

การประยุกต์ใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ  
จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว  
Application of Banana Peel as a Carbon Source for Biosurfactant Production  
from Bacteria Isolated from Used Lubricating Oil Contaminated Soil

อทิพันธ์ เสียมไหม<sup>1,2</sup> ฌานิกา แซ่แง ชุกลิน<sup>3</sup>

ปวีณา ดิกิจ<sup>4</sup> และ นฤมล มีบุญ<sup>5\*</sup>

Atipan Saimmai<sup>1,2</sup> Chanika Saenge Chooklin<sup>3</sup>

Paweena Dikit<sup>4</sup> and Naruemon Meeboon<sup>5\*</sup>

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากอู่ซ่อมรถบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต จังหวัดภูเก็ต โดยใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน บนอาหารแข็ง Minimal Salt Medium (MSM) ซึ่งสามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 7 ไอโซเลต จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 159 ไอโซเลต โดยพิจารณาจากกิจกรรม drop collapsing test และกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน (emulsification activity) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต ให้ค่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูง แต่ไม่มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์ม ผลการย้อมแกรมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 180 ให้ค่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดเท่ากับ 8.50 มิลลิเมตร และเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 180 ในอาหาร MSM โดยใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้เปลือกกล้วยความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 180 ให้ค่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงที่สุดเท่ากับ 8.00 มิลลิเมตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

**คำสำคัญ:** สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เปลือกกล้วย น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว แบคทีเรีย

<sup>1</sup> คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต อ. เมือง จ. ภูเก็ต 830001

<sup>2</sup> ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาลอเนกามัน มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต อ. เมือง จ. ภูเก็ต 830002

<sup>3</sup> คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อ. สิงกา จ.สงขลา 92150

<sup>4</sup> คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อ.เมือง จ.สงขลา 90000

<sup>5</sup> คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช อ. เมือง จ. นครศรีธรรมราช 802805

\* Corresponding author e-mail: nam\_monna@hotmail.com

## Abstract

The aim of this research was to screen an effective biosurfactant - producing bacteria isolated from used lubricating oil contaminated soil collected from garage area in Phuket Rajabhat University by using banana peel as a carbon source on Minimal Salt Medium (MSM). Seven bacterial isolates were selected from 159 isolates by using drop collapsing test and emulsification activity. All seven isolates had high activity by drop collapsing test, but they do not exhibit emulsification activity with palm oil. Gram - staining and cell morphology study revealed that all seven isolates were Gram - positive and rods shape. Bacterial isolate 180 showed the highest biosurfactant activity by drop collapsing test (8.50 mm). The optimized conditions for biosurfactant production of bacterial isolate 180 was performed in MSM supplemented with banana peel as a carbon source. The optimized condition was obtained when supplemented with 1% banana peel as a carbon source and 0.1% yeast extract as a nitrogen source incubated at 200 rpm at room temperature ( $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ ). It exhibited the highest biosurfactant activity up to 8.00 mm after 12 hours of incubation.

**Keywords:** Biosurfactant, Banana peel, Used lubricating oil, Bacteria

## บทนำ

สารลดแรงตึงผิว คือสารประกอบที่มีคุณสมบัติทำให้แรงตึงผิวของของเหลวลดลงโดยลดแรงเกาะระหว่างกันของสสารนั้นๆ สารลดแรงตึงผิวมี 2 ชนิด ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthetic surfactant) และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ปัจจุบันนักวิจัยสนใจศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีความเป็นพิษน้อย ย่อยสลายง่าย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Ehrhardt *et al.*, 2015) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้แก่ ใช้ในการลดปริมาณสารพิษที่ตกค้างในธรรมชาติ ใช้ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเกษตร และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี (Santos *et al.*, 2016) ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ นั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นๆ

การแยกและการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตและการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้ประโยชน์ ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจำเป็นต้องใช้แหล่งอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แหล่งอาหารที่สำคัญ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Joshi and Shekhawat, 2014) แต่เนื่องจาก

ปัจจุบันแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีราคาแพงจึงมีการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติมาทดแทนแหล่งคาร์บอนที่ใช้อยู่เดิม มีรายงานการใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสูงเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น กากน้ำตาล รำข้าว ฟางข้าว หางนม กากชานอ้อย เปลือกมะนาว เปลือกส้ม เปลือกกล้วย และเปลือกมันฝรั่ง เป็นต้น ซึ่งค่าการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้กากน้ำตาล เปลือกส้ม เปลือกมันฝรั่ง และเปลือกกล้วย เป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าใกล้เคียงกัน (Kumar *et al.*, 2016; Mabrouk *et al.*, 2014) การวิจัยในครั้งนี้ออกเปลือกกล้วยมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากกล้วยเป็นพืชท้องถิ่นสามารถหาได้ง่ายและราคาถูก นอกจากจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตแล้ว ยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกด้วย เปลือกกล้วยมีองค์ประกอบหลักเป็นแป้ง (ร้อยละ 3) โปรตีน (ร้อยละ 6 - 9) ไขมัน (ร้อยละ 3.8 - 11) ปริมาณใยอาหาร (ร้อยละ 43.2 - 49.7) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะกรดไลโนเลอิก กรดอะมิโน เช่น ลิวซีน (leucine) วาลีน (valine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และทรีโอนีน (threonine) เป็นต้น และยังมีธาตุอาหารรอง เช่น เหล็ก แคลเซียม และแมกนีเซียม นอกจากนี้เปลือกกล้วยยังมีลิกนิน (ร้อยละ 6 - 12) เพคติน (ร้อยละ 10 - 21) เซลลูโลส (ร้อยละ 7.6 - 9.6) เฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ 6.4 - 9.4) และกรดกาแลกทูโรนิก โดยเพคตินที่สกัดได้จากเปลือกกล้วยยังมีน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส อะราบิโนส แรมโนส และไซโลส (Emaga *et al.*, 2008) วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วบริเวณอู่ซ่อมรถ โดยใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาผลของความเข้มข้นของเปลือกกล้วย ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พร้อมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วจากอู่ซ่อมรถบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต จังหวัดภูเก็ต ได้แก่ ตัวอย่างดินจากอู่ซ่อมรถสามกอง อู่ซ่อมรถสะพาน และอู่ซ่อมรถเกาะแก้ว นำดินบรรจุในถุงพลาสติกหรือภาชนะที่เตรียมไว้ เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างดินมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวในห้องปฏิบัติการ

### 2. การเตรียมตัวอย่างเปลือกกล้วย

กล้วยน้ำว้า (*Musa Cavendish*) ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้จากร้านขายกล้วยทอดในอำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต โดยนำมาล้างทำความสะอาดแล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 24 เมช องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกกล้วยน้ำว้าแห้งประกอบด้วยไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกร้อยละ 40.18 โปรตีนร้อยละ 8.80 ใยร้อยละ 35.25 ไขมันร้อยละ 14.56 และไขมันร้อยละ 1.21

### 3. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

คัดแยกเชื้อโดยการเจือจางดินในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้ว spread plate บนอาหาร Mineral Salt Medium agar (MSM) (Yin *et al.*, 2005) ที่มีเปลือกกล้วยแห้งบดละเอียดขนาด 0.42 มิลลิเมตรปริมาณร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนีมา streak บนอาหาร MSM agar ที่มีเปลือกกล้วยร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อบริสุทธิ์ เชื้อโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูบ ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีเปลือกกล้วย ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ในหลอดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สังเกตการเจริญของเชื้อ) นำเชื้อที่คัดแยกได้ไปเก็บรักษาในอาหาร MSM ที่มีผสมกลีเซอรอล ร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 4. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมนลงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปรับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย ให้มีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น แล้ว ถ่ายเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบค่าพีเอช (พีเอชมิเตอร์ F21 Horiba) และการเจริญของแบคทีเรีย (Dry Cells Weight, DCW) ส่วนสารละลายส่วนใสที่ได้นำมาทดสอบกิจกรรมด้วยวิธี drop collapsing test (Bodour and Maier, 1998) โดยหยดน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 2 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ 96 - microwell plate วางพักไว้นาน 24 ชั่วโมง แล้วเติมตัวอย่างสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 5 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มนาน 1 นาที สังเกตลักษณะของหยดสารละลายส่วนใส การแผ่ออกของสารละลายแสดงถึงการมีสารลดแรงตึงผิวในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางการแผ่ออกของสารละลายของชุดควบคุมกับตัวอย่างที่ใช้ โดยใช้ น้ำกลั่นหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบเป็นชุดควบคุม และตรวจสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าร้อยละกิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (Emulsification activity, %EA) (Cooper and Goldenberg, 1987) โดยนำสารละลายส่วนใสที่ได้มาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำมันปาล์มปริมาณ 2 มิลลิลิตรใสในหลอดทดลอง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที คำนวณค่า %EA (สมการที่ 1) โดยสังเกตจากความสูงของชั้นอิมัลชันต่อความสูงทั้งหมดของสารละลาย

$$EA (\%) = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชันที่เกิดขึ้น}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}} \times 100$$

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดย streak บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บันทึกลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปร่างเซลล์ การเรียงตัว และการติดสีแกรม (gram staining) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## 5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

### 5.1 ความเข้มข้นของเปลือกกล้วยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมจากการทดสอบ Drop collapsing test และ % EA สูงที่สุดที่คัดเลือกได้ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 0.3 0.5 0.7 1 3 5 และ 7 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 5$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหมუნเหียงเซลล์ที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เลือกความเข้มข้นของเปลือกกล้วยที่ให้ค่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 5.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตเน ยีสต์สกัด และผงชูรส ที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก และเปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนให้มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.01 0.05 0.1 0.3 และ 0.5 โดยน้ำหนัก เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 5$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหมუნเหียงเซลล์ที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

## 6. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 5$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Chooklin *et al.*, 2014) จากนั้นหมუნเหียงเซลล์ที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามรายละเอียดข้างต้น

## 7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป R (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>) SPSS version 3.5.0 (Venables *et al.*, 2009) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) พร้อมทั้งคำนวณหาค่าความถี่ ร้อยละ และค่าเฉลี่ย โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

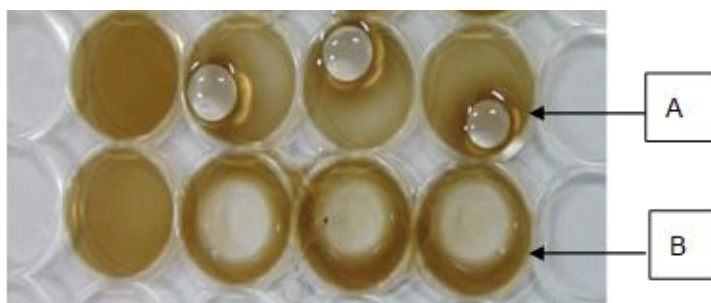
## ผลการวิจัย

### 1. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 159 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 159 ไอโซเลต มาวัดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยมาเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร MSM ที่มีเปลือกกล้วยที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวโดยวิธี drop collapsing test จากการทดลอง พบว่าแบคทีเรีย 7 ไอโซเลต มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิว (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1) ซึ่งไอโซเลต 182 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.89 กรัมต่อลิตร ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลตอื่นๆ มีน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในช่วง 0.81 1.57 กรัมต่อลิตร การเจริญของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต มีค่าพีเอชโดยรวมอยู่ในช่วง 6.42 7.02 และมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยรวมอยู่ในช่วง 5.50 8.50 มิลลิเมตร โดยไอโซเลต 180 มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวมากที่สุด เท่ากับ 8.50 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต 181 โดยแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตมีค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวแตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเนื่องจากแบคทีเรียไอโซเลต 180 มีค่ากิจกรรมสูงสุดจึงเลือกใช้สำหรับการทดลองต่อไป

**ตารางที่ 1** จำนวนไอโซเลต และการเกิดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยวิธี drop collapsing test ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจากข้อมูลบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต หลังจากเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน

| Sources | Samples | Isolates | Active isolates | Active isolates (%) |
|---------|---------|----------|-----------------|---------------------|
| Samkong | 1       | 39       | 1               | 2.56                |
| Sapam   | 1       | 57       | 2               | 3.51                |
| KohKaew | 3       | 63       | 4               | 6.35                |
| Total   | 5       | 159      | 7               | 4.40                |



**ภาพที่ 1** การตรวจหากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี drop collapsing test (A: ตัวควบคุม, B: ตัวอย่างที่มีกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ)

**ตารางที่ 2** การคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวในอาหาร MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

| Isolate | Dry cell weight (g/l)  | pH                      | Drop collapsing test (mm.) | Emulsification activity (%) |
|---------|------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 179     | 1.57±0.88 <sup>b</sup> | 6.42±0.28 <sup>d</sup>  | 5.50±0.00 <sup>c</sup>     | nd                          |
| 180     | 0.81±0.36 <sup>d</sup> | 6.86±0.04 <sup>bc</sup> | 8.50±0.50 <sup>a</sup>     | nd                          |
| 181     | 1.48±0.69 <sup>b</sup> | 6.93±0.08 <sup>ab</sup> | 8.17±0.29 <sup>a</sup>     | nd                          |
| 182     | 2.89±0.15 <sup>a</sup> | 6.87±0.05 <sup>bc</sup> | 6.33±0.29 <sup>b</sup>     | nd                          |
| 183     | 1.55±0.67 <sup>b</sup> | 6.71±0.16 <sup>c</sup>  | 6.17±0.29 <sup>bc</sup>    | nd                          |
| 184     | 1.12±0.93 <sup>c</sup> | 6.99±0.12 <sup>ab</sup> | 5.83±0.29 <sup>c</sup>     | nd                          |
| 185     | 1.45±0.06 <sup>b</sup> | 7.02±0.03 <sup>a</sup>  | 6.00±0.00 <sup>b</sup>     | nd                          |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95  
nd, not detected

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีโคโลนีขนาดเล็กไปจนถึงขนาดกลาง โคโลนีเป็นสีขาว ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะเรียบ ด้านและเป็นมันวาว ขอบของโคโลนีมีลักษณะเรียบและหยัก โคโลนีมีลักษณะนูนและแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง (rod) เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต ไม่มีความสามารถในการเกิดกิจกรรม อาจเนื่องมาจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้อยหรือสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดไม่มีความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Haba *et al.*, 2000) จากงานวิจัยของ Batista *et al.* (2006) พบว่าแบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวเพียงอย่างเดียวแต่ไม่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวและโพลีเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะสามารถจับกับพื้นผิวได้ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมักจะเป็นพวกไกลโคลิปิด (glycolipids) หรือลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) ไกลโคลิปิดที่เป็นสารก่ออิมัลชันทางชีวภาพ เช่น แรมโนลิปิด (rhamnolipid) ทรีฮาโลลิปิด (trehaloselipid) ซีโฟโรไลปิด (sophorolipid) ส่วนสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้น้อยแต่สามารถเคลือบโมเลกุลของหยดน้ำมันและป้องกันการเชื่อมต่อน้ำมันได้ดี เช่น alasan และ emulsan เป็นต้น (Ron and Rosenberg, 2002)

## 2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียไอโซเลต 180

### 2.1 ผลของปริมาณเปลือกกล้วย

ความเข้มข้นของเปลือกกล้วยมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อเพิ่มปริมาณของเปลือกกล้วยทำให้การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งสามารถสังเกตได้จากน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยการใช้ความเข้มข้นของเปลือกกล้วยจากร้อยละ 0.3 เป็น 7 โดยน้ำหนัก ทำให้การเจริญเพิ่มขึ้น 18 เท่า โดยเพิ่มจาก 1.07 กรัมต่อลิตร เป็น 43.60 กรัมต่อลิตร มีค่าพีเอชโดยรวมอยู่ระหว่าง 6.46 - 6.97 และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก มีกิจกรรมในการลดแรงตึงผิวมากที่สุดเท่ากับ 8.33 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3) ซึ่งแตกต่างจากระดับความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีรายงานการใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ในอาหาร MSM โดยใช้เปลือกกล้วยร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เชื้อ *B. licheniformis* ร้อยละ 2 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* มีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันสูงถึงร้อยละ 66.49 และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 1.12 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Kumar *et al.*, 2016) และมีรายงานการใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Halobacteriaceae archaeon* AS65 ในอาหาร MSM โดยใช้เปลือกกล้วยร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน และ ผงซุส 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ AS65 สามารถลดแรงตึงผิวได้สูงถึง 25.5 มิลลินิวตันต่อเมตร และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุด 5.30 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 54 ชั่วโมง (Chooklin *et al.*, 2014)

นอกจากนี้ มีรายงานการใช้เปลือกกล้วยเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกลูตาไรโอนจากเชื้อ *Candida utilis* SZU 07 - 01 พบว่าเมื่อใช้เปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก จะมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตกลูตาไรโอนมากที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด และกลูตาไรโอนที่ดีที่สุดคือ 7.36 กรัมต่อลิตรและ 154.32 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Chen *et al.*, 2011) และยังมีรายงานการผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกกล้วยและกลีเซอรอลโดยใช้กระบวนการหมักร่วม (fermentation) พบว่าการหมักเปลือกกล้วยที่ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนัก เกิดปริมาณก๊าซมีเทนและผลผลิตก๊าซมีเทนสูงสุด 181 และ 188 มิลลิลิตรต่อกรัม ตามลำดับ และการหมักเปลือกกล้วยที่ความเข้มข้น 7.5 โดยน้ำหนัก ผสมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ 7.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณก๊าซมีเทนและผลผลิตก๊าซมีเทนสูงสุด 467 และ 151 มิลลิลิตรต่อกรัม ตามลำดับ (เสาวลักษณ์, 2555)



ตารางที่ 3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเปลือกกล้วยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อไอโซเลต 180 ในอาหาร MSM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

| Banana peel concentration (% w/v) | Dry cell weight (g/l)   | pH                      | Drop collapsing test (mm.) |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 0.3                               | 1.07±0.89 <sup>e</sup>  | 6.97±0.02 <sup>a</sup>  | 6.50±0.71 <sup>c</sup>     |
| 0.5                               | 4.80±1.44 <sup>d</sup>  | 6.84±0.02 <sup>ab</sup> | 6.75±0.35 <sup>c</sup>     |
| 0.7                               | 8.93±0.31 <sup>c</sup>  | 6.93±0.01 <sup>a</sup>  | 7.00±0.00 <sup>b</sup>     |
| 1                                 | 12.32±2.57 <sup>b</sup> | 6.87±0.04 <sup>ab</sup> | 8.33±0.58 <sup>a</sup>     |
| 3                                 | 17.30±0.51 <sup>a</sup> | 6.78±0.07 <sup>b</sup>  | 7.00±0.00 <sup>b</sup>     |
| 5                                 | 19.49±4.49 <sup>a</sup> | 6.74±0.04 <sup>b</sup>  | 7.00±0.00 <sup>b</sup>     |
| 7                                 | 19.60±3.15 <sup>a</sup> | 6.46±0.21 <sup>c</sup>  | 7.00±0.00 <sup>b</sup>     |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

## 2.2 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อศึกษาผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว พบว่าแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิว 6.67 มิลลิเมตร มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.63 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) ในขณะที่แหล่งอินทรีย์ในโตรเจน ได้แก่ เปปโตโน โมโนโซเดียมกลูตาเมตและยีสต์สกัด พบว่ายีสต์สกัดให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวดีที่สุด คือ 7.67 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.01 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและยีสต์สกัด พบว่ายีสต์สกัดให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวมากที่สุด อาจเนื่องมาจากยีสต์สกัดจะไปเพิ่มการเจริญของเซลล์ เพราะมีวิตามินบีมีความจำเป็นในการสร้างเอนไซม์และโคเอนไซม์ และยังมีสารประกอบอื่นๆ ที่ช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Rocha *et al.*, 2009) ดังนั้นจากการทดลองจึงเลือกใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการทดลองขั้นต่อไป มีรายงานการส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด rhamnolipid ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด ในอาหาร MSM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่ายีสต์สกัดส่งเสริมให้เชื้อ *P. aeruginosa* ผลิตสาร rhamnolipid ได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถผลิตได้ 1.9 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงที่สุดเช่นกันเท่ากับ 2.87 กรัมต่อลิตร (Cherif *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลและดินตะกอนป่าชายเลนในอาหาร mineral medium ที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งไอโซเลต ESW

Na12s สามารถลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดโดยสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 25 มิลลินิวตันต่อเมตร (Gnanamani *et al.*, 2010) และมีรายงานการใช้ยีสต์สกัดส่งผลให้เชื้อ *Bacillus subtilis* LAMI008 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดโดยสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหลือ 50.30 - 39.55 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Rocha *et al.*, 2009)

**ตารางที่ 4** ผลของแหล่งไนโตรเจน ต่อการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อไอโซเลต 180 ในอาหาร MSM ที่มีเปลือกกล้วยความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

| Nitrogen source<br>(0.1%,w/v) | Dry cell weight<br>(g/L) | pH                     | Drop collapsing test<br>(mm.) |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Ammonium sulfate              | 0.63±0.43 <sup>b</sup>   | 6.71±0.10 <sup>c</sup> | 6.00±0.00 <sup>b</sup>        |
| Monosodium<br>glutamate       | 1.06±0.56 <sup>a</sup>   | 7.82±0.06 <sup>b</sup> | 5.67±0.58 <sup>b</sup>        |
| Peptone                       | 0.34±0.16 <sup>c</sup>   | 8.14±0.05 <sup>a</sup> | 6.00±0.00 <sup>b</sup>        |
| Yeast extract                 | 1.01±0.27 <sup>a</sup>   | 7.60±0.06 <sup>b</sup> | 7.67±0.58 <sup>a</sup>        |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

### 2.3 ผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัด

การใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียไอโซเลต 180 โดยการใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก สามารถให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวมากที่สุดเท่ากับ 8.00 มิลลิเมตร (ตารางที่ 5) ซึ่งแตกต่างจากระดับความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 และเมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดเพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก กิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะลดลงโดยความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 0.5 โดยน้ำหนัก ให้กิจกรรมการลดแรงตึงผิวเท่ากับ 7.33 มิลลิเมตร ซึ่งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของแหล่งไนโตรเจนลดลงหรือหมดไป (depletion) (Benincasa *et al.*, 2002) มีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Pseudomonas putida* SOL - 10 ในอาหาร MSM ที่เติมยีสต์สกัดที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0 0.1 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 และ 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 - 2.5 เชื้อ *P. putida* SOL - 10 สามารถเกิดค่ากิจกรรมการเกิดอิมัลชันได้ประมาณร้อยละ 72 และสามารถลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 29.9 มิลลินิวตันต่อเมตร ในวันที่ 5 ของการทดลอง (Qazi *et al.*, 2013) และยังมีรายงานการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Nocardioopsis* sp. MSA13A ได้สูงที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่ง

ไนโตรเจน โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันมากกว่าร้อยละ 50 ในทุกชุดการทดลอง (Kiran *et al.*, 2014)

**ตารางที่ 5** ผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจากเชื้อไอโซเลต 180 ในอาหาร MSM ที่มีเปลือกกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

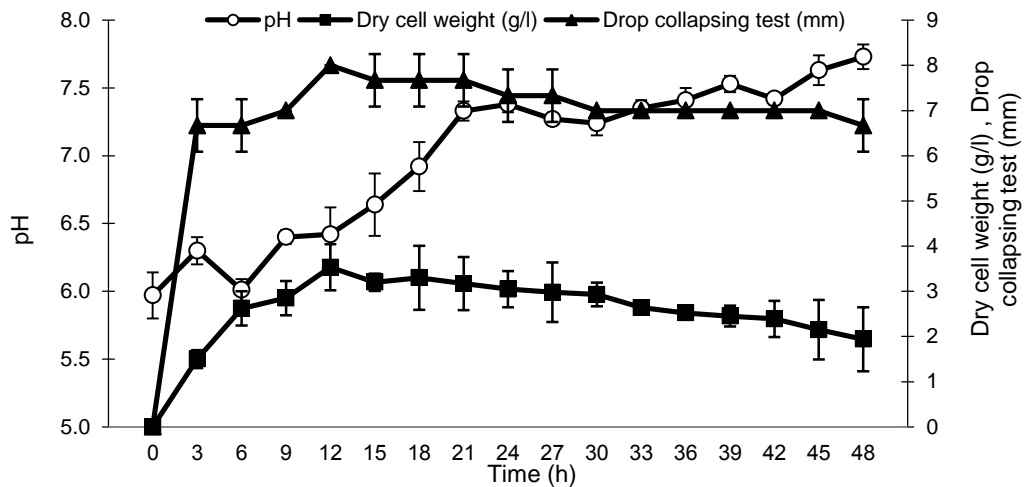
| Yeast extract concentration (% w/v) | Dry cells weight (g/l) | pH                     | Drop collapsing test (mm.) |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| 0.01                                | 1.55±0.74 <sup>c</sup> | 7.39±0.08 <sup>b</sup> | 6.00±0.00 <sup>b</sup>     |
| 0.05                                | 2.83±2.29 <sup>b</sup> | 7.33±0.21 <sup>b</sup> | 6.33±0.58 <sup>b</sup>     |
| 0.1                                 | 1.03±1.01 <sup>c</sup> | 7.49±0.06 <sup>b</sup> | 8.00±0.00 <sup>a</sup>     |
| 0.3                                 | 4.57±6.13 <sup>a</sup> | 7.37±0.86 <sup>b</sup> | 7.33±0.58 <sup>b</sup>     |
| 0.5                                 | 1.03±0.49 <sup>c</sup> | 7.93±0.01 <sup>a</sup> | 7.33±0.58 <sup>b</sup>     |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

### 3. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียไอโซเลต 180 พบว่าสามารถเจริญได้และมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวได้ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง โดยที่ 12 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุดเท่ากับ 8.00 มิลลิเมตร สอดคล้องกับการเจริญที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาดังกล่าว ในส่วนของค่าพีเอช พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นจาก 5.97 เป็น 7.73 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 2) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 180 มีความสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อแสดงให้เห็นว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 180 เป็นแบบที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ (Growth associated production) (Ismail *et al.*, 2015) ซึ่งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะค่อยๆ ลดลงในช่วงสุดท้ายของ stationary phase และ death phase (Qazi *et al.*, 2013) ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cherif *et al.* (2015) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิด rhamnolipid ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อมีการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ในระดับปกติในระยะ exponential phase เป็นเวลา 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงในช่วง stationary phase และสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุด 1.9 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 40 ของการทดลอง และยังคงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saimmai *et al.* (2012) ที่ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Leucobacter komagatae* 183 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลทรายความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอนและผงชูรสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่

อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 5$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *L. komagatae* 183 มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นแบบที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ โดยเชื้อสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้หลังจากชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และเริ่มเข้าสู่ระยะ log phase ระหว่างชั่วโมงที่ 24 - 48 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 54 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้เท่ากับ 4.52 กรัมต่อลิตร ลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 27.0 มิลลินิวตันต่อเมตร จุดวิกฤติของความเข้มข้นของไมเซลล์เท่ากับ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร



**ภาพที่ 2** ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิว และค่าพีเอชของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 180 ในอาหารที่มีเปลือกกล้วยความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 5$  องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

### สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจากอู่ซ่อมรถบริเวณใกล้มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต โดยนำมาเลี้ยงใน MSM ที่มีเปลือกกล้วยแหล่งคาร์บอน สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 159 ไอโซเลต เมื่อวัดกิจกรรมการลดแรงตึงผิวโดยวิธี drop collapsing test พบว่าแบคทีเรีย 7 ไอโซเลต มีกิจกรรมการลดแรงตึงผิว ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต มีลักษณะเป็นโคโลนีสีขาวขุ่น นูน รูปร่างกลม เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง และไม่สามารถในการเกิดอิมัลชัน โดยไอโซเลต 180 ให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวสูงที่สุด จากการศึกษาผลของเปลือกกล้วยและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าไอโซเลต 180 สามารถเจริญเติบโตและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุดเมื่อใช้อาหาร MSM ที่มีเปลือกกล้วยความเข้มข้น ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวเท่ากับ 8.00 มิลลิเมตร เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพของไอโซเลต 180 ในอาหารที่เหมาะสม พบว่าสามารถเจริญเติบโตและให้ค่ากิจกรรมการลดแรงตึงผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงสุดเท่ากับ 8.00 มิลลิเมตร ในช่วงเวลาที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ผลจากงานวิจัยแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลดลงส่งผลให้เกิดการผลิตและประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียไอโซเลต 180 ในด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลขั้นต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และมหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

### เอกสารอ้างอิง

- เสาวลักษณ์ เ้าสกุล. (2555). *การผลิตก๊าซชีวภาพจากเปลือกกล้วยและกลีเซอรอลโดยใช้กระบวนการหมักร่วม*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพมหานคร.
- Batista, S.B., Munteer, A.H., Amorim, F.R. and Totola, M.R. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, 97(6), 868-875.
- Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M.A. and Moraes, I.O. (2002). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *Food Engineering*, 54, 283-288.
- Bodour, A. and Maier, M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Microbiological Methods*, 32(3), 273-280.
- Chen, X.D., Wei, G.Y., Zhang, J.L. and Dong, Y.Y. (2011). Efficient production of glutathione using hydrolyzate of banana peel as novel substrate. *Chemical Engineering*, 28(7), 1566-1572.
- Cherif, N., Tifrit, A., Daouadji, K.L., Mezouari, S., Chama, Z. and Abbouni, B. (2015). Effect of carbon and nitrogen source on the microbial production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *Der Pharmacia Lettre*, 7 (8), 42-48.
- Chooklin, C.S., Maneerat, S. and Saimmai, A. (2014). Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant production by *Halobacteriaceae archaeon* AS65. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(2), 624-645.
- Cooper, D.G. and Goldenberg, B.G. (1987). Surface active agent from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224-229.

- Ehrhardt, D.D., Secato, J.F.F. and Tambourgi, E.B. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using the residue from processing of pineapple, enriched with glycerol, as substrate. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 277-282.
- Emaga, T.H., Robert, C., Ronkart, S.N., Wathelet, B. and Paquot, M. (2008). Dietary fiber components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. *Bioresource Technology*, 99(10), 4346-4354.
- 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. *Bioremediation and Biodegradation*, 1(2), 107-115.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. and Manrera, A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Applied Microbiology*, 88(3), 379-387.
- Ismail, W., Shammery, S.A.L., El-Sayed, W.S., Obuekwe, C., El Nayal, A.M., Raheem, A.S.A. and Al-Humam, A. (2015). Stimulation of rhamnolipid biosurfactants production in *Pseudomonas aeruginosa* AK6U by organosulfur compounds provided as sulfur sources. *Biotechnology Reports*, 7, 55-63.
- Joshi, P.A. and Shekhawat, D.B. (2014). Effect of carbon and nitrogen source on biosurfactant production by biosurfactant producing bacteria isolated from petroleum contaminated site. *Advances in Applied Science Research*, 5(6), 159-164.
- Kiran, G.S., Nishanth, L.A., Priyadharshini, S., Anitha, K. and Selvin, J. (2014). Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardiopsis* sp. MSA13A. *BMC Biotechnology*, 14(48), 1-10.
- Kumar, A.P., Janardhan, A., Viswanath, B., Monika, K., Jung, J-Y. and Narasimha, G. (2016). Evaluation of orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. *3 Biotech*, 6(43), 1-10.
- Mabrouk, M.E.M., Youssif, E.M. and Sabry, S.A. (2014). Biosurfactant production by a newly isolated soft coral-associated marine *Bacillus* sp. E34: Statistical optimization and characterization. *Life Science Journal*, 11(10), 756-768.
- Qazi, M.A., Malik, Z.A., Qureshi, G.D., Hameed, A. and Ahmed, S. (2013). Yeast extract as the most preferable substrate for optimized biosurfactant production by *rhlB* gene positive *Pseudomonas putida* SOL-10 isolate. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 4(7), 1-10.

- Rocha, M.V.P., Barreto, R.V.G., Melo, V.M. and Goncalves, L.R.B. (2009). Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 155(1), 366-378.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 249-252.
- Saimmai, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. (2012). Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. *Annals of Microbiology*, 62, 391-402.
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A. and Sarubbo, L.A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21<sup>st</sup> century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-31.
- Venables, W.N., Smith, D.M. and The R Development Core Team. (2009). *An Introduction to R, Notes on R: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics Version 3.5.0*. Retrieved 23 April-2018, from: <http://cran.r-project.org>.
- Yin, B., Gua, J.D. and Wana, N. (2005). Degradation of indole by enrichment culture and *Pseudomonas aeruginosa* Gs isolated from mangrove sediment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56(4), 243-248.