บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

Bacillus licheniformis สายพันธุ์ F2.2 ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักดอง โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งแอลบี ที่มีน้ำมันดิบราดทับปกคลุมผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสม่ำเสมอ เพื่อทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า *Bacillus licheniformis* F2.2 จะปล่อยสารที่สามารถกระจายน้ำมันดิบบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ นอกจากนั้นเชื้อดังกล่าวยังมีความสามารถในการฆ่าจุลินทรีย์ กลุ่มอื่น ๆ ได้อย่างกว้างขวาง ทั้ง แบคทีเรีย รา และยีสต์

จากการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 ในอาหารเหลวที่กำหนดสูตรในขวดเขย่า แล้ววัดประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยดูจากความสามารถในการลดแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองขั้นต้นได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ ระหว่าง การเจริญของจุลินทรีย์ กับ การสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของเชื้อ พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเริ่มถูกสร้างขึ้น และ ปลดปล่อยออกสู่น้ำเลี้ยงเชื้อในช่วงแรกของการเจริญแบบลอการิธึม โดยค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ จะเริ่มมีค่าลดต่ำลง และ เมื่อจุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ระยะหลังของการเจริญแบบลอการิธึม (late logarithmic phase) ก็จะมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกมามากขึ้น ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Yakimov และคณะ (1995) ที่รายงานถึง ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ กับ ความสามารถในการลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ และเมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า หลังจากชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างจะเริ่มมีค่าสูงขึ้น และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 ในขณะเดียวกันค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจะเริ่มมีค่าลดลง และต่ำสุด ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง จึงคาดว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ น่าจะมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงได้ทำการแปรผัน ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เริ่มต้น ตั้งแต่ 4.0-9.0 ด้วยการเติมกรด หรือ ด่าง (1.0 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1.0 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์) พบว่า ระดับความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการลดค่าแรงตึงผิว ของส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 จะอยู่ในช่วง 7.0-9.0 โดยค่าความเป็นกรด-ด่าง

ที่ 8.0 ให้การผลิตดีที่สุด เนื่องจากส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจืองจาง 100 เท่า ลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุด ความสามารถในการลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างมาก เมื่อ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลดจาก 7.0 เป็น 6.0 เชื้อจะไม่สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อได้ เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4 และ 4.5 ดังแสดงในรูปที่ 25 ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Santos และคณะ (1986) ที่รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อ การผลิตแรมโนลิปิด โดย *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 จะมีค่าอยู่ในช่วง 6.2-6.4 หากค่าความเป็นกรด-ด่าง สูงหรือต่ำกว่านี้ จะมีผลให้เชื้อหยุดการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ธนขวัญ (2539) พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งในการลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *Bacillus subtilis* 3/38

จากการทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เริ่มต้น ที่ 7.0 ด้วย กรด หรือด่าง ดังกล่าว เทียบกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 พบว่า วิธีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยบัฟเฟอร์สามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้ดีกว่า ทำให้ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าคงที่มากกว่า และเมื่อทำการหาค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ พบว่า ที่ความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น 8.0 โดยการใช้ 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวทำละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะให้ผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวดีที่สุด ซึ่งจากการทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่างทั้งวิธีการใช้กรด-ด่าง และการควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ พบว่า สามารถเลือกใช้งานได้ทั้ง 2 วิธี สำหรับในงานวิจัยนี้ได้เลือกการใช้วิธีการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นที่ 8.0 ด้วยบัฟเฟอร์ ในการทำการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้ดี และทำให้ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าคงที่มากกว่า

เมื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเลี้ยง *Bacillus. licheniformis* F2.2 พบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cooper และคณะ (1981) ส่วนซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตดีรองลงมา ดังแสดงในรูปที่ 32 ในขณะที่รายงานของ Yakimov และคณะ (1995) พบว่า กลูโคส และ ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว

ส่วนปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่สุด คือ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดย Yakimov และคณะ (1995) รายงานไว้ว่า ปริมาณกลูโคสที่สูงกว่า 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไม่มีผลช่วยให้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากขึ้น สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารที่มีแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตออกมาต่ำกว่า เมื่อเทียบกับ กลูโคส อาจเนื่องมาจาก แป้ง มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่า จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ทันที ต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายให้อยู่ในรูปที่ จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ก่อนการนำไปใช้โดยเซลล์จึงเป็นไปอย่างช้า ๆ ซึ่งอาจไม่เพียงพอ สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่สร้างในช่วงการเจริญแบบลอการิธึม และจะเห็นได้ว่า อัตราการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีแป้ง จะช้ากว่าเมื่อเลี้ยงในกลูโคส ส่วนกลีเซอรอล จากการวัดการเจริญ โดยวัดค่าความขุ่นของเซลล์ พบว่า เชื้อ *Bacillus sp.* สายพันธุ์ F2.2 เจริญได้ดี แต่ให้ผลการลดค่าแรงตึงผิวได้ไม่มากนัก ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับรายงานของ Lin และคณะ (1993) ซึ่งพบว่า *B. licheniformis* JF-2 มีการเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล แต่ไม่พบว่ามีการผลิตสารลดแรงตึงผิวเกิดขึ้น

งานวิจัยนี้ไม่ได้ทดลอง แปรผันแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เนื่องจากมีรายงานว่า สารประกอบไฮโดรคาร์บอนจะยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* (Cooper และคณะ, 1981) และ Jenny และคณะ (1993) พบว่า *B. licheniformis* ไม่สามารถใช้ n-alkanes เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ฟางข้าว ชานอ้อย ที่มีการปรับสภาพบางประการด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^0 C เป็นเวลา 15 นาที ในขณะที่ รำข้าว ซึ่งปรับสภาพด้วย 1 % NaOH ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ซึ่งจากการทดลองของ สุภาพร (2536) พบว่าให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เมื่อนำไปใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า การใช้ไฮโดรไลเสทของวัสดุการเกษตร สารละลายที่ได้จากการย่อยฟางข้าว 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) ให้ประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวได้มากที่สุด จากตารางที่ 7 และ รูปที่ 35 นอกจากนั้น ฟางข้าว ยังหาได้ง่าย จึงมีความสะดวกในการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูก ทดแทนการใช้กลูโคสซึ่งมีราคาค่อนข้างแพงได้ดี โดยใน

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวโดยตรง เช่น ผลการทดลองที่ผ่านมาไม่สามารถกระทำได้ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อ (control medium) เอง ก็มีผลลดค่าแรงตึงผิวอยู่บ้าง ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบความสามารถในการลดแรงตึงผิว ของน้ำเลี้ยงเชื้อของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด จาก เปอร์เซนต์ การลดลงของค่าแรงตึงผิว แทน

ส่วนการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ชานอ้อย และรำข้าว พบว่าให้ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้ไม่ดีเท่ากับ การใช้ฟางข้าว อาจเนื่องมาจากมีสมบัติไม่เหมาะสมต่อการที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ เช่น รำข้าว พบว่า มีองค์ประกอบที่เป็นแป้ง และเอนโดสเปิรม์ของพืชอยู่ในปริมาณสูง การนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเคมีต่างๆ ได้มากน้อยเพียงไร ยังอาจขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายประการ เช่น การปรับสภาพวัสดุเหล่านั้นก่อนนำมาใช้ ปริมาณสารยับยั้ง (inhibitor) ปริมาณสารกระตุ้น (activater) ที่มีอยู่ รวมถึง พื้นที่ผิว (surface area) ของวัสดุนั้น ๆ ด้วย (Dekker และ Wallis, 1983 ; Woodward , 1987)

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ *Bacillus. licheniformis* สายพันธุ์ F2.2 ได้ทำการทดลองแปรผันแหล่งไนโตรเจน ชนิดอนินทรีย์สาร ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และ โซเดียมไนเตรท และ ใช้แหล่งไนโตรเจน ชนิดอินทรีย์สาร ได้แก่ กากถั่วเหลืองที่ย่อยแล้ว (SBH), กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยแล้ว โดยจัดให้ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนทุกแหล่ง เท่ากับปริมาณไนโตรเจนใน แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.85 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบประสิทธิภาพความสามารถในการลดแรงตึงผิว จาก % การลดลงของค่าแรงตึงผิว เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ด้วยเหตุผลดังกล่าวแล้วข้างต้น จากผลการทดลอง พบว่าแอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้การลดแรงตึงผิวดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cooper และคณะ (1981) นอกจากนี้ Roubin และคณะ (1989) ทำการศึกษาการใช้ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และ แอมโมเนียมคลอไรด์ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ไนโตรเจนในรูปของ ไนเตรท ให้อัตราการเจริญช้า และต่ำ ได้ผลผลิตต่ำกว่า ไนโตรเจน

ในรูปของแอมโมเนียม ในขณะที่ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรท จะเหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยจุลินทรีย์จะใช้ไนโตรเจน ทั้งในรูปของแอมโมเนียม และไนเตรทร่วมกัน เพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในช่วงแรกจุลินทรีย์จะใช้ไนโตรเจนในรูปไนเตรท เพื่อการเจริญ ช่วงนี้ปริมาณของสารลดแรงตึงผิว ที่ผลิตได้ยังคงอยู่ในระดับต่ำ จากนั้นไนเตรทจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ แอมโมเนียเมื่อขาดไนเตรท ปริมาณแอมโมเนียมจะเพิ่มสูงขึ้น และจะมีการนำไปใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิว ซึ่งพบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้ โซเดียมไนเตรท และ แอมโมเนียมคลอไรด์ เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรท ต่าง ๆ กัน พบว่า ความเข้มข้น 0.2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำลงสามารถให้ผลผลิตในปริมาณที่สูงกว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรก่อนปรับปรุงซึ่งใช้ความเข้มข้น 0.4 % เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 37

ส่วนการใช้แหล่งไนโตรเจน ชนิดอินทรีย์สาร พบว่า ให้ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำ และจุลินทรีย์มีการเจริญช้ามาก ซึ่งอาจเกิดจากสารบางอย่างที่เกิดจากการย่อยกากถั่วเหลือง , กากเมล็ดฝ้าย ภายใต้ความดันสูง มีผลยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิว หรือการที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กรดอะมิโนมากเกินไป อาจกดการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ หรืออาจเป็นเพราะมีไนโตรเจนในรูปที่จุลินทรีย์ต้องการนำไปใช้ เพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว ในสารทั้งสองชนิดนี้อยู่ในปริมาณที่น้อย และอาจมีสารที่สามารถยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ด้วย

ผลของเกลือแร่ปริมาณน้อยที่จำเป็น ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ *B. licheniformis* F2.2 พบว่า เมื่อขาดแมงกานีสซัลเฟต ค่าแรงตึงผิวจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ จะมีค่าสูงที่สุด แสดงว่า แมงกานีสซัลเฟต มีผลกระทบต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. licheniformis* F2.2 มากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 38 และปริมาณของแมงกานีสซัลเฟตที่เหมาะสม คือ 1.71 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 39 โดยอาจเป็นไปได้ว่า แมงกานีสซัลเฟต เป็นแหล่งแร่ปริมาณน้อยที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยที่ ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ และการเพิ่มปริมาณแมงกานีสซัลเฟต ให้สูงขึ้น ไม่ได้มีผลในการเพิ่มผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Cooper และคณะ ,1981)

จากการศึกษาภาวะในการเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 เพื่อสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลลดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อได้มากที่สุด รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 29 ส่วนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญต่ำมากจึงให้ผลผลิตต่ำ ส่วนที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้แต่ส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว และให้ค่าการกระจายน้ำมันได้ต่ำ ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Santos และคณะ (1986) พบว่า อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจะทำให้เมตาบอลิสมของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป เช่น เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (32^0-34^0 C) *Pseudomonas aeruginosa* จะผลิตน้ำตาลแรมโนสลดลง ทำให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวแรมโนลิปิดได้น้อยลง นอกจากนี้ Syldalk และคณะ (1985) ได้รายงานว่า อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ที่เปลี่ยนแปลงไป อาจมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ได้ และ การศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว พบว่า เมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำที่สุด และจะมีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 72 ชั่วโมง ดังนั้นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง จึงเหมาะสมที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ส่วน ความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสม ต่อการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus licheniformis* F2.2 คือ ที่ 250 รอบต่อนาที

จากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 แล้วนำไปบ่มที่ 4^0 ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้ พบว่า สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงกว้าง 6-12 ดังในรูปที่ 42 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cooper และคณะ (1981); Katharina และคณะ (1991) ที่ได้รายงานถึง ส่วนใสของอาหารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ตามลำดับ ว่า มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง

ที่ 6-12 และรายงานของ Babu และคณะ (1994) ที่ว่า สารลดแรงตึงผิวจะมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 5-10 หรือ Horowitz และคณะ (1990) ที่รายงานว่า สารลดแรงตึงผิว surfactant BL 86 จาก *Bacillus licheniformis* 86 มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 4-13 ในแง่ความทนทานต่ออุณหภูมิระดับต่าง ๆ พบว่า ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °ซ) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และ ที่ 0 °ซ สารลดแรงตึงผิวทนอยู่ได้นานตลอด 100 วัน ดังในรูปที่ 43 สำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง พบว่า ที่อุณหภูมิ 55 °ซ และ 80 °ซ สารลดแรงตึงผิวยังคงมีความเสถียรอยู่ได้นานถึง 5 ชั่วโมง ส่วนที่ 100 °ซ สารลดแรงตึงผิวจะเริ่มสูญเสียความเสถียรไปบ้าง หลังทำการบ่มไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดังในรูปที่ 44 ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับรายงานของ Katharina และคณะ (1991) ที่ทำการทดลองบ่มสารลดแรงตึงผิว ที่อุณหภูมิ 20-60 °ซ พบว่า ที่อุณหภูมิดังกล่าว ไม่มีผลลดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ส่วนความเสถียรต่อ เกลือโซเดียมคลอไรด์ (% NaCl) พบว่า ส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 5 % และประสิทธิภาพจะเริ่มลดลง เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ สูงกว่า 10 % ดังแสดงในรูปที่ 45 ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับรายงานของ Horowitz และคณะ (1990) พบว่า การเติม 4% เกลือโซเดียมคลอไรด์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของ สารลดแรงตึงผิว surfactant BL 86 และรายงานของ Lin และคณะ (1994) ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิว JF-2 biosurfactant ที่ 0.5% , 5 % เกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าเมื่อมี 5 % เกลือโซเดียมคลอไรด์ ความสามารถในการลดแรงตึงผิวจะสูงกว่าที่ 0.5% เกลือโซเดียมคลอไรด์ ถึง 4 เท่า และ จากการศึกษา หาจุดวิกฤตของการเจือจาง (crtical micelle dilution , CMD) ของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีค่าอยู่ที่ ระดับการเจือจาง 80 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 46 จุดวิกฤตของการเจือจาง (CMD) คือ ระดับการเจือจางที่มากที่สุด ที่ทำให้ค่าแรงตึงผิวเริ่มมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวของสาร ลดแรงตึงผิว หาก CMD มีค่าสูง แสดงว่า สารนั้นมีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวได้ดี (Sheppard และ Mulligan , 1987 ; Lin และคณะ ,1994)

เมื่อทำการตรวจสอบ Profile ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ *B. licheniformis* สายพันธุ์ F2.2 ด้วยวิธี HPLC เปรียบเทียบโครมาโตรแกรมที่ได้ กับสารละลายเซอแฟกติน มาตรฐาน จาก *Bacillus subtilis* ของบริษัท Sigma chemical, ST. Louis., USA. พบว่า สารที่ผลิตได้จาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ นี้ มีรูปแบบโครมาโตรแกรม ที่แตกต่างจาก สารละลายเซอแฟกติน มาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 47 ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จาก *B. licheniformis* F2.2 น่าจะเป็นสารคนละชนิดกับเซอแฟกติน สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้ศึกษาถึงรายละเอียดทางโครงสร้างโมเลกุล และการวิเคราะห์ทางเคมีอื่น ๆ เช่น นิวเคลียร์แมกเนติกเรซอแนนท์ (NMR), อินฟราเรดสเปคตรัม (IR), แมสสเปคตรัม (Mass spectrum) จึงน่าจะได้มีการศึกษาต่อไป

จากงานวิจัยนี้สามารถหาแหล่งคาร์บอน ราคาถูก ของอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้ทดแทนกลูโคสที่มีราคาค่อนข้างแพง แม้ว่าจะให้ผลผลิตสู้กลูโคส (ตารางที่ 7) ไม่ได้ แต่ก็ให้ผลที่ไม่ต่างกันมากนัก และเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวที่มีฟางข้าว 2 % เป็นแหล่งคาร์บอน กับอาหารเหลวกำหนดสูตรเดิมที่มีกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ให้อัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 34.2 (ค) และ 34.1 (ก) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำฟางข้าวมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังนั้นน่าจะได้มีการศึกษาต่อไปถึงการขยายส่วนการผลิต และ ถ้าได้มีการนำสายพันธุ์นี้ ไปปรับปรุงสายพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยปรับปรุงพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้เพิ่มขึ้นอีก เช่น Mulligan และคณะ (1989) ได้รายงานว่า จากการทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* โดยการใช้แสงอุลตราไวโอเลต พบว่า สามารถเพิ่มผลผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้เพิ่มมากขึ้นกว่า 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบ กับสายพันธุ์เดิม หรือ การนำเอาเทคโนโลยีขั้นสูง เช่น การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) หรือการทำพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ ก็สามารถทำให้ลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวนี้ลงได้มาก ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์และ ดัดแปลง เพื่อการผลิตในขั้นอุตสาหกรรมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. จากการหาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *Bacillus licheniformis* F2.2 พบว่า ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 8.0 เหมาะสมที่สุด โดยมี 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวควบคุม โดยค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 29 มิลลินิวตัน ต่อเมตร เมื่อทำการเจือจางส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ 100 เท่า มีค่าเท่ากับ 42.8 มิลลินิวตันต่อเมตร

2. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า กลูโคส 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ให้ประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวได้ดีที่สุด ส่วนการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย รำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่า ฟางข้าว 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) ให้ประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้ ฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน ราคาถูก ทดแทน กลูโคส

3. การใช้วัสดุทางการเกษตร ซึ่งได้แก่ กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ให้ผลผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำกว่า การใช้ แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์สาร โดย แอมโมเนียมไนเตรท ให้ผลผลิตดีที่สุด จึงเลือกใช้ แอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณของ แอมโมเนียมไนเตรท ที่เหมาะสม ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ 0.2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

4. แมงกานีสซัลเฟต เป็นแหล่งแร่ปริมาณน้อย ที่จำเป็น ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *B. licheniformis* F2.2 โดยใช้แมงกานีสซัลเฟต ที่ปริมาณ 1.71 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่า เมื่อ ไม่มี แมงกานีสซัลเฟต

5. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *B. licheniformis* F2.2 คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จุลินทรีย์สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยสามารถลดแรงตึงผิว

ของส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อได้มีค่าต่ำกว่า 30 mN/m และเมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า ได้ 39.3 mN/m ให้ค่าการกระจายน้ำมัน 33.71 หน่วย

6. เมื่อเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ บ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดค่าแรงตึงผิว พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 6-12 สามารถทนทานต่ออุณหภูมิ 0 °ซ, 4 °ซ และ 30± 2 °ซ ได้นานถึง 100 วัน สำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง 55 °ซ และ 80 °ซ ได้นานถึง 5 ชั่วโมง

7. ความเสถียรต่อ เกลือโซเดียมคลอไรด์ (% NaCl) พบว่า ส่วนน้ำใสที่ ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* F2.2 มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 5 % และประสิทธิภาพจะเริ่มลดลง เมื่อความเข้มข้น ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ สูงกว่า 10 % และ จากการศึกษาหาจุดวิกฤตของการเจือจาง (crtical micelle dilution , CMD) ของส่วนใส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีค่าอยู่ที่ ระดับการเจือจาง 80 เท่า

8. จากการตรวจสอบ Profile ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดย *B. licheniformis* F2.2 ด้วยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับ เซอแฟกตินมาตรฐาน พบว่า มีลักษณะโครมาโตรแกรมที่แตกต่าง จากเซอแฟกตินมาตรฐาน ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 จึงน่าจะเป็นสารคนละชนิดกับสารเซอแฟกติน