผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มลิโปเปปไทด์ โดยมีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้นับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูงสุด และนอกจาก นี้ยังมีสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ตัวอย่างสารกลุ่ม cyclic lipopeptices ในกลุ่มนี้ เช่น decapeptide anttibitics (polymyxins) จากเชื้อ *Bacillus polymyxa* และแสดงคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวได้อีกด้วย (ปิ่นกาญจน์ ราชรักษ์, 2549) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดลิโปเปปไทด์ที่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายได้แก่ surfactin ซึ่งเป็นลิโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวนผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtitles* ATCC 21332 (Arima *et al*., 1968)

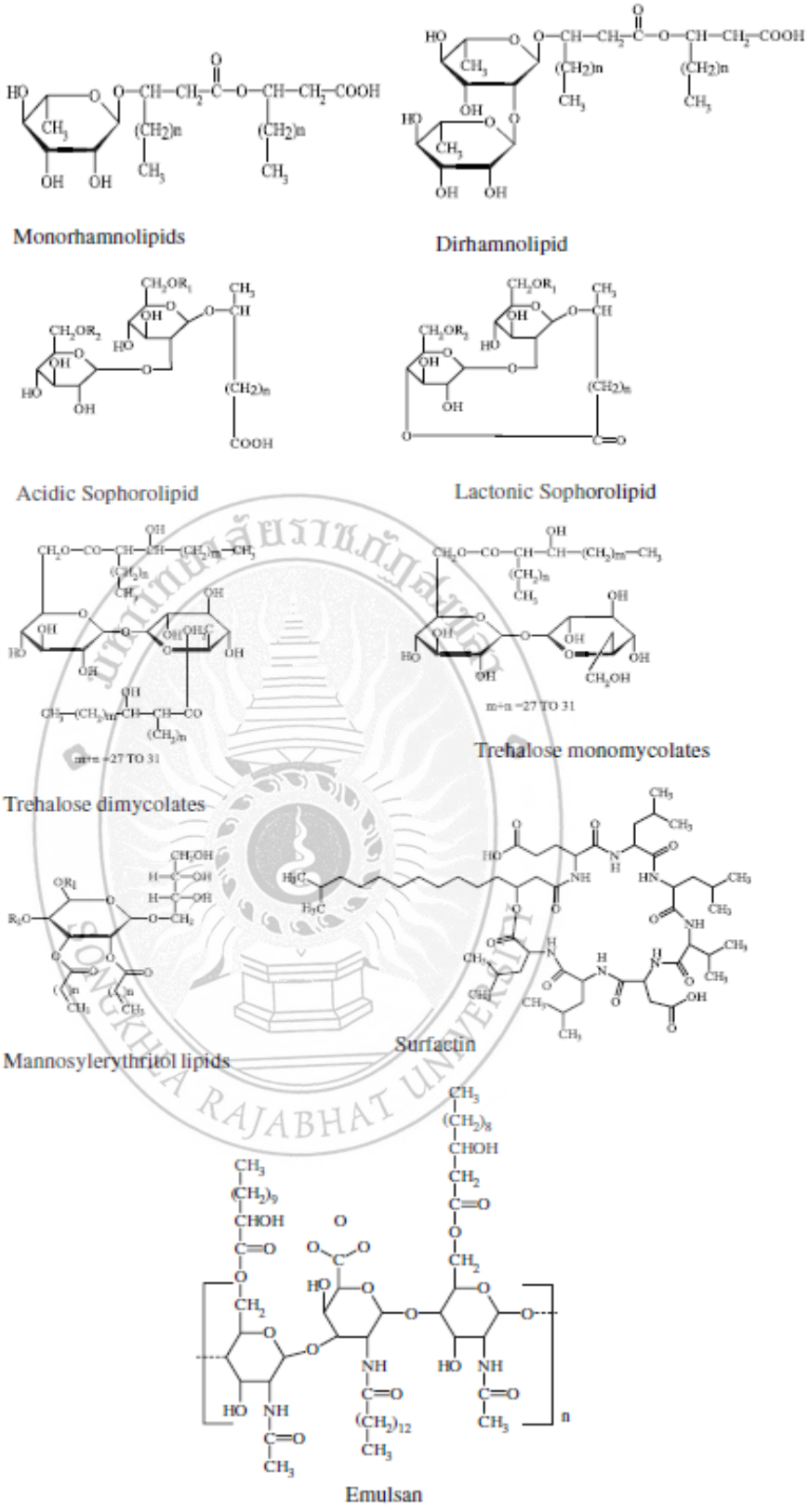
**2.2.3 ฟอสโฟลิปิด, กรดไขมันและนิวทรัลลิปิด (phospholipid, fatty acids and neutral lipids)**

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids เป็นสารลดแรงตึงผิวที่เกิดพันธะเอสเทอร์ขึ้นระหว่างหมู่แอลกอฮอล์ของลิปิดและฟอสเฟต มีแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids เช่น *Aspergillus* spp., *Thiobacillusthioxidans*, *Arthrobacter* sp. AK-19 และ *P. aeruginosa* (Desai and Banat, 1997)

สำหรับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดกรดไขมันและนิวทรัลลิปิด เช่น ustilagic acid, corymormycolic acid, lipotheichoic acid และ hydrophobic protein (Desai and Banat, 1997)

**2.2.4 สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลิเมอร์ริก (polymeric surfactant)**

สารลดแรงตึงผิวชนิดโพลิเมอร์ริก เป็นกลุ่มสารลดแรงตึงผิวที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวของหน่วย polysaccharide - protein และหน่วยของกรดไขมันซึ่งมีลักษณะเป็นโพลิเมอร์ริกในธรรมชาติ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้ คือ emulsan, alasan และ biodispersan เป็นต้น




**ภาพที่ 2** โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มต่างๆ
**ที่มา** Banat *et al*., (2010)

**ตารางที่ 1:** ชนิดและเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

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

**ที่มา**: ดัดแปลงจาก Mulligan และ Gibbs (1993)

**3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์**

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารที่เหมาะสมแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นพลังงานในกิจกรรมต่างๆ และใช้ผลิตสารตั้งต้นในกระบวนการสลายพลังงานเพื่อนำไปผลิตสารประกอบที่เซลล์ต้องการในการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ สูตรอาหารส่วนใหญ่ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ นอกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วยังมีสภาวะอื่นๆ อีกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศ เป็นต้น

**3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source)**

แหล่งคาร์บอนสำคัญมากในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ แหล่งคาร์บอนที่ใช้มีทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ชนิดที่ละลายน้ำ เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แมนนิทอลและเอทานอล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น *n*-alkanes และน้ำมันมะกอก แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตจึงมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเป็นอย่างมาก (Abouseoud et al., 2008)

- แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ

Das และคณะ (2009) ศึกษาแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ กลีเซอรอล แป้ง กลูโคสและซูโครส ที่มีผลในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเล คือ *Bacillus circulans* พบว่าการใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้สูงสุดในปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 1.16 กรัมต่อลิตรและ 0.94 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน เติมยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

Hayder และคณะ (2014) ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Streptomyces* sp. SS20 ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ ไซโลส แมนนิทอล กลูโคส มอลโตส ซูโครส กลีเซอรอลและแป้ง พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. SS20 สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนทุกชนิดและเจริญได้ดีที่สุด 19 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Streptomyces* sp. SS20 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้ในทุกแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองและให้กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันได้ดีที่สุดที่ร้อนละ 72 หลังจากการวัดที่เวลา 48 ชั่วโมงเมื่อใช้ซูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

Noparat และคณะ (2014) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Ochrobactrum anthropi* 2/3 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำได้ชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลทราย กลูโคส กลีเซอรอล กากน้ำตาล และกากดีแคนเตอร์ พบว่าการใช้กากดีแคนเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *O. athropi* 2/3 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ได้สูงสุด 4.25 กรัมต่อลิตร หลังจากเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

- แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ

Fagade และคณะ (2009) ศึกษาการใช้ น้ำมันดิบ น้ำมันปาล์ม น้ำมันดีเซลและน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus sphaericus* BS 01, *Bacillus subtilis* BS 03, *Bacillus sphaericus* BS 04, *Bacillus subtilis* BS 58, *Bacillus pumilus* BS 66, *Bacillus licheniformis* BS 69, *Bacillus subtilis* BS 73 และ *Bacillus licheniformis* BS 102 ที่แยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน โดยใช้อาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี $NH_4Cl$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *B. sphaericus* BS 01, *B. subtilis* BS 03, *B. sphaericus* BS 04, *B. pumilus* BS 66**,** *B. licheniformis* BS 69, *B. subtilis* BS 73 และ *B. licheniformis* BS 102 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า $E_{24}$ อยู่ที่ร้อยละ 30-55 และเชื้อ *B. subtilis* BS 58 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันดิบหรือน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า $E_{24}$ เท่ากับร้อยละ 50

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน เติมยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร

Saimmai และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Inquilinus limosus* KB3 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral salt medium ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำได้แก่ น้ำมันปาล์มใช้แล้ว น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้ว และน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *I. limosus* KB3 ผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้มากที่สุด 0.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

**3.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)**

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพด้วยเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์

- แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen)

Gnanamani และคณะ (2010) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ เนื้อสกัดยีสต์สกัด และเปปโตน เติมในอาหาร mineral medium โดยใช้น้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากน้ำทะเล ดินตะกอนป่าชายเลนหอยและทรายบริเวณชายหาดในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไอโซเลท ESW Na12s สามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันดิบและน้ำมันรำข้าวได้ถึงร้อยละ 90 หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Ghribi และ Ellouze-Chaabouni (2011) ศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* SPB1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ ยูเรีย เคซีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากตับอ่อน เนื้อสกัด ยีสต์สกัด และเคซีนไฮโดรไลเซท ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่มีกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว

200 รอบต่อนาที พบว่าการเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *B. subtilis* SPB1 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้มากที่สุด 720 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chooklin และคณะ (2014) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ต่างกัน ได้แก่ เนื้อสกัด ยีสต์สกัด ยูเรีย ผงชูรส และเปปโตน เติมในอาหาร mineral medium ใช้ผงแป้งจากเมล็ดขนุนร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Deinococcus caeni* PO5 พบว่าเชื้อ *D. caeni* PO5 สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันได้ถึงร้อยละ 58 หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen)

Younis และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์จากเชื้อ *B. subtilis* KO เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่แตกต่างกัน คือ $(NH_4)_3PO_4$, $C_2H_8N_2O_4$, $CH_3COONH_4$, $NaNO_3$, $NH_4Cl$ หรือ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก พบว่าเชื้อ *B. subtilis* KO ผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 7.41 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Aparna และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus clausii* 5B ที่แยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียม เลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ยีสต์สกัด เปปโตน ยูเรีย $NH_4Cl$ หรือ $NH_4NO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อ *B. clausii* 5B สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 2.41 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ $NH_4Cl$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Saimmai และคณะ (2013) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ $NH_4NO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ และ $(NH_4)Cl$ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยกากตะกอนดีแคนเตอร์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Inquilinus limosus* KB3 ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเติม $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันได้สูงสุดร้อยละ 68 และสามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ได้ 5.13 กรัมต่อลิตร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 54 ชั่วโมง

**3.3 พีเอช**

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมและการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลกระทบจากค่าพีเอช โดยทั่วไปค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ราและยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่มีค่าเป็นกลาง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและไนโตรเจน เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรืออัลคาไลน์อื่นๆ ออกมาทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงขึ้น (Nagal and Jain, 2010) แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (Zhao et al.,

2009) พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสาร อิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพของจุลินทรีย์

Abushady และคณะ (2005) ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *Bacillus subtilis* BBk 1 เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักและ $(NH_4)NO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5-9 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อ *B. subtilis* BBk 1 ผลิต surfactin สูงสุดที่พีเอช 6.5 โดยผลิตได้มากกว่า 2.5 กรัมต่อลิตร และที่พีเอช 6.5-8.0 ไม่มีผลต่อการผลิต surfactin

Najafia และคณะ (2010) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus mycoide* ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญได้ที่พีเอชในช่วง 5-9 และผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพสูงสุดที่พีเอช 7.37

El-sersy (2012) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* N10 เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่พีเอช 5.0-9.0 ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* N10 เจริญเติบโตและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7 โดยให้ค่า EA สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 86 แต่เมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 6.0 พบว่ากิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์จะลดลงอย่างรวดเร็ว

**3.4 อุณหภูมิ**

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน ถ้าจุลินทรีย์เจริญในอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเจริญได้เร็วและอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย เช่นเชื้อ *Bacillus subtilis* N10 จะผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า EA มากกว่าร้อยละ 80 (El-sersy, 2012) เป็นต้น

Abushady และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต surfactin จากเชื้อ *Bacillus subtilis* BBk 1 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ $(NH_4)NO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียสตามลำดับ เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิต surfactin สูงสุดเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ผลผลิต surfactin ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึง 55 องศาเซลเซียสเชื้อจะไม่มีการผลิต surfactin

Gogotov และ Miroshnikov (2009) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* VKM B-511 ที่เลี้ยงในอาหาร mineral medium ใช้ kerosene ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักและ $NaNO_3$ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรและให้ค่าความสามารถในการคงตัวของอิมัลชันเท่ากับร้อยละ 41

**3.5 การกวนและการให้อากาศ**

การกวนและการให้อากาศเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอยสามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น (Desai and Banat, 1997) ส่วนการกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ช่วยลดขนาดของฟองอากาศให้เล็กลงทำให้มีผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับจุลินทรีย์มากขึ้น

Fonseca และคณะ (2007) ศึกษาผลของการกวนต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหาร minimal medium ที่มีน้ำตาลทราย ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและ $NH_4NO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 เขย่าด้วยความเร็วรอบต่างกันคือ 50, 150 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 และ 150 รอบต่อนาที กิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้นเป็น 250 รอบต่อนาที กิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ได้จะมีเพิ่มขึ้น

**4. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ**

การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

**4.1 การตกตะกอนด้วยกรด** หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ตามระยะเวลาที่เหมาะสมนำ culture supernatant มาตกตะกอนด้วยกรดซึ่งอาจจะใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Priya and Usharani, 2009) หรือที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ (Salehizadeh and Mohammadizad, 2009; Zhi-feng *et al*., 2010) แล้วตกตะกอนข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนและนำตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีการปรับพีเอชให้เท่ากับพีเอชที่ใช้ตกตะกอน หมุนเหวี่ยงอีกครั้ง นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย 2 N NaOH จากนั้นอาจสกัดต่อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Priya and Usharani, 2009; Salehizadeh and Mohammadizad, 2009; Zhi-feng *et al*., 2010)

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

**4.3 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต** เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลีเมอร์ หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ตามระยะเวลาที่เหมาะสม นำ culture supernatant ไปตกตะกอนโดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 45- 65 โดยน้ำหนัก ตั้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนไปกำจัดเกลือโดยใช้วิธี dialysis จากนั้นนำมาทำแห้งด้วยวิธี lyophilized หรือ freeze dry (Rosenberg *et al*., 1979; Navon-

Venezia *et al*., 1995) แล้วนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การใช้เทคนิค Gel electrophoresis และ size exclusion chromatography เป็นต้น

# บทที่ 3

# วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

## วัสดุและอุปกรณ์

### 1. ตัวอย่างตะกอนดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดิน น้ำและของเสีย บริเวณที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดกระบี่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดสตูลและจังหวัดตรัง โดยกระจายให้ครอบคลุมทั่วทั้งบริเวณๆ ประมาณ 5 - 10 จุดต่อหนึ่งบริเวณ เก็บที่ความลึก 0 - 5 ซม. จากผิวดิน ก่อนเก็บตัวอย่างดินต้องกวาดเศษพืชหรือวัสดุที่อยู่ผิวหน้าดินออกเสียก่อน นำดินทุกจุดใส่รวมกันในถุงพลาสติกหรือภาชนะที่เตรียมไว้ เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างดินมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพในห้องปฏิบัติการ

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient agar (NA) และ Nutrient broth (NB) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): beef extract 3; peptone 5; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ Nutrient agar เติม agar 15 กรัม)

- Mineral 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 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH เท่ากับ 7.0 (Noparat et al., 2014)

### 3. น้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันปาล์ม

## วิธีการวิเคราะห์

### 1. การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ต้องการทดสอบ 1 มิลลิลิตร ใส่ในคิวเวท แล้วทำการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยมีชุดควบคุม คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ (Joshi et al., 2008)

### 2. การวัดค่าพีเอช

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตรวจวัดค่าพีเอชของสารละลายส่วนใสโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

### 3. การทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน Emulsification activity (EA) และ Emulsification Index (EI)

เติมน้ำมันที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 2 นาที แล้วทิ้งไว้ 10 นาที คำนวณหาค่า emulsification activity (EA) และตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง คำนวณหาค่า Emulsification Index (EI) โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ (Cooper and Goldenberg, 1987)

$$\text{EA และ EI} = \frac{\text{ความสูงของ emulsion ที่เกิดขึ้น}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}} \times 100$$

**วิธีการทดลอง**

**1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ**

ใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 10 วินาที ปิเปตสารละลายส่วนใส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread plate บนอาหาร NA ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) 4-5 วัน สุ่มเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าวมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวๆ นำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา re-streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดิม 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อแบคทีเรียที่เลือกได้เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อที่ได้ในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันสูงสุด**

นำเชื้อที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ร้อยละ 5 โดยปริมาตร เลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา วัดการเจริญเติบโตของเชื้อตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1 และปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหาร NB ที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีค่า OD660 เท่ากับ 0.5

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในหลอดที่มีอาหาร Mineral salt medium (MSM) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีน้ำมันปาล์มหรือกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อ ค่าพีเอช และนำตัวอย่าง (culture broth) ไปเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำส่วนใส (supernatnant) ที่ได้มาหากิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันได้สูงที่สุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

**3. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้**

**3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา re-streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดิม 2-3 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะของโคโลนี รูปร่างเซลล์ การเรียงตัว และการติดสีแกรม (Gram staining)

**3.2 การศึกษาในระดับสปีชีส์**

ส่งเชื้อที่คัดเลือกได้ให้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้ทำการเทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA

**4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้**

**4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ**

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 2 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ลงในอาหาร MSM ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทรายและกากน้ำตาล แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ น้ำมันปาล์มทางการค้าและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์

- การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ตามวิธีการวิเคราะห์การเจริญข้อ 1
- ค่า pH โดยใช้ pH meter
- ค่า EA และ EI ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3

เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า emulsification activity สูงสุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

**4.2 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟดเออร์ชีวภาพ**

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้มีค่าเท่ากับร้อยละ 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 โดยน้ำหนักตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1 เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า EA และ EI สูงสุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

**4.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ**

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 4.2 ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, ยูเรียและเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1 เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า EA และ EI สูงสุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

**4.4 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ**

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนให้มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1 เลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า EA และ EI สูงสุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

**4.5 ผลของการเขย่าต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ**

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2, 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เก็บ

ตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1 เลือกความเร็วรอบที่ให้ค่า EA และ EI สูงสุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

**4.6 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ**

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในหรืออาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ จากนั้นปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1 เลือกพีเอชเริ่มต้นที่ให้ค่า EA และ EI สูงสุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

**4.7 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ**

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ตามวิธีการทดลองข้อ 1 ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน การเขย่า และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60, และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4.1 เลือกช่วงเวลาที่ให้ค่า EA และ EI สูงสุดเพื่อใช้ในการสกัดสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพต่อไป

**5. ศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้**

**5.1 ตกตะกอนด้วยอะซีโตน**

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 4.1-4.7 นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยอะซิโตนในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซนเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระเหยอะซีโตน วิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่า EA และ EI

**5.2 ตกตะกอนด้วยเมทานอล**

นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระเหยเมทานอล วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 5.1

**5.3 ตกตะกอนด้วยเอทานอล**

นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซนเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระเหยเอทานอล วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 5.1

**5.4 ตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช**

นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช โดยใช้ 6 M HCl ปรับพีเอช เป็น 2.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นเก็บตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน นำไปล้างด้วย 100 mM HCl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 2 N NaOH และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 5.1

**5.5 สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์**

นำสารละลายส่วนใสสกัด 2 ครั้งด้วย chloroform:methanol ในอัตราส่วน 2:1 (ดัดแปลงจาก Saimmai et al., 2012b) โดยใช้กรวยแยก (separation funnel) นำชั้นของตัวทำละลายกำจัดน้ำโดยการเติม anhydrous $Na_2SO_4$ แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในเครื่อง evaporator วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 5.1

**5.6 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต**

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 40 ถึง 60 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือโดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 ดาลตัน ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิล-เซลลูโลสและทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 5.1

จากวิธีการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพทั้ง 6 วิธี เลือกวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ โดยเปรียบเทียบค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์ 1 กรัมต่อลิตร โดยเลือกวิธีการเก็บเกี่ยวที่ให้กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์สูงที่สุดเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

**6. ศึกษาคุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้**

**6.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ**

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดในข้อ 5 ละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของสารละลายที่ได้ด้วย 1N HCl หรือ 1 N NaOH ให้มีค่าพีเอช เท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ แล้ววัดกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น

**6.2 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้**

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากจากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดในข้อ 5 ละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 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 แล้ววัดกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น

**6.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้**

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากจากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุดในข้อ 5 ละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เติม NaCl ให้มีความเข้มข้นที่ร้อยละ 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12 ตามลำดับ หรือ $CaCl_2$ หรือ $MgCl_2$ ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 โดยน้ำหนักตามลำดับแล้ววัดกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น

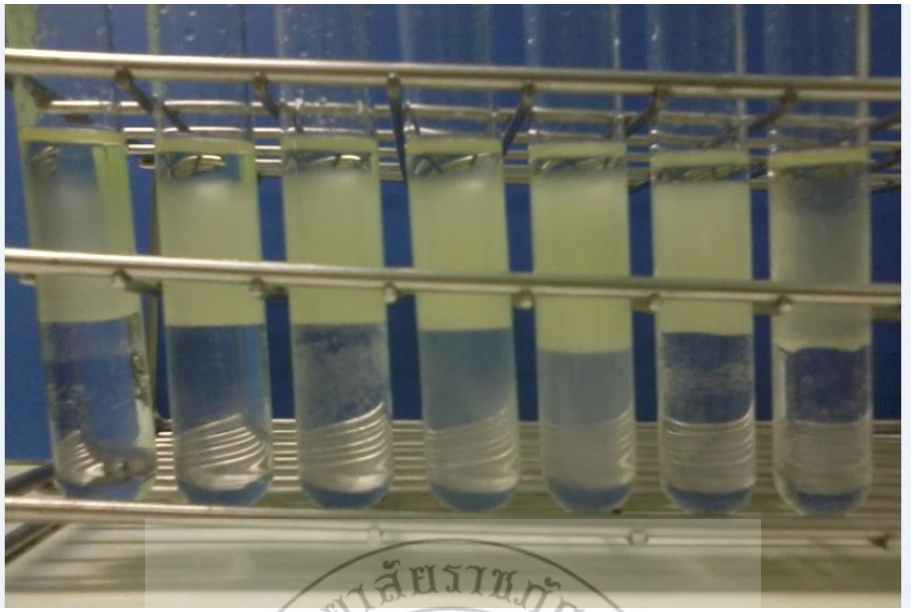
# บทที่ 4

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ

แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากตัวอย่างดิน, น้ำทิ้งและกากของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในจังหวัดกระบี่ (บริษัทกระบี่น้ำมันพืชจำกัด, บริษัทนามหงส์น้ำมันปาล์มจำกัด, บริษัทปาล์มโมริชจำกัด และบริษัทรุ่งเจริญปาล์มออยล์จำกัด) จังหวัดสุราษฎร์ธานี (บริษัททักษิณปาล์ม, บริษัทปาล์มไทยพัฒนาจำกัด, บริษัทลาภทวีปาล์มออยล์จำกัด และบริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์มจำกัด) จังหวัดสตูล (บริษัทปาล์มไทยพัฒนาจำกัด, บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์มจำกัด และห้างหุ้นส่วนจำกัดเพิ่มพูนทรัพย์ปาล์มออยล์) และ จังหวัดตรัง (บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม) โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 88 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม จำนวน 48 ตัวอย่าง, น้ำเสียจากบ่อบำบัด จำนวน 19 ตัวอย่าง กากตะกอนดีแคนเตอร์ จำนวน 15 ตัวอย่าง และดินตะกอนขอบบ่อบำบัดน้ำเสีย จำนวน 6 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาแยกเชื้อโดยเจือจางใน NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จากนั้นปิเปตส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมา spread plate บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (34±3°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนีมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว เลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันและสุ่มเลือกเชื้อให้มากที่สุดเพื่อเป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 421 ไอโซเลท การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างในธรรมชาติจะได้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ การใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมันเป็นแหล่งอาหารทำให้เชื้อที่มีความสามารถในการใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ก่อน ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถใช้น้ำมันได้จะเจริญเติบโตได้ช้าหรือไม่เจริญเลย ซึ่งเชื้อที่สามารถใช้น้ำมันในการเจริญเติบโตได้น่าจะมีความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสและช่วยในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถนำน้ำมันไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่ายขึ้น (Providenti et al., 1995; Rahman et al., 2003; Wei et al., 2005)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มหรือน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนนำส่วนใสที่ได้ไปกำจัดน้ำมันออกโดยการสกัดด้วยเฮกเซนปริมาตรเท่ากับส่วนใส ทำการสกัด 2 ครั้ง ตรวจหากิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพด้วยวิธีการทดสอบกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (ภาพที่ 3)



**ภาพที่ 3** ผลการตรวจหากิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มของสารละลายส่วนใสจากเชื้อแบคทีเรียหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) ด้วยวิธี Emulsification activity

เมื่อวัดกิจกรรมการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์พบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมทั้งหมดจำนวน 20 ไอโซเลท โดยมีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจำนวน 8 และ 12 ไอโซเลท เมื่อใช้กลูโคสและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ (ตารางที่ 2) จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเมื่อใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนมีมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมันปาล์ม เชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้โดยส่วนใหญ่จะผลิตสารที่มีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันให้มีขนาดเล็กเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้ง่าย สารเหล่านี้ ได้แก่ สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ (Maneerat et al., 2006) จากการย้อมแกรมพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้พบว่าโดยส่วนใหญ่ คือ ร้อยละ 75 (15 จาก 20 ไอโซเลท) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สอดคล้องกับรายงานของ Bodour และคณะ (2003), Batista และคณะ (2006), Saimmai และคณะ (2012a; 2012c) และ Saisa-ard Saimmai และคณะ (2013; 2014) ที่พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์จากน้ำมันโดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนสารอาหารได้ดีกว่ากลุ่มอื่นๆ เชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์ได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน คือ เชื้อ KB3 และ AS6 โดยมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์เท่ากับร้อยละ 40.5 และ 37.7 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยใช้กลูโคสหรือน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วัดค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มของสารละลายส่วนใส พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกมาได้นั้นมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สายพันธุ์ แหล่งอาหาร และสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Desai and Banat, 1997) จากการทดลองพบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท (KB2, ST1, ST2และTR315) ที่มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที (Emulsification activity) ได้มากกว่าร้อยละ 50 ซึ่งเทียบเท่าค่า

การอิมัลซิไฟด์เออร์ของสารละลายด้วยสารอิมัลซิไฟด์เออร์ทางการค้า (SDS และ Tween 80) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก (Bodour and Maier, 1998) ค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มของสารละลายส่วนใสจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทแสดงให้ถึงศักยภาพที่จะสามารถนำสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟด์เออร์ทางการค้าได้

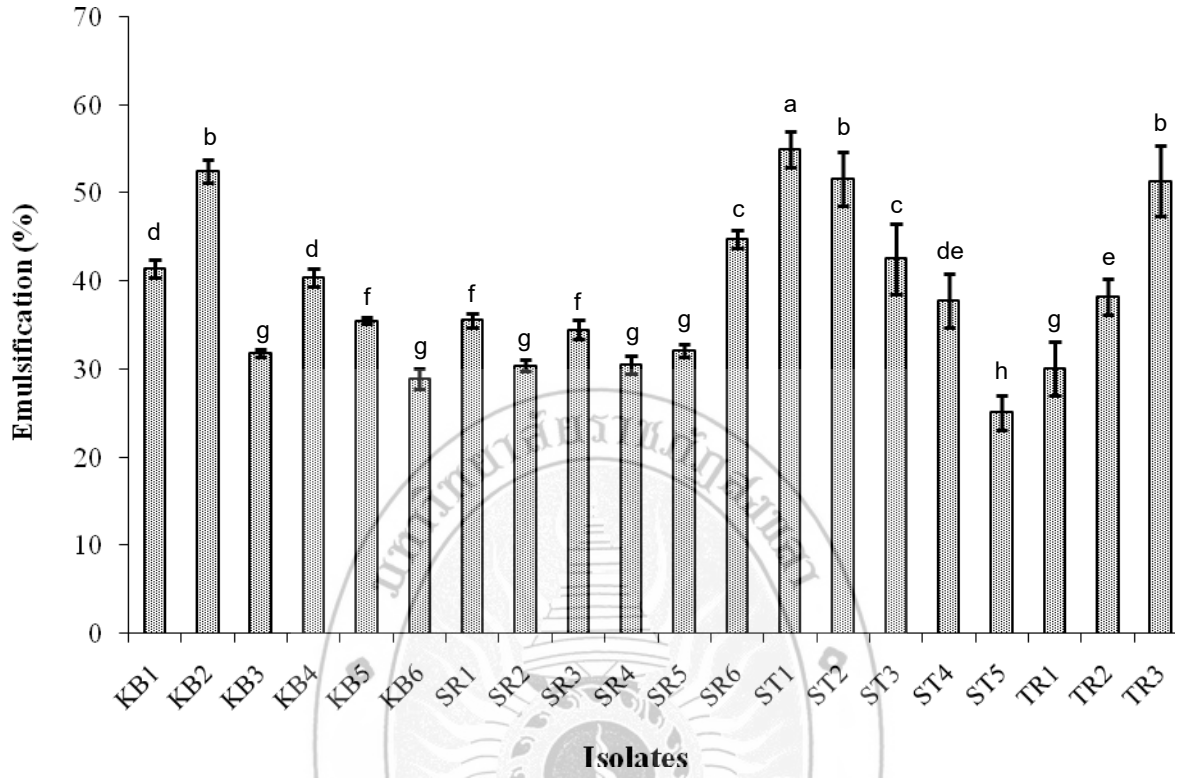
**ตารางที่ 2** แหล่งที่มา แหล่งคาร์บอน ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียและความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์ม

| ไอโซเลท | แหล่งที่มา | แหล่งคาร์บอน | การย้อมแกรม | EA (%) |
|---|---|---|---|---|
| KB1 | บริษัทกระบี่น้ำมันพืชจำกัด | กลูโคส | แกรมลบ | 41.50±3.80* |
| KB2 | บริษัทกระบี่น้ำมันพืชจำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมบวก | 52.51±6.30 |
| KB3 | บริษัทนามหงส์น้ำมันปาล์มจำกัด | กลูโคส | แกรมลบ | 31.87±4.41 |
| KB4 | บริษัทนามหงส์น้ำมันปาล์มจำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมลบ | 40.42±5.17 |
| KB5 | บริษัทปาล์มโมริชจำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมลบ | 35.54±6.22 |
| KB6 | บริษัทปาล์มโมริชจำกัด | กลูโคส | แกรมลบ | 28.93±3.18 |
| SR1 | บริษัททักษิณปาล์ม | น้ำมันปาล์ม | แกรมบวก | 35.58±5.01 |
| SR2 | บริษัทปาล์มไทยพัฒนาจำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมลบ | 30.45±3.22 |
| SR3 | บริษัทปาล์มไทยพัฒนาจำกัด | กลูโคส | แกรมลบ | 34.53±2.87 |
| SR4 | บริษัทลาภทวีปาล์มออยล์จำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมลบ | 30.50±3.57 |
| SR5 | บริษัทลาภทวีปาล์มออยล์จำกัด | กลูโคส | แกรมลบ | 32.17±7.52 |
| SR6 | บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์มจำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมบวก | 44.82±8.18 |
| ST1 | บริษัทปาล์มไทยพัฒนาจำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมลบ | 55.01±5.27 |
| ST2 | บริษัทปาล์มไทยพัฒนาจำกัด | กลูโคส | แกรมลบ | 51.64±4.85 |
| ST3 | บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์มจำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมลบ | 42.57±7.85 |
| ST4 | บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์มจำกัด | กลูโคส | แกรมลบ | 37.82±5.07 |
| ST5 | บริษัทสหรุ่งทรัพย์น้ำมันปาล์มจำกัด | น้ำมันปาล์ม | แกรมบวก | 25.10±4.88 |
| TR1 | บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม | น้ำมันปาล์ม | แกรมบวก | 30.09±5.42 |
| TR2 | บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม | กลูโคส | แกรมลบ | 38.27±6.08 |
| TR3 | บริษัทตรังอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม | น้ำมันปาล์ม | แกรมลบ | 51.38±4.89 |

*Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกมาได้นั้นมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย สายพันธุ์ และแหล่งคาร์บอน ค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในช่วงร้อยละ 25 ถึง 45 (ภาพที่ 4) สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีศักยภาพจะนำไปใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ทางการค้าได้ควรมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากกว่าร้อยละ 50 (Willumsen and Karlson, 1997) จากการทดลองในครั้งนี้มีเชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท (KB2, ST1, ST2 และ TR3) ที่มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มมากกว่าร้อยละ 50 โดยเชื้อแบคทีเรีย ST1 มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากที่สุด (ร้อยละ 55.01) ค่าการอิมัลซิ-

ไฟด์เออร์ของสารละลายส่วนใสจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท แสดงให้ถึงศักยภาพที่จะสามารถนำสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ทางการค้าได้




**ภาพที่ 4** กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มของสารละลายส่วนใสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้
Different lowercase letters at top of bars indicate significant differences ($p<0.05$)

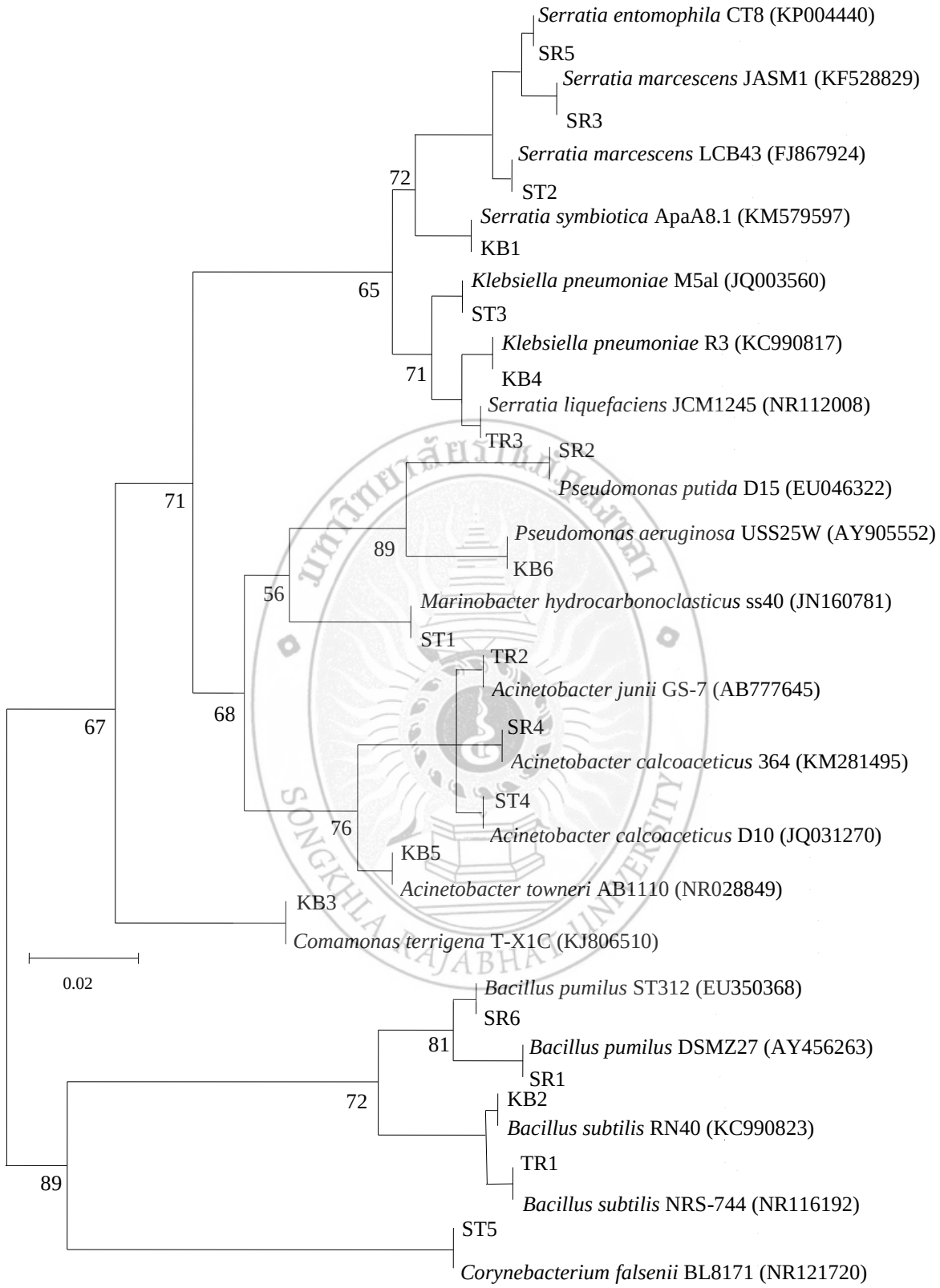
**2. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้**

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่มีสามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาศึกษาเพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol/chloroform DNA extraction (Ausubel et al., 1995) เพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primers ในช่วง 8f และ 1492r แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (QIAGEN, Inc.) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www. ncbi. nlm. nih. gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://www. ncbi. nlm.nim.gov) และดำเนินการขอ accession number จากการฝากข้อมูลลำดับ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 20 สายพันธุ์ไว้ใน GenBank นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ผลของการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน

GenBank และแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 20 สายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 5 ตามลำดับ

**ตารางที่ 3** แสดงการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) ของแบคทีเรียที่ผลิตสารอิมัลซิไฟด์-เออร์ชีวภาพซึ่งแยกได้และสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูลใน GenBank

| Taxonomic position | Strain code | 16S rRNA gene sequence Nearest relative in GenBank | Sequence identity (%) |
|---|---|---|---|
| Actinobacteria | ST5 | *Corynebacterium falsenii* BL8171 (NR121720) | 100 |
| Firmicutes | KB2 | *Bacillus subtilis* RN40 (KC990823) | 99 |
| | SR1 | *Bacillus pumilus* DSMZ27 (AY456263) | 100 |
| | SR6 | *Bacillus pumilus* ST312 (EU350368) | 100 |
| | TR1 | *Bacillus subtilis* NRS-744 (NR116192) | 99 |
| Proteobacteria | KB1 | *Serratia symbiotica* ApaA8.1(KM579597) | 100 |
| | KB3 | *Comamonas terrigena* T-X1C (KJ806510) | 98 |
| | KB4 | *Klebsiella pneumoniae* R3 (KC990817) | 99 |
| | KB5 | *Acinetobacter towneri* AB1110 (NR028849) | 100 |
| | KB6 | *Pseudomonas aeruginosa* USS25W (AY905552) | 99 |
| | SR2 | *Pseudomonas putida*D15 (EU046322) | 100 |
| | SR3 | *Serratia marcescens*JASM1 (KF528829) | 98 |
| | SR4 | *Acinetobacter calcoaceticus*364 (KM281495) | 98 |
| | SR5 | *Serratia entomophila*CT8 (KP004440) | 99 |
| | ST1 | *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ss40 (JN160781) | 100 |
| | ST2 | *Serratia marcescens* LCB43 (FJ867924) | 99 |
| | ST3 | *Klebsiella pneumoniae* M5al (JQ003560) | 100 |
| | ST4 | *Acinetobacter calcoaceticus* D10 (JQ031270) | 99 |
| | TR2 | *Acinetobacter junii* GS-7 (AB777645) | 99 |
| | TR3 | *Serratia liquefaciens* JCM1245 (NR112008) | 99 |




**ภาพที่ 5** แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยการใช้โปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูลของ NCBI

ผลจากเทียบเคียงสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่คัดแยกได้พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ Actinobacteria, Firmicutes และ Proteobacteria (ตารางที่ 2) เมื่อวิเคราะห์ในระดับจีนัสพบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 8 จีนัส จากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 20 ไอโซเลทโดยมีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลทในจีนัส *Serratia* (KB1, SR3, SR5, ST2 และTR3), 4 ไอโซเลทในจีนัส *Acinetobacter* (KB5, SR4, ST4 และ TR2) และ *Bacillus* (KB2, SR1, SR6 และTR1), 2 ไอโซเลทในจีนัส *Pseudomonas* (KB6 และ TG9) และ *Klebsiella* (KB4 และ ST3) และอีกอย่างละ 1 ไอโซเลทในจีนัส *Comamonas (*KB3*), Corynebacterium* (ST5) และ *Marinobacter* (ST1)

จีนัสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในการศึกษาครั้งนี้โดยส่วนใหญ่ ได้แก่ *Serratia*, *Acinetobacter*, *Bacillus, Pseudomonas* และ *Klebsiella* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยเฉพาะน้ำมัน (Saimmai et al., 2013) โดยเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มักสร้างสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันทำให้ง่ายต่อการเข้าถึงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Herman et al., 1997)

จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จัดอยู่ในจีนัส *Serratia* มากที่สุด (5 ไอโซเลท) *Serratia* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เชื้อสกุลนี้สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาวะไม่เหมาะสมได้ โดยสปอร์จะทนต่อความร้อนสูงได้และยังช่วยให้แบคทีเรียสามารถแพร่กระจายไปกับดิน น้ำ และอากาศได้ดีขึ้น (Nicholson et al., 2000) อีกทั้งยังมีความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพหลายกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพในกลุ่ม ลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) ที่ผลิตโดยเชื้อ *Serratia marcescens* NSK-1 ซึ่งมีคุณสมบัติในการอิมัลซิไฟด์สารประกอบไอโดรคาร์บอนและน้ำมันได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถคงกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ไว้ได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงถึงร้อยละ 12 หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (Anyanwu et al., 2011) นอกจากนี้ *Serratia* ยังผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ ชนิด serratamolide ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นรวมทั้งยังสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (Shanks et al., 2006)

*Acinetobacter* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในบริเวณดินที่ปนเปื้อนน้ำมันดิบหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Huy et al., 1999; Bento et al., 2005; Verma et al., 2006) อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบหรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโดยการสร้างสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเช่น OmpA เพื่อช่วยในการย่อยสลายสารดังกล่าวอีกทั้งยังมีรายงานการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพชนิด Alasan จากเชื้อ *Acinetobacter radioresistens* KA5 อีกด้วย (Walz et al., 2006)

เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในบริเวณที่ปนเปื้อนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Andretta et al., 2004; Mukherjee and Das, 2005; Toledo et al., 2006; Das and Mukherjee, 2007; Pornsunthorntawee et al., 2008) มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันดิบสารออแกนโนคลอรีน สารกำจัดศัตรูพืช และสารก่อมลพิษกลุ่มอื่นๆ โดยการสร้างสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพพวกลิโปเปปไทด์ (lipopeptides) เพื่อให้เพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของสารเหล่านั้นทำให้ง่ายต่อการเข้าถึงและย่อยสลายทั้งด้วยตัวมันเองและด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ (Ismail et al., 2013)

*Pseudomonas* sp. เป็นจีนัสของเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในบริเวณที่ปนเปื้อนของน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Bonilla et al., 2005 Olivera et al., 2009) มีความสามารถในการใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนหรือน้ำมันเป็นแหล่งพลังงานโดยมักผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพพวก

แรมโนลิปิดหรือลิโปเปปไทด์เพื่อช่วยให้ความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเพิ่มมากขึ้นทำให้ง่ายต่อการย่อยสลายเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Raza et al., 2007)

จากการเทียบเคียงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในครั้งนี้พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ทางการค้า (มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากกว่าร้อยละ 50) จำนวน 4 ไอโซเลทโดยเชื้อแบคทีเรีย *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มได้สูงที่สุดที่ร้อยละ 55.01 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนดังนั้นจึงเลือกเชื้อ *M. Hydrocarbonoclasticus* ST1 เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

**3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1**

**3.1 แหล่งคาร์บอน**

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในอาหาร minimal salt medium (MSM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร MSM ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำ คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทราย กากน้ำตาล และแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันรำข้าว ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักโดยมี $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 4) จากการทดลองพบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 โดยเชื้อดังกล่าวเจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในช่วง 1 -1.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่มีค่าต่ำกว่าอาหาร MSM ที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่ละลายน้ำเนื่องจากในระหว่างการเจริญเติบโตเชื้อจะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (อรกมล, 2553) เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มของสารละลายส่วนใสหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถอิมัลซิไฟด์น้ำมันได้มากที่สุดที่ร้อยละ 55.01 และ 34.51 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ จึงเลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 4** ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องอัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

| C-source, (1%, w/v) | Dry cell weight (g/l) | Final pH | Emulsification activity, EA (%) | Emulsification Index, EI (%) |
|---|---|---|---|---|
| Control | 0.15±0.02 | 6.98±0.01 | 2.57±0.58d* | 0e* |
| Glucose | 2.59±0.08 | 4.51±0.07 | 30.51±5.02c | 15.04±5.02d |
| Commercial sugar | 2.70±0.05 | 4.62±0.05 | 28.70±3.05c | 20.35±6.14c |
| Molasses | 2.81±0.03 | 4.63±0.04 | 60.08±4.25a | 40.40±4.25a |
| Soybean oil | 1.21±0.23 | 6.35±0.06 | 32.74±5.15c | 14.84±3.17d |
| Palm oil | 1.31±0.61 | 6.13±0.08 | 55.01±3.26b | 34.21±4.25b |
| Rice bran oil | 1.40±0.41 | 6.31±0.05 | 29.78±5.16c | 19.75±3.06c |

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

Control: No carbon source

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่เลือกนำมาใช้ เช่น Manivasagan และคณะ (2014) ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Streptomyces* sp. MAB 36 โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กลูโคส มอลโตส แลกโตส แป้ง ฟรุตโทส อะราบิโนส ซูโครส ไซโลส ราฟฟิโนส พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. MAB 36 สามารถเจริญได้ในแหล่งคาร์บอนทุกชนิด โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ฟรุตโทสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่าการอิมัลซิไฟด์มากที่สุดที่ร้อยละ 70.81 จากผลการศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตจึงมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเป็นอย่างมาก (Robert et al., 1989; Panilaitis et al., 2007; Abouseoud et al., 2008)

**3.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน**

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 โดยน้ำหนักตามลำดับและมี $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 การเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลจากร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 3.0 ส่งผลให้เชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นถึง 1.5 เท่า (ตารางที่ 5) โดยมีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 4.23 กรัมต่อลิตรที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับค่าพีเอชที่ลดลงเป็นสัดส่วนกับการเพิ่มขึ้นของกากน้ำตาล (ตารางที่ 4) การเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลส่งผลให้ค่า

EA และ EI เพิ่มขึ้น ที่ระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตรให้ค่า EA และ EI สูงสุดที่ร้อยละ 68.34 และ 48.25 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากกว่า 2.5 กรัมต่อลิตรไม่ส่งผลให้การเพิ่มค่า EA และ EI สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 5** ผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงในอาหาร MSM เป็น 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

| Molasses concentration (%) | Dry cell weight (g/l) | Final pH | Emulsification activity, EA (%) | Emulsification Index, EI (%) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0.13±0.01 | 6.98±0.02 | 2.50±0.21$^{e*}$ | 0$^{d*}$ |
| 1.0 | 2.81±0.03 | 4.63±0.04 | 60.08±4.25$^{d}$ | 40.40±4.25$^{c}$ |
| 1.5 | 2.98±0.04 | 4.56±0.05 | 62.07±3.05$^{c}$ | 42.15±5.17$^{c}$ |
| 2.0 | 3.25±0.02 | 4.43±0.02 | 66.85±2.51$^{b}$ | 45.47±3.05$^{b}$ |
| 2.5 | 3.61±0.31 | 4.23±0.04 | 68.34±2.05$^{a}$ | 48.85±2.18$^{a}$ |
| 3.0 | 4.23±0.20 | 4.11±0.03 | 68.18±5.24$^{a}$ | 48.61±3.27$^{a}$ |

* Different letters in the same column indicate significant different ($p$<0.05)
Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

**3.3 แหล่งไนโตรเจน**

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักโดยมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัดและยูเรีย แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ $NH_4Cl$ และ $NaNO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด 4.80 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน (ตารางที่ 6) จากการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 (ตารางที่ 6) โดย *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุด 4.80 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของ พีเอช พบว่าค่าพีเอชจะแตกต่างกันเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ $NaNO_3$ เปปโตนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเวลาผ่านไปค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้น อยู่ที่ 7.51-8.27 เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหาร หากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบไนเตรท ไนไตรท์ เมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนียหรืออัลคาไลน์อื่นๆ ออกมาทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ส่วนการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเวลาผ่านไปค่าพีเอชจะลดลงอยู่ที่ 4.23 และ 4.60

ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลซิไฟด์น้ำมันพบว่าการใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์สูงที่สุดที่ร้อยละ 72.12 และ 56.88 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในขั้นตอนต่อไป ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Saimmai (2012b) ที่ศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Leucobacter komagatae* 183 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีและใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, $NH_4Cl$, $NH_4NO_3$, เนื้อสกัด ผงชูรส ยีสต์สกัดและเปปโตน พบว่าสามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมากที่สุด 4.52 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ $NaNO_3$ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าอิมัลซิไฟด์ไซลีนได้ถึงร้อยละ 70 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

**ตารางที่ 6** ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน ใน ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องอัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

| N-source (0.1%) | Dry cell weight (g/l) | Final pH | Emulsification activity, EA (%) | Emulsification Index, EI (%) |
|---|---|---|---|---|
| Control | 1.24±0.27 | 5.98±0.02 | 20.58±3.78$^{g*}$ | 10.41±4.05$^{f*}$ |
| Peptone | 4.80±0.38 | 8.27±0.04 | 36.81±4.51$^{f}$ | 25.04±3.25$^{e}$ |
| Yeast extract | 4.29±0.44 | 4.60±0.05 | 52.27±5.15$^{d}$ | 40.57±4.67$^{d}$ |
| Urea | 3.85±0.12 | 7.94±0.02 | 47.58±4.81$^{e}$ | 35.47±5.24$^{b}$ |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 3.61±0.31 | 4.23±0.04 | 68.34±2.05$^{b}$ | 48.85±2.18$^{a}$ |
| $NH_4Cl$ | 3.20±0.21 | 4.81±0.03 | 56.80±5.73$^{c}$ | 42.61±6.04$^{c}$ |
| $NaNO_3$ | 3.58±0.54 | 7.51±0.41 | 72.15±5.02$^{a}$ | 56.88±5.02$^{a}$ |

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

Control: No nitrogen source

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

**3.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน**

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ $NaNO_3$ ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ $NaNO_3$ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 (ตารางที่ 7) การเพิ่มความเข้มข้นของ $NaNO_3$ จากร้อยละ 0.1 เป็นร้อยละ 0.5 ส่งผลให้เชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 เจริญเติบโตเพิ่มขึ้น

ถึงจาก 3.58 เป็น 3.83 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับค่า EA และ EI ที่เพิ่มสูงขึ้นขึ้น ที่ระดับความเข้มข้นของ $NaNO_3$ เท่ากับร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก ให้ค่า EA และ EI สูงสุดที่ร้อยละ 80.74 และ 60.78 ตามลำดับ การเพิ่มความเข้มข้นของ $NaNO_3$ มากกว่า 0.3 โดยน้ำหนักไม่ส่งผลให้ค่า EA และ EI เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ที่ร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 7** ผลความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องอัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

| $NaNO_3$ (%) | Dry cell weight (g/l) | Final pH | Emulsification activity, EA (%) | Emulsification Index, EI (%) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 1.98±0.47 | 7.21±0.25 | 30.27±6.25$^{d*}$ | 20.75±3.56$^{d*}$ |
| 0.1 | 3.58±0.54 | 7.51±0.41 | 72.15±5.02$^{c*}$ | 56.88±5.02$^{c*}$ |
| 0.2 | 3.63±0.98 | 7.67±0.04 | 76.15±5.11$^{b}$ | 58.41±3.55$^{b}$ |
| 0.3 | 3.83±0.47 | 7.86±0.05 | 80.74±4.35$^{a}$ | 60.78±4.37$^{a}$ |
| 0.4 | 3.83±0.62 | 7.84±0.02 | 80.28±5.21$^{a}$ | 60.73±5.29$^{a}$ |
| 0.5 | 3.83±0.38 | 7.83±0.04 | 80.54±3.52$^{a}$ | 60.57±2.15$^{a}$ |

$^{*}$ Different letters in the same column indicate significant different ($p$<0.05)
Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

**3.5 อัตราการเขย่า**

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ $NaNO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเขย่าที่ความเร็วรอบแตกต่างกันที่ 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 8) จากการทดลองพบว่าอัตราการเขย่ามีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 การเพิ่มอัตราการเขย่าจาก 50 เป็น 250 รอบต่อนาที ส่งผลให้เชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า (จาก 1.97 เป็น 3.95 กรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับค่า EA และ EI ที่เพิ่มสูงขึ้น ที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ให้ค่า EA และ EI สูงสุดที่ร้อยละ 80.58 และ 60.31 ตามลำดับ การเพิ่มอัตราการเขย่าสูงกว่า 150 รอบต่อนาที ไม่ส่งผลให้ค่า EA และ EI เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในขั้นตอนต่อไป

การเขย่าเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแขวนลอย สามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

**ตารางที่ 8** ผลของอัตราการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

| Shaking speed (rpm) | Dry cell weight (g/l) | Final pH | Emulsification activity, EA (%) | Emulsification Index, EI (%) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0.58±0.08 | 6.95±0.02 | 8.57±2.87$^{d*}$ | 5.14±2.87$^{d*}$ |
| 50 | 1.97±0.54 | 6.75±0.41 | 52.25±4.62$^{c}$ | 35.87±4.25$^{c}$ |
| 100 | 2.39±0.98 | 7.06±0.04 | 64.15±4.51$^{b}$ | 48.16±3.34$^{b}$ |
| 150 | 3.57±0.38 | 7.80±0.04 | 80.58±5.10$^{a}$ | 60.31±4.69$^{a}$ |
| 200 | 3.83±0.47 | 7.88±0.05 | 80.74±4.35$^{a}$ | 60.78±4.37$^{a}$ |
| 250 | 3.95±0.62 | 7.94±0.02 | 80.47±4.26$^{a}$ | 60.62±3.75$^{a}$ |

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

Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

**3.6 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ**

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ $NaNO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 (ตารางที่ 9) การเพิ่มพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 6.0 เป็น 8.0 ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อ *M. Hydrocarbonclasticus* ST1 ลดลงจาก 3.95 เป็น 3.09 กรัมต่อลิตร การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เนื่องจากในระหว่างการเจริญเติบโตเชื้อจะย่อยสลายสารอาหารทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อพีเอชเพิ่มสูงมากขึ้นส่งผลให้สภาวะในการเจริญของเชื้อไม่เหมาะสม (Saimmai, 2011) สอดคล้องกับรายงานของ Rukadee (2012) ที่ศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* AS6 พบว่าการเพิ่มพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อัตราการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* AS6 ลดลง พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยทั่วไปค่าพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอชที่เป็นกลาง จากการทดลองพบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 ให้ค่าการอิมัลซิไฟด์สูงสุดที่ร้อยละ 80.58 และ 60.31 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ

ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในขั้นตอนต่อไป

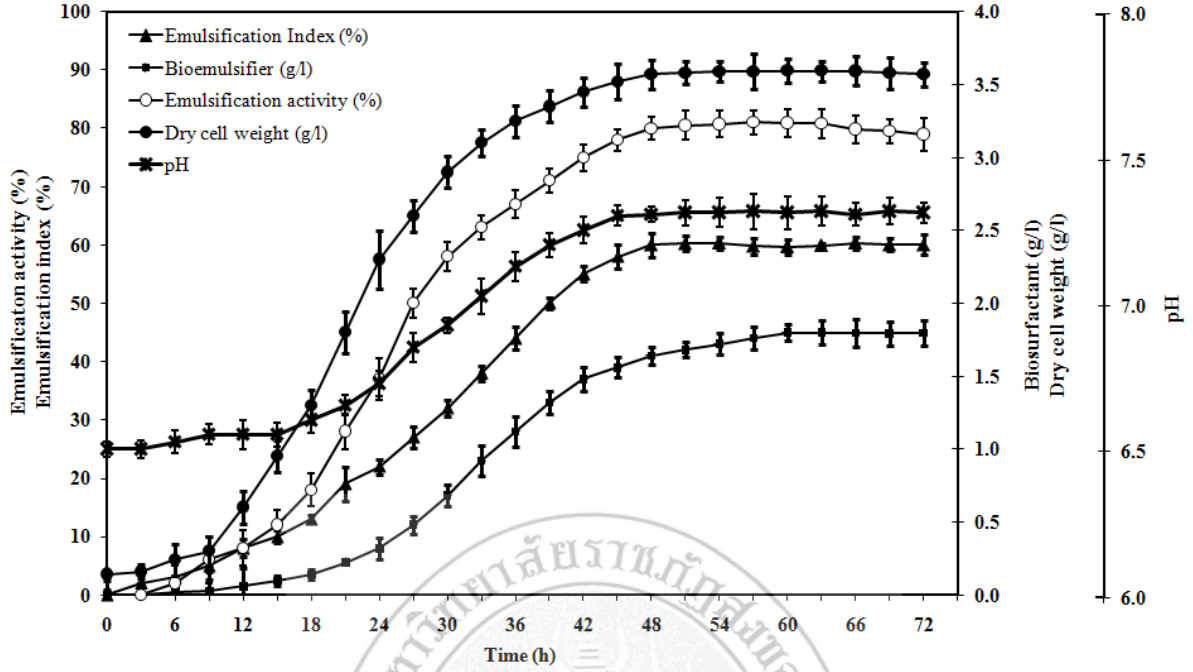
**ตารางที่ 9** ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที

| Initial pH | Dry cell weight (g/l) | Final pH | Emulsification activity, EA (%) | Emulsification Index, EI (%) |
|---|---|---|---|---|
| 6.0 | 3.95±0.47 | 6.79±0.18 | 55.51±5.02$^{e*}$ | 33.70±4.05$^{e*}$ |
| 6.5 | 3.73±0.38 | 7.20±0.47 | 68.03±4.18$^{c}$ | 54.13±5.42$^{c}$ |
| 7.0 | 3.57±0.38 | 7.80±0.04 | 80.58±3.10$^{a}$ | 60.31±4.69$^{a}$ |
| 7.5 | 3.38±0.71 | 7.98±0.08 | 78.46±4.63$^{b}$ | 56.84±3.57$^{b}$ |
| 8.0 | 3.09±0.29 | 8.29±0.13 | 65.71±3.78$^{d}$ | 50.29±5.65$^{d}$ |

$^{*}$ Different letters in the same column indicate significant different ($p$<0.05)
Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

**3.7 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1**

เลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และมี $NaNO_3$ ร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงมาตรวจวัดการเจริญ ค่า pH และค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน (ภาพที่ 6) จากการทดลองพบว่าเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 มีการเจริญและเพิ่มจำนวนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อและมีแนวโน้มการเจริญเติบโตตามระยะเวลาการเลี้ยงโดยการเจริญสูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง ด้วยค่าน้ำหนักเซลแห้งที่ 3.60 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 โดยการวัดค่า EA และ EI พบว่าจะเริ่มผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพและปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเริ่มเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีกิจกรรมสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมงโดยมีค่า EA และ EI เท่ากับ ร้อยละ 81 และ 60 ตามลำดับ เมื่อเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยวิธีการตกตะกอนด้วยกรดพบว่าสามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้มากที่สุดที่เวลาการเลี้ยง 60 ชั่วโมง โดยสามารถเก็บเกี่ยวได้ 1.85 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกเวลาในการเลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ที่ 60 ชั่วโมงเพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป




**ภาพที่ 6** การเจริญเติบโต การผลิต และกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้กากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และมี $NaNO_3$ ร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

**4. การศึกษาวิธีการสกัดสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1**

หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 เป็นเวลา 60 ชั่วโมง กำจัดตัวเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสที่ได้มาศึกษาการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยการปรับค่าพีเอช แอมโมเนียมซัลเฟต อะซีโตน เมทานอล เอทานอล และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (chloroform:methanol, 2:1) จากวิธีการเก็บเกี่ยวทั้ง 6 วิธี พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพดีที่สุด (ตารางที่ 10)

**ตารางที่ 10** เปรียบเทียบวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1

| Recovery method | Yield (g/l) | EA (%) | EI (%) |
|---|---|---|---|
| Acid precipitation | 6.25±1.45[a*] | 45.11±5.50[a*] | 35.17±3.50[a*] |
| Acetone precipitation | 5.12±1.5[a*] | 55.54±3.6[4a*] | 45.57±4.78[a*] |
| $(NH_4)_2SO_4$ precipitation | 4.44±0.79[a] | 56.90±5.87[a] | 40.08±3.59[a] |
| MeOH precipitation | 2.15±0.58[b] | 64.75±6.48[b] | 54.58±3.68[b] |
| EtOH precipitation | 2.16±0.89[b] | 71.89±5.45[b] | 51.97±5.75[b] |
| $CH_3Cl$:MeOH extraction | 1.85±0.18[b] | 81.00±1.38[b] | 60.01±4.63[b] |

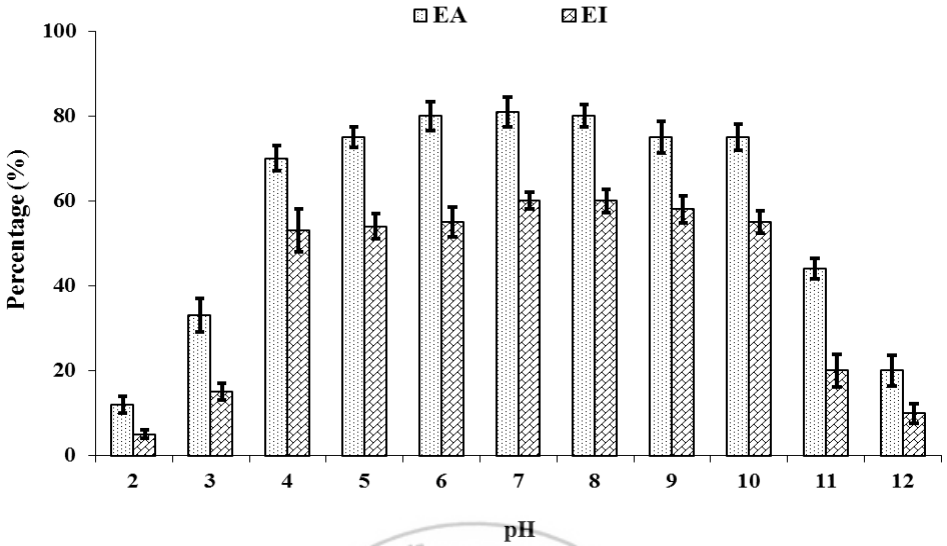
[*] Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

จากการทดลองพบว่าการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยการปรับค่าพีเอชสามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบได้มากที่สุด 6.25 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันสำหรับสารสกัดหยาบที่ได้นั้นมีค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บเกี่ยวโดยวิธีอื่นๆ เนื่องจากสารสกัดหยาบที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์อยู่น้อย (Chooklin et al., 2014) การเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพด้วยการสกัดโดยใช้สารละลายอินทรีย์ (chloroform:methanol, 2:1) มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมากที่สุดสามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบได้ 1.85 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร สูงที่สุดที่ร้อยละ 81 และ 60 สำหรับค่า EA และ EI ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

**5. คุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้**

**5.1 การศึกษาความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่าง**

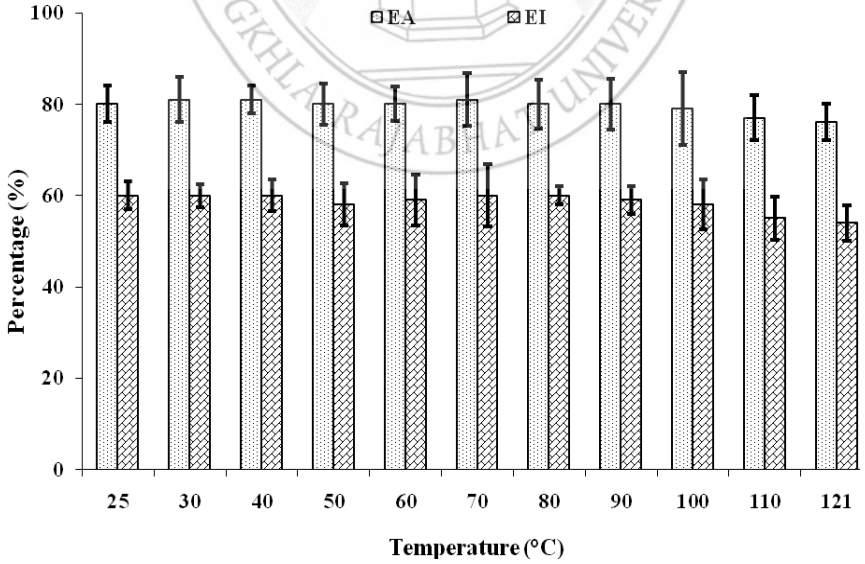
นำสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ละลายในน้ำกลั่นที่ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 2.0-12.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วทดสอบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 7 จากการทดลองพบว่าสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 จะให้กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์ในช่วงพีเอชที่กว้างตั้งแต่ 4 ถึง 10 ซึ่งให้ค่าการอิมัลซิไฟด์ในช่วงร้อยละ 72-81 และ 53-60 สำหรับค่า EA และ EI ตามลำดับ เมื่อปรับพีเอชให้ลดลงต่ำกว่า 4 หรือมากกว่า 11 จะทำให้กิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์ลดลงอย่างมากเนื่องจากสารอิมัลซิไฟด์เออร์เกิดการตกตะกอนในสภาวะที่เป็นกรดสูงและด่างสูง (Sutthivanitchakul et al., 1999) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Vaz และคณะ (2012) ที่พบว่าค่าการอิมัลซิไฟด์ของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* มีค่าคงที่ในช่วงพีเอช 5.0-10.0 และลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 เนื่องจากสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพบางส่วนตกตะกอน




**ภาพที่ 7** ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1

**5.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้**

นำสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้จากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ละลายในน้ำกลั่นที่ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งไว้ให้อุณหภูมิกลับลงมาที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันผลการทดลองแสดงในภาพที่ 8



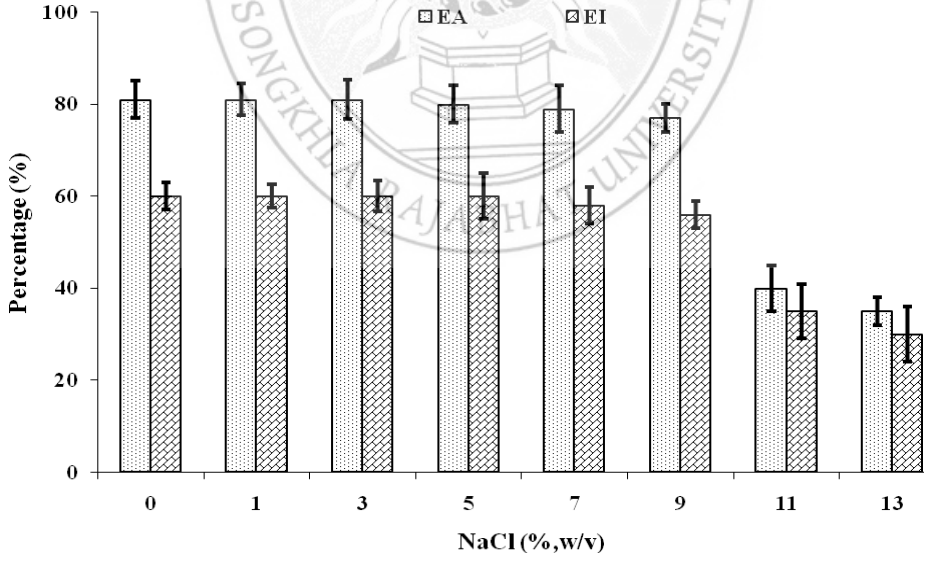

**ภาพที่ 8** ผลของระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิในช่วง 25-121 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้ ซึ่งเห็นได้จากค่า EA และ EI ที่ค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วงร้อยละ 76-81 และ 54-60 ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษา Wang และคณะ (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* strain JA-1 พบว่าสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 4-100 องศาเซลเซียส โดยมีค่า EI อยู่ในช่วงร้อยละ 72-75

**5.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้**

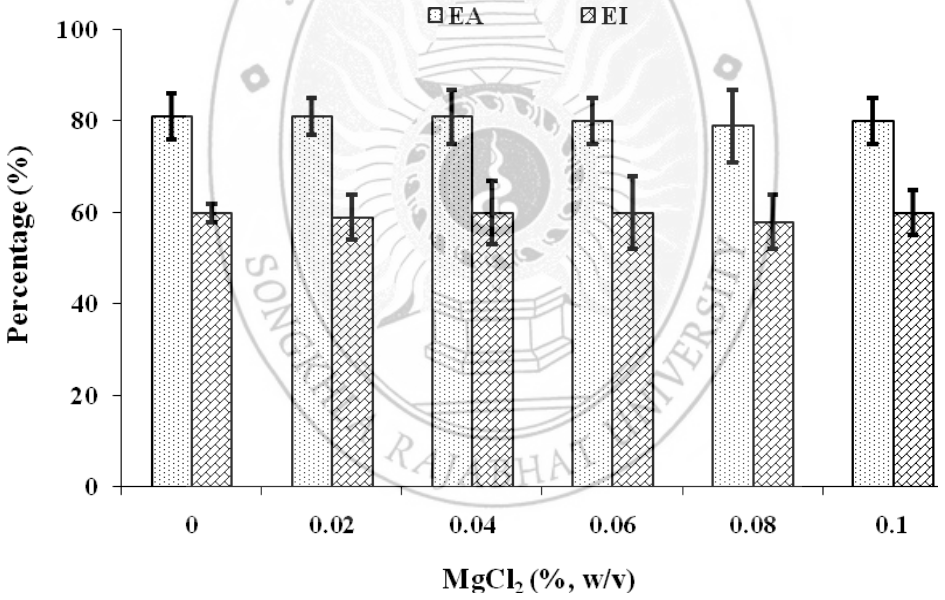
ในการประยุกต์ใช้สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพในการกำจัดคราบน้ำมันและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ปนเปื้อนในทะเล โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำทะเลอาจมีผลต่อการทำงานของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ ดังนั้นจึงต้องศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้

ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 พบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1-9 โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 77-81 และ 56-60 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มากกว่าร้อยละ 9 โดยน้ำหนัก กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์เออร์จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 9) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมีประสิทธิภาพลดลง จากรายงานของ Thimon และคณะ (1992) ไอออนของเกลือจะมีผลต่อโครงสร้างของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ เนื่องจากไอออนของเกลือจะจับหมู่คาร์บอกซิลิกของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ

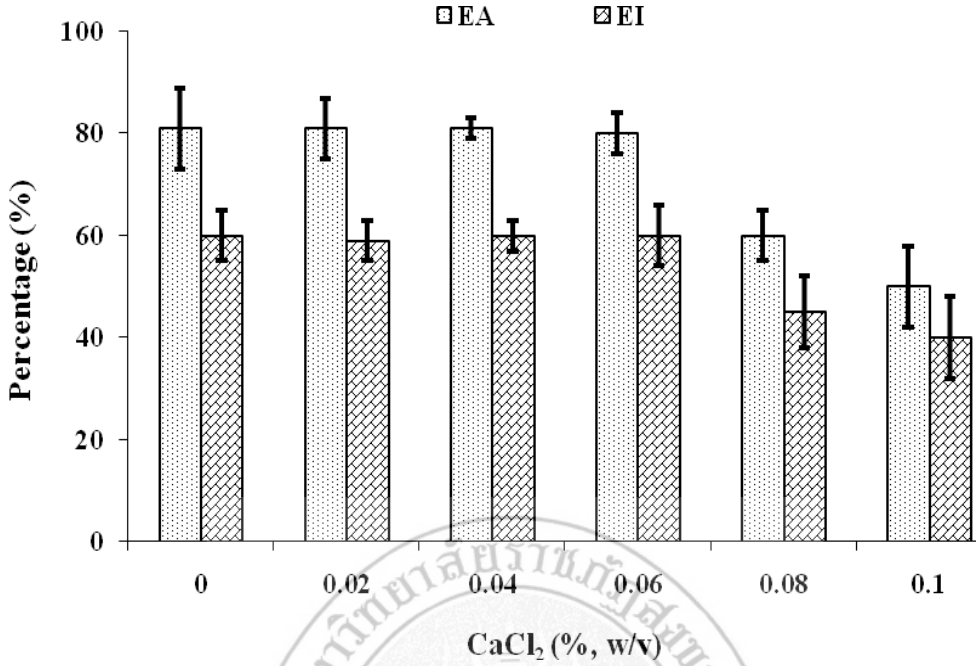



**ภาพที่ 9** ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1

ภาพที่ 10 แสดงผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 76-81 และ 54-60 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ และจากศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 พบว่าที่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.06 โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ (ภาพที่ 11) โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันอยู่ในช่วงร้อยละ 76-81 และ 54-60 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 0.06 ความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าลดลงสอดคล้องกับผลการทดลองของ Maneerat และ Phetrong (2007) ที่ศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Myroides*sp. SM1 ซึ่งแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Myroides*sp. SM1 มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-9 โดยน้ำหนักและการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้เพียงเล็กน้อย แต่การเติมแคลเซียม-คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4-18 มิลลิโมลทำให้สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพสูญเสียกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน




**ภาพที่ 10** ผลของเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1




**ภาพที่ 11** ผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

# บทที่ 5

# บทสรุปและข้อเสนอแนะ

## บทสรุป

จากการศึกษาการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทยพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมดจำนวน 421 ไอโซเลท นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal salt medium (MSM) ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์ความสามารถในการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยวิธี emulsification activity (EA) พบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มจำนวน 20 ไอโซเลท จากการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี 16S rRNA พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ Actinobacteria, Firmicutes และ Proteobacteria โดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Proteobacteria มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มได้สูงสุดที่ร้อยละ 55 เมื่อใช้น้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 คือ อาหาร MSM ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 โดยใช้กากน้ำตาลและ $NaNO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง มีกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มสูงสุดที่ร้อยละ 81 และ 60 สำหรับ EA และ emulsification index (EI) ตามลำดับ จากการศึกษาวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 พบว่าการสกัดสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform:methanol ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตรสามารถเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่มีค่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูงสุดโดยมีค่า EA และ EI ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรเท่ากับร้อยละ 81 และ 60 ตามลำดับ สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้ 1.85 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้พบว่ามีความคงตัว ในช่วงพีเอช 4-10 อุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียส โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์ในช่วงร้อยละ 72-81 และ 53-60 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 9 โดยพบว่าค่าการอิมัลซิไฟด์สูงกว่าร้อยละ 77 และ 56 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ มีความคงตัวต่อแมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 และ 0-0.06 ตามลำดับ

## ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกอื่นๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ในถังหมักขนาดใหญ่ เพื่อเพิ่มผลผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ

3. ศึกษาการนำสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 ไปประยุกต์ใช้ในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม สิ่งแวดล้อม และการยับยั้งเชื้อก่อโรค

## เอกสารอ้างอิง


กุลนรี เพชรรงค์. 2550. การผลิตและการทำบริสุทธิ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ที่แยกได้จากทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปิ่นกาญจน์ ราชรักษ์. 2549. การคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างลดแรงตึงผิวจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันเพื่อย่อยสลายฟีแนนทรีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร.

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

Abushady, H.M., Bashandy, A.S., Aziz, N.H. and Ibrahim, H.M.M. 2005. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. Int. J. Agri. Biol. 7: 337-344.

Arima, K., Kakinuma. A. and Tamura, G. 1968. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis:* isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31: 488-494

Andretta, C.W.S., Rosa, R.M., Tondo, E.C., Gaylarde, C.C. and Henriques, J.A.P. 2004. Identification and molecular characterization of a *Bacillus subtilis* IS13 strain involved in the biodegradation of 4,5,6-trichloroguaiacol. Chemosphere. 55: 631-639.

Anyanwu, C.U., Obi, S.K.C. and Okolo, B.N. 2011. Lipopeptide biosurfactant production by Serratia marcescens NSK-1 strain isolated petroleum-contaminated soil. J. Appl. Sci. Res. 3:79-87.

Aparna, A., Srinikethan, G. and Hegde, S. 2012. Isolation, screening and production of biosurfactant by *Bacillus clausii* 5B. Res. J. Biotechnol. 3: 49-56.

Banat, I.M., Makkar, R.S. and Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 495-508.

Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J. and Marchant, R. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87:427-444.

Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R. and Totola, M.R. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. Biores. Technol. 97: 868-875.

Bayoumi, R.A., Haroun, B.M., Ghazal, E.A. and Maher, Y.A. 2010. Structural analysis and characteristics of biosurfactants produced by some crude oil utilizing bacterial strains. Aust. J. Basic Appl. Sci. 4: 3484-3498.

Bento, F.M., Camargo, F.A., Okeke, B.C. and Frankenberger, W.T. 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. Microbiol. Res. 160: 249-255.

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

Bodour, A.A., Drees, K.P. and Raina, M.M. 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3280-3287.

Bonilla, M., Olivaro, C., Corona, M., Vazquez, A. and Soubes, M. 2005. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. J. Appl. Microbiol. 98:456-463.

Chooklin, C.C., Petmeaun, S., Maneerat, S. and Saimmai, A. 2014. Isolation and characterization of a biosurfactant from *Deinococcus caeni* PO5 by using jackfruit seed powder as a substrate. Ann. Microbiol. 64: 1007-1020

Cooper, D.G. and Goldberg, B.G. 1987. Surface active agents from *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. 53: 224-229.

Das, K. and Mukherjee, A.K. 2007. Comparison of lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactant. Process Biochem. 42: 1191-1199.

Das, P., Mukherjee, S. and Sen, R. 2009. Substrate dependent production of extracelullar biosurfactant by a marine bacterium. Biores. Technol. 100: 1015-1019.

Desai, J.D. and Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 47-64.

El-sersy, N.A. 2012. Plackett-Burman design to optimize biosurfactant production by marine *Bacillus subtilis* N10. Rom. Biotechnol. Lett. 17: 7049-7064.

Fagade, O.E., Okolie, B.I. and Balogun, S. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources on biosurfactant producing *Bacillus* species isolates. Nig. J. Microbiol. 23: 1915-1921.

Fonseca, R.R., Silva, A.J.R., de Franca, F.P., Cardoso, V.L. and Servulo, E.F.C. 2007. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. Appl. Biochem. Biotechnol. 471: 136-140.

Frazer, L. 2000. Lipid lather removes metals. Environ. Health Perspect. 108: 320-324.

Ghribi, D. and Ellouze-Chaabouni, S. 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. Biotechnol. Res. Int. doi:10.4061/2011/653654.

Gnanamani, A., Kavitha, V., Radhakrishnan, N. and Mandal, A.B. 2010. Bioremediation of crude oil contamination using microbial surface-active agents: isolation, production and characterization. J. Bioremed. Biodegrad. 1: 107-115.

Gogotov, I.N. and Miroshnikov, A.I. 2009. The influence of growth medium composition and physicochemical factors on biosurfactant production by the bacterium *Bacillus licheniformis* VKM B-511. Appl. Biochem. Microb. 45: 588-592.

Herman, D.C., Lenhard, R.J. And Miller, R.M. 1997. Formation and removal of hydrocarbon residual in porous media: effect of attached bacteria and biosurfactant. Environ. Sci. Technol. 31: 1290-1294.

Huy, N.Q., Jin, S., Amada, K., Haruki, M., Huu, N.B., Hang, D.T., Ha, D.T., Imanaka, T., Morikawa, M. and Kanaya, S. 1999. Characterization of petroleum degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. J. Biosci. Bioeng. 88: 100-102.

Ismail, W., Al-Rowaihi, I.S., Al-Humam, A.A., Hamza, R.Y., Nayal, A.M.E. and Bououdina, M. 2013. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. Int. Biodete. Biodegrad. 84: 168-178.

Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai, A.J. 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Biores. Technol. 99: 195-199.

Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A. and Ritchkova, M.I. 2001. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyltertiary-butyl ether extraction. J. Microb. Meth. 46: 149-156.

Maneerat, S. and Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29: 781-791.

Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H. and Kawai, K. 2006. A novel crude oil emulsifier extracted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. SM7. Appl. Microbiol. Biotechnol. 70: 254-259.

Manivasagan, P., Sivasankar, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S.K. 2014. Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36. Bioproc. Biosyst. Eng. 37: 783-797.

Mukherjee, A.K. and Das, K. 2005. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. FEMS Microbiol. Ecol. 54: 479-489.

Mulligan, C.N. and Gibbs, B.F. 1993. Factors Influencing the Economics of Biosurfactants. *In* Biosurfactants, Production, Properties and Applications. Vol. 13. (Kosaric, N., ed.). pp. 329-371. Marcel Dekker, Inc. New York.

Nagal, S. and Jain, P.C. 2010. Production of feather hydrolysate by *Elizabethkingia meningoseptica* KB042 MTCC 8360 in submerged fermentation. Indian J. Microbiol. 50: S41-S45.

Najafia, A.R., Rahimpoura, M.R., Jahanmiria, A.H., Roostaazadb, R., Arabianb, D. and Ghobadib, Z. 2010. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus*

*mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. J. Chem. Eng. 163: 188-194.

Nicholson, S.E, Yin, X. and Ba, M.B. 2000. On the feasibility of using a lake water balance model to infer rainfall: an example from Lake Victoria. Hydrol. Sci. J. 45: 75-95.

Noparat, P., Maneerat, S. and Saimmai, A. 2014. Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3. World J. Microbiol. Biotechnol. 30: 865-877.

Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Microbial. 61: 3240-3244.

Olivera, N.L., Nievas, M.L., Lozada, M., Prado, G., Dionisi, H.M. and Sineriz, F. 2009. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. Res. Microbiol. 160: 19-26.

Panilaitis, B., Castro, G.R., Solaiman, D. and Kaplan, D.L. 2007. Biosynthesis of emulsion biopolymers from agro-based feedstocks. J. Appl. Microbiol. 102: 531-537.

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

Priya, T. and Usharani, G. 2009. Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Botany Res. Int. 2: 284-287.

Providenti, M.A., Flemming, C.A., Lee, H. and Trevors, J.T. 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactant or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. FEMS. Microbiol. Ecol. 17: 15-26.

Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutoas, Y., Petsas, I., Marchant, R. and Banat, I.M. 2003. Enhanced bioremediation of *n*-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipids and micronutrients. Biores. Technol. 90: 159-168.

Raza, Z.A., Khan, M.S. and Khalid, Z.M. 2007. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. Process Biochem. 42: 686-692.

Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. and Guinea, J. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. Biotechnol. Lett. 11: 871-874.

Ron, E. and Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol. 13:249-252.

Rosenberg, E., Ziclerberg, A., Rubinowitz, C. and Gutnick, D.L. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. Appl. Environ. Microbiol. 37: 402-408.

Rukadee, O. 2012. Screening of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil mills, optimization and characterization of biosurfactant produced by selected strain. Master Thesis, Prince of Songkla University, Thailand.

Saimmai, A., Rukadee, O., Onlamool, T., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2012a. Characterization and phylogenetic analysis of microbial surface active compounds-producing bacteria. Appl. Biochem. Biotechnol. 168: 1003-1018.

Saimmai, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2011. Molasses a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. Appl. Biochem. Biotechnol. 165: 315-335.

Saimmai, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2012b. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. Ann. Microbiol. 62: 391-402.

Saimmai, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2012c. Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant producing bacteria. Ann. Microbiol. 62: 1669-1679.

Saimmai, A., Udomsilp, S. and Maneerat, S. 2013. Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium of *Inquilinus limosus* KB3 grown on low-cost raw materials. Ann. Microbiol. 63: 1327-1339.

Salehizadeh, H. and Mohammadizad, S. 2009. Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis*. Iran. J. Biotechnol. 7: 216-223.

Shanks, R.M.Q., Stella, N.A., Lahr, R.M., Wang, S., Veverka, T.I., Kowalski, R.P. and Liu, X. 2006. Serratamolide is a hemolytic factor produced by *Serratia marcescens.* Plos One. 7: e36398.

Shete, A.M., Wadhawa, G., Banat, I.M. and Chopade, B.A. 2006. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. J. Sci. Ind. Res. 65: 91-115.

Singh, P. and Cameotra, S.S. 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends Biotechnol. 22: 142-146.

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

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

Toledo, F.L., Calvo, C., Rodelas, B. and Gonzalez-Lopez, J. 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. Syst. Appl. Microbiol. 29: 244-252.

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 Surf. 89: 167-174.

Verma, S., Bhargava, R. and Pruthi, V. 2006. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. Int. Biodete. Biodegrad. 57: 207-213.

Walzer, G., Rosenberg, E. and Ron, E.Z. 2006. The Acinetobacter outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. Environ. Microbiol. 8:1026-1032.

Wang, J., Ji, G., Tian, J., Zhang, H., Dong, H. and Yu, L. 2011. Functional characterization of a biosurfactant-producing thermo-tolerant bacteria isolated from an oil reservoir. Pet. Sci. 8:353-356.

Wei, Y.H., Chou, C.L. and Chang, J.S. 2005. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. J. Biochem. Eng. 27: 146-154.

Willumsen, P.A. and Karlson, U. 1997. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation. 7: 415-423.

Younis, M.A.M., Hezayen, F.F., Nour-Eldein, M.A. and Shabeb, M.S.A. 2010. Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. American-Eurasian J. Agricul. Environ. Sci. 7: 31-37.

Zhao, B.G., Wang, Z.S., Zhou, A.G., Wang, L.Z. and Yu, Q.L. 2009. Effect of microbial degradation lignin on fermentation characteristic of distillers grain *in vitro*. Pakistan J. Nutri. 8: 1411-1414.

Zhi-feng, L., Guang-ming, Z., Hua, Z., Hai-yan, F., Xiao-lan, L. 2010. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* CCTCC AB93108. J. Cent. South Univ. Technol. 17: 516-521.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

# ภาคผนวก

## 1. สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 Mineral salt medium (MSM) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| $K_2HPO_4$ | 0.80 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 0.20 | กรัม |
| $CaCl_2$ | 0.05 | กรัม |
| $MgCl_2$ | 0.50 | กรัม |
| $FeCl_2$ | 0.01 | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1.00 | กรัม |
| NaCl | 5.00 | กรัม |

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

1.2 Minimal Salt Medium Agar ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

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

1.3 Nutrient Broth ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Beef extract | 3.0 | กรัม |
| Peptone | 5.0 | กรัม |

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

**2. การจำแนกแบคทีเรียทางสัณฐานวิทยา**

**การย้อมสีแกรม**

ใช้ loop เกลี่ยเชื้อบนสไลด์บางๆ ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างสีออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดสีซาฟรานิน (safranin) ประมาณ 15-30 วินาที ล้างน้ำ ซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (Sneath, 1986)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

## ประวัติผู้วิจัย

**หัวหน้าโครงการ**

**ชื่อ (ภาษาไทย)** นางสาวปวีณา ดิกิจ
**ชื่อ (ภาษาอังกฤษ)** Miss Paweena Dikit
**ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)
โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

**ประวัติการศึกษา**

| ระดับปริญญา | อักษรย่อ | สาขาวิชา | ชื่อสถาบัน | ประเทศ |
|---|---|---|---|---|
| ตรี | วท.บ. | เทคโนโลยีชีวภาพ (เกียรตินิยมอันดับ 1) | ม.สงขลานครินทร์ | ไทย |
| เอก | ปร.ด. | เทคโนโลยีชีวภาพ | ม.สงขลานครินทร์ | ไทย |

**ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ**

| ปี พ.ศ. | ทุนการศึกษาหรือทุนวิจัย | แหล่งทุน |
|---|---|---|
| 2544 | ทุนมหาดไทย | กระทรวงมหาดไทย |
| 2548 | อุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 2549 | ทุนโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา | สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา |

**ประวัติการทำงาน**

สิงหาคม 2553 - ปัจจุบัน: อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)
โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

**ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่**

1. Maneerat, S. and **Dikit, P**. 2007. Characterization of cell-associated bioemulsifier from *Myroides* sp. SM1, a marine bacterium. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29: 769-779.

2. **Dikit, P**., Maneerat, S. and H-Kittikun, A. 2010. Mannoprotein from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation: extraction and characterization. J. Food Process Eng. Accepted.

3. **Dikit, P**., Maneerat, S., Musikasang, H. and H-Kittikun, A. 2010. Bioemulsifier from isolated yeast obtained from Thai traditional liquor distillation: extraction and characterization. ScienceAsia. 36: 312-318.

4. **Dikit, P**., Methacanon, P., Visessanguan, W., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2010. Characterization of an unexpected bioemulsifier from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation. Int. J. Biol. Macromol. 47: 465-470.

5. วิชุดา กล้าเวช, ฮายาตี เจ๊ะตาเห, ศิริพร เจ้ยทองศรี และ **ปวีณา ดิกิจ.** 2557. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสจากสารสกัดผักพื้นบ้านในจังหวัดพัทลุง. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ฉบับพิเศษ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

6. **Dikit, P**., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2015. Survival of encapsulated potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* D6SM3 with bioemulsifier derived from spent yeast in simulated gastrointestinal conditions. Songklanakarin J. Sci. Technol. Accepted.

**การนำเสนอผลงานวิชาการ**

1. **Dikit, P**., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2007. Extraction and purification of mannoprotein from spent yeast obtained from traditional liquor distillation. The 7th National Graduate Research Conference. Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani, Thailand. 4-5 April 2007.

2. **Dikit, P.,** H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2008. The emulsification property of mannoprotein from spent yeast obtained from traditional liquor distillation. Commission on Higher Education Congress I. University staff Development Consortium. Ambassador City Jomtien, Pattaya, Chonburi, Thailand. 5-7 September 2008.

3. Maneerat, S., **Dikit, P**., Musikasang, H. and H-Kittikun, A. 2009. Mannoprotein from *Saccharomyces cerevisiae* KA01 obtained from Thai traditional liquor distillation: Extraction and characterization. The 9th Annual Meeting of the Thailand Research Fund. Holiday Inn Resort Reagent Beach, Cha-am, Petchburi, Thailand. 15-17 October 2009.

4. **Dikit, P**., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2010. Survival of encapsulated probiotic *Lactobacillus plantarum* D6SM3 with bioemulsifier derived from spent yeast in simulated gastrointestinal conditions. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. International Conference on Biotechnology for Healthy Living. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand. 20-22 October 2010.

5. ฮายาตี เจ๊ะตาเห, ศิญาพร เจ้ยทองศรี, **ปวีณา ดิกิจ** และวิชุดา เกตุใหม่. 2555. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลมะเดื่อ. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 22. วิถีไทย วิถี

อาเซียน วิถีแห่งความร่วมมือ. ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี. หาดใหญ่. สงขลา. 23-26 พฤษภาคม 2555.

6. **ปวีณา ดิกิจ**, มทิรา อวะภาค, วาสนา มู่สา และ อรนุช สุขอนันต์. 2556. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลโตนดสด. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 5 “ฐานการวิจัยมหาวิทยาลัยกับการพัฒนาท้องถิ่น. ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 17-18 กรกฎาคม 2556.

7. Saimmai A, Petmeaun S, **Dikit P** and Maneerat S, 2013. Isolation and screening of exopolysaccharide-producing bacteria from mangrove sediment by using palm oil mill effluent as a substrate. TSB International Forum 2013. August 28-30, 2013. BITEC Bang Na, Bangkok, Thailand pp. 48-51.

8. Saimmai A, Petmeaun S, **Dikit P** and Maneerat S, 2013. Diversity of exopolysaccharide producing-bacteria from mangrove sediment in south of Thailand. TSB International Forum 2013. August 28-30, 2013. BITEC Bang Na, Bangkok, Thailand pp. 40-43.

9. **Dikit, P**., Riansa-ngawong, W., Chookaew, T., Maneerat, S., Hwanhlem, N., Kamcharoen, A. and Saimmai, A. 2015. Production and antimicrobial activity of biosurfactant from mangrove isolated *Rubrimonas Cliftonensis* NA 1. 8th TSAE International conference 17-19 March 2015. Bangkok International Trade and Exhibition centre, Bangkok, Thailand.

10. **Dikit, P**., Riansa-ngawong, W., Chookaew, T., Maneerat, S., Hwanhlem, N., Kamcharoen, A. and Saimmai, A. 2015. Production and characterization of biosurfactant produced by Ochrobactrum anthropi 2/3 using Durian seed powder as a novel substrate. 8th TSAE International conference 17-19 March 2015. Bangkok International Trade and Exhibition centre, Bangkok, Thailand.

11. **ปวีณา ดิกิจ**, เพ็ญทิพย์ แก้วจันทร์ และรัชฎา เหร็มอะ. 2558. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* D6SM3 โดยเทคนิคเอกซ์ทรูชั่น. การประชุมวิชาการระดับชาติ ราชภัฏวิจัยครั้งที่ 3 “สหวิทยาการ งานวิจัย และนวัตกรรมอุดมศึกษาเพื่อการพัฒนาท้องถิ่นไทยก้าวไกลสู่อาเซียน”. ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. 20-22 พฤษภาคม 2558.

**ผู้ร่วมวิจัย**

**ชื่อ (ภาษาไทย)** นายอทิพันธ์ เสียมไหม
**ชื่อ (ภาษาอังกฤษ)** Mr. Atipan Saimmai
**ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

**ประวัติการศึกษา**

| ระดับปริญญา | อักษรย่อ | สาขาวิชา | ชื่อสถาบัน | ประเทศ |
|---|---|---|---|---|
| ตรี | วท.บ. | อุตสาหกรรมเกษตร (เกียรตินิยมอันดับ 2) | ม.สงขลานครินทร์ | ไทย |
| เอก | ปร.ด. | เทคโนโลยีชีวภาพ | ม.สงขลานครินทร์ | ไทย |

**ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ**

| ปี พ.ศ. | ทุนการศึกษาหรือทุนวิจัย | แหล่งทุน |
|---|---|---|
| 2549 | โครงงานสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (IRPUS) | สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย |
| 2551 | อุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ |
| 2551 | ทุนโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา | สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา |

**ประวัติการทำงาน**

ธันวาคม 2554 - ปัจจุบัน: อาจารย์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

**การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน**

1. **Saimmai A**, Sobhon V, Maneerat S. 2011. Molasses a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. Applied Biochemistry and Biotechnology. 165(10): 315-335 (ISI impact factor 1.943).
2. **Saimmai A**, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. Annals of Microbiology. 62(1): 391-402 (ISI impact factor 1.549).

3. **Saimmai A**, Tani A, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant producing bacteria. Annals of Microbiology. 62(4): 1669-1679 (ISI impact factor 1.549).
4. **Saimmai A**, Kaewrueng J, Maneerat S. 2012. Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil contaminated soil. Annals of Microbiology. 62(4): 1757-1767 (ISI impact factor 1.549).
5. **Saimmai A**, Rukadee O, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Biosurfactants production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 grown on crude glycerol obtained from biodiesel production plant as a sole carbon source. Journal of Sciencetific and Industrial Research. 71(6): 396-406 (ISI impact factor 0.505).
6. **Saimmai A**, Rukadee O, Onlamool T, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of *Oleomonas sagaranensis* AT18. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 28(10): 2973-2986 (ISI impact factor 1.262).
7. **Saimmai A**, Rukadee O, Onlamool T, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Characterization and phylogenetic analysis of microbial surface active compounds-producing bacteria. Applied Biochemistry and Biotechnology. 168(5): 1003-1018 (ISI impact factor 1.893).
8. **Saimmai A**, Onlamool T, Sobhon V, Maneerat S. 2013. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Selenomonas ruminantium* CT2, isolated from mangrove sediment in south of Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29(1): 87-102 (ISI impact factor 1.262) (Corresponding author).
9. **Saimmai A**, Udomsilp S, Maneerat S. 2013. Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium of *Inquilinus limosus* KB3 grown on low-cost raw materials. Annals of Microbiology. 63(4): 1327-1339 (ISI impact factor 1.549). (Corresponding author).
10. Chooklin CC, Petmeaun S, Cheirsilp B, Maneerat S, **Saimmai A**. 2013. Utilization of palm oil mill effluent as a novel substrate for biosurfactant production by *Nevskia ramosa* NA3. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 35(2): 167-176 (SJR H-index 8) (Corresponding author).
11. Saisa-ard K, Maneerat S, **Saimmai A**. 2013. Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. Biotechnologia: Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology. 94(3): 275-284 (SJR H-index 4) (Corresponding author).
12. Noparat P, Maneerat S, **Saimmai A**. 2014. Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of

*Ochrobactrum anthropi* 2/3. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Mar. 30(3): 865-877 (ISI impact factor 1.262) (Corresponding author).

13. Chooklin CC, Petmeaun S, Maneerat S, **Saimmai A**. 2014. Isolation and characterization of a biosurfactant from *Deinococcus caeni* PO5 by using jackfruit seed powder as a substrate. Annals of Microbiology. Sep. 64(3): 1007-1020 (ISI impact factor 1.549) (Corresponding author).
14. Noparat P, Maneerat S, **Saimmai A**. 2014. Application of biosurfactant from *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 in the biodegradation of used lubricating oil. Applied Biochemistry and Biotechnology. Apr. 172(8): 3949-3963 (ISI impact factor 1.943) (Corresponding author).
15. Chooklin CC, Maneerat S, **Saimmai A**. 2014. Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant production by *Halobacteriaceae archaeon* AS65. Applied Biochemistry and Biotechnology. May. 173(2):624-645 (ISI impact factor 1.943). (Corresponding author).
16. Saisa-ard K, **Saimmai A**, Maneerat S. 2014. Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. Songklanakarin Journal of Science and Technology. Mar. - Apr. 36 (2): 163-175 (SJR H-index 8) (Corresponding author).
17. Chooklin CC, Petmeaun S, Maneerat S, **Saimmai A**. 2015. Diversity of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils in palm oil industry. Indian Journal of Biotechnology. Article in press (ISI impact factor 0.477) (Corresponding author).

# คำนำ

สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ยา เครื่องสำอาง และการควบคุมจุลินทรีย์ทางชีวภาพ (biocontrol) เพื่อทดแทนสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมีข้อดีกว่าสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี คือ ย่อยสลายได้ มีความเป็นพิษต่ำ และมีความคงตัวในสภาวะอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างและเกลือความเข้มข้นสูงๆ ได้ (Banat et al., 2000) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้หลากหลายชนิดและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันโดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องสารอาหารที่แตกต่างกันเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในกิจกรรมต่างๆ และใช้ผลิตสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตสารประกอบที่เซลล์ต้องการในการเจริญและสารที่จำเป็นอื่นๆ รวมทั้งสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและแร่ธาตุ นอกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วยังมีสภาวะอื่นๆ อีกที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศ เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถควบคุมสภาวะในการเลี้ยงได้ง่ายและสามารถใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูกหรือวัสดุเศษเหลือในการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้ ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพหรือให้สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีคุณสมบัติเฉพาะเป็นการเพิ่มมูลค่าของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ให้สูงขึ้นและลดต้นทุนในกระบวนการผลิต

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

**ชื่องานวิจัย** การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้
**ผู้วิจัย** ปวีณา ดิกิจ และ อทิพันธ์ เสียมไหม
**คณะ** วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
**ปี** 2557

**บทคัดย่อ**

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากตัวอย่างดินและน้ำที่มีน้ำมันปาล์มปนเปื้อนซึ่งเก็บจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์-ธานี สตูลและตรัง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร minimal salt agar ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 421 ไอโซเลท เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร minimal salt medium (MSM) ที่มีน้ำมันปาล์มหรือน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดกิจกรรมโดยวิธี emulsification activity สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้ 20 ไอโซเลท เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA พบว่าสามารถแบ่งเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เป็น 8 จีนัส ซึ่งประกอบด้วย *Serratia* (5 ไอโซเลท), *Acinetobacter* (4 ไอโซเลท), *Pseudomonas* (2 ไอโซเลท) และอย่างละ 1 ไอโซเลทในจีนัส *Comamonas, Corynebacterium* และ *Marinobacter* โดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มได้สูงที่สุดที่ร้อยละ 55 เมื่อใช้น้ำมันปาล์มร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจาก *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 คือ อาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน และ $NaNO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง เชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 มีค่ากิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มสูงที่สุดที่ร้อยละ 81 และ 60 สำหรับ emulsification activity (EA) และ emulsification index (EI) ตามลำดับ การสกัดสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 โดยใช้คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (2:1) ได้ผลผลิตสารสกัดหยาบของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ 1.85 กรัมต่อลิตร มีค่า EA และ EI ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรเท่ากับร้อยละ 81 และ 60 ตามลำดับ สารสกัดหยาบของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มได้ดีได้ในช่วงพีเอช 4-10, อุณหภูมิระหว่าง 25-121 องศาเซลเซียส, เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-9 โดยน้ำหนัก แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.06 โดยน้ำหนัก

**Research Title** Screening and optimization of cultural conditions for bioemulsifier production from isolated bacteria
**Researcher** Paweena Dikit and Atipan Saimmai
**Faculty** Science and Technology
**Year** 2557

## ABSTRACT

Bioemulsifier-producing bacteria were isolated from soil and water contaminated with palm oil from palm oil mill factories in southern part of Thailand (Krabi, Surat Thani, Satun and Trang province). They were grown in minimal salt agar using used palm oil as a sole carbon source. The 421 isolates obtained were screened for bioemulsifier production in a minimal salt medium (MSM) containing 1% (w/v) of glucose or palm oil as a sole carbon sources. By using emulsification activity test, the culture supernatants of 20 selected isolates showed bioemulsifier activity and these strains were identified by 16S rRNA gene sequence analysis. The production of bioemulsifier was obtained by strains representative of 8 different bacterial genera including 5 isolates in *Serratia,* 4 isolates in *Acinetobacter,* 2 isolates in *Pseudomonas* and 1 isolate of each genus from *Comamonas, Corynebacterium* and *Marinobacter*. Among of them *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 exhibited the highest emulsification activity of 55% using 1% (w/v) palm oil as a carbon source. The optimum condition for bioemulsifier production by *M. hydrocarbonoclasticus* ST1 was MSM containing 2.5% (w/v) molasses as carbon source, 0.3% (w/v) of sodium nitrate as nitrogen source, initial pH of 7.0 at room temperature (30±3°C) and shaking speed 150 rpm, respectively. It showed the maximum emulsifier activity with palm oil after 60 h of cultivation of 81 and 60% for emulsification activity (EA) and emulsification index ( EI), respectively. Crude bioemulsifier was recovered from the culture supernatant by chloroform:methanol (2:1) extraction with a yield of 1.85 g/l and had emulsifier activity at concentration of 1 g/l of 81 and 60% for EA and EI, respectively. The crude bioemulsifier was capable to emulsified palm oil in range of pH 4-10, temperature of 25-121°C and in the presence of sodium chloride up to 9% (w/v), magnesium chloride up to 0.1% (w/v) and calcium chloride up to 0.06% (w/v).

# กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาในปีงบประมาณ 2557 การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูง ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ วิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพรวมทั้ง ศึกษาคุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่เก็บเกี่ยวได้

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รศ.ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์ ที่ปรึกษาโครงงานที่ได้ให้วิชาการความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้ทำรายงานขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่คอยให้แนะนำ และให้กำลังใจในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

ปวีณา ดิกิจ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
กุมภาพันธ์ 2559

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

# สารบัญ


| | | หน้า |
|---|---|---|
| **คำนำ** | | ก |
| **บทคัดย่อภาษาไทย** | | ข |
| **บทคัดย่อภาษาอังกฤษ** | | ค |
| **กิตติกรรมประกาศ** | | ง |
| **สารบัญ** | | จ |
| **สารบัญตาราง** | | ฉ |
| **สารบัญภาพ** | | ช |
| **บทที่ 1** | **บทนำ** | |
| | ความสำคัญและที่มาของปัญหา | 1 |
| | วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย | 2 |
| | ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| | ขอบเขตโครงการวิจัย | 2 |
| | นิยามศัพท์เฉพาะ | 2 |
| **บทที่ 2** | **เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | |
| | สารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ | 3 |
| | การจัดกลุ่มสารลดแรงตึงผิวจากจุลินทรีย์ | 3 |
| | ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ | 7 |
| | การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ | 11 |
| **บทที่ 3** | **วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง** | 13 |
| | วัสดุและอุปกรณ์ | 13 |
| | วิธีการวิเคราะห์ | 14 |
| | วิธีการทดลอง | |
| **บทที่ 4** | **ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง** | |
| | การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ | 18 |
| | การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ | 21 |
| | การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 | 25 |
| | การศึกษาวิธีการสกัดสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 | 32 |
| | คุณสมบัติของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่สกัดได้ | 33 |
| **บทที่ 5** | **บทสรุปและข้อเสนอแนะ** | |
| | บทสรุปและข้อเสนอแนะ | 38 |
| | เอกสารอ้างอิง | 39 |
| | ภาคผนวก | 45 |
| | ประวัติผู้วิจัย | 47 |
| | ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ | 53 |

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ชนิดและเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ | 6 |
| 2 | แหล่งที่มา แหล่งคาร์บอน ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียและความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์ม | 20 |
| 3 | แสดงการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) ของแบคทีเรียที่ผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพซึ่งแยกได้และสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูลใน GenBank | 22 |
| 4 | ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงบนอาหาร MSM เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที | 26 |
| 5 | ผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงในอาหาร MSM เป็น 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องอัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที | 27 |
| 6 | ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องอัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที | 28 |
| 7 | ผลความเข้มข้นของ $NaNO_3$ ต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องอัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที | 29 |
| 8 | ผลของอัตราการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง | 30 |
| 9 | ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพโดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 หลังจากเลี้ยงอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งคาร์บอน ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องอัตราการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที | 31 |
| 10 | เปรียบเทียบวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST | 33 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ลักษณะโครงสร้างของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ | 3 |
| 2 | โครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มต่างๆ | 5 |
| 3 | ผลการตรวจหากิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มของสารละลายส่วนใสจากเชื้อแบคทีเรียหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง | 19 |
| 4 | กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มของสารละลายส่วนใสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ Different lowercase letters at top of bars indicate significant differences ($p<0.05$) | 21 |
| 5 | แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์และเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank โดยการใช้โปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูลของ NCBI | 23 |
| 6 | การเจริญเติบโต การผลิต และกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้กากน้ำตาลร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และมี $NaNO_3$ ร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักเป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที | 32 |
| 7 | ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 | 31 |
| 8 | ผลของระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 | 34 |
| 9 | ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 | 35 |
| 10 | ผลของเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 | 36 |
| 11 | ผลของเกลือแมกนีเซียมโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 | 37 |