

ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการหมักเปลือกส้มโอ ในการยับยั้งแบคทีเรีย

The Potential of Biosurfactant from Pomelo Peel Fermentation for Bacterial Inhibition

ฉานิกา แซ่แง ชูกลิ่น^{1*} วรณวิภา ไชยชาญ¹ และ ปวีณา ดิกิจ²

Chanika Saenge Chooklin^{1*}, Wanvipa Chaichan¹ and Paweena Dikit²

Received: 11 April 2020, Revised: 25 July 2020, Accepted: 16 September 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอเหลือทิ้ง โดยการหมักเปลือกส้มโอเหลือทิ้งร่วมกับน้ำ ใน 4 อัตราส่วน 1:1 2:1 3:1 และ 4:1 ตามลำดับเป็นเวลา 3 เดือน ผลการศึกษาพบว่า ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) ของน้ำหมักจากเปลือกส้มโอ ในอัตราส่วน 1:1 มีค่าการเกิดอิมัลชันสูงสุดเท่ากับร้อยละ 51.64 จึงเลือกน้ำหมักเปลือกส้มโอที่อัตราส่วน 1:1 ไปศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีต่างๆ พบว่าการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) ได้ผลผลิตสารสกัดหยาบของ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.45 กรัมต่อลิตร สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ในช่วงพีเอช 4-10 อุณหภูมิระหว่าง 25-121 องศาเซลเซียส ช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-12 โดยน้ำหนัก ช่วงความเข้มข้นของ แมกนีเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก และช่วงความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0-0.4 โดย น้ำหนักสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่า มีค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ของเชื้อ *E. coli* *Salmonella* sp. *S. aureus* และ *B. cereus* เท่ากับ 25 25 6.25 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า MBC (Minimal Bactericidal Concentration) เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ, เปลือกส้มโอเหลือทิ้ง, ยับยั้งแบคทีเรีย

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง 92150

¹ Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang Campus, Sikao, Trang 92150, Thailand.

² คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

² Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabhat University, Muang, Songkhla 90000, Thailand.

* ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): chanika.sae@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate the production and properties of biosurfactant from fermented pomelo peel waste with water in 4 ratio 1:1, 2:1, 3:1, and 4:1 respectively for 3 months. The result showed that the emulsion ability (EA) of pomelo peel waste with water in the ratio of 1: 1 had the highest emulsion value up to 51.64 percent. Therefore, the ratio 1: 1 was chosen to compare the methods of biosurfactant harvesting with various extraction methods. It was found that the extraction of biological surfactants with chloroform: methanol (2: 1) and the crude extraction of biosurfactant at 0.45 grams per liter. Biosurfactant has the ability to reduce surfactants in the pH range 4-10 of temperature between 25-121 degrees Celsius and sodium chloride salt concentration range from 0-12 percent by weight. The concentration range of magnesium chloride was 0-0.1 percent by weight and that of calcium chloride was 0-0.4 percent by weight. For the bacterial inhibition, the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) of *E. coli* *Salmonella* sp. *S. aureus* and *B. cereus* was 25 25 6.25 and 1.56 milligrams per milliliter, respectively and the MBC (Minimal Bactericidal Concentration) value was 50 milligrams per milliliter.

Key words: biosurfactant, pomelo peel waste, bacterial inhibition

บทนำ

ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการนำเข้าและการใช้สารเคมีได้ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ ผลกระทบทางชีวภาพกำลังได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากผลกระทบทางชีวภาพมีความเป็นพิษต่อธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อมน้อย จึงได้มีการพยายามสร้างผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพมาทดแทนสารสังเคราะห์ทางเคมี โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) เป็นสารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีเรียจะเป็นจุลินทรีย์หลักในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ สามารถใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนจากผักผลไม้ได้ (Xu *et al.*, 2011) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำและชอบน้ำ ซึ่งช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลว ของแข็ง และก๊าซ ซึ่งประกอบด้วย โกลโคลิปิด ลิโปเปปไทด์,

ฟอสโฟลิปิด, และ กรดไขมัน (Dikit *et al.*, 2019) โดยมีรายงานการวิจัยพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถในการปรับการยึดติดของแบคทีเรียบางชนิดบนพื้นผิวและยับยั้งการเกาะติดของแบคทีเรียซึ่งคุณสมบัตินี้ช่วยในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของจุลินทรีย์อีกด้วย (Aran *et al.*, 2014)

กระบวนการหมักที่นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเช่น เปลือกผลไม้เหลือทิ้งมาเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้จุลินทรีย์จากธรรมชาติในการหมักจึงมีความเหมาะสม สำหรับนำมาผลิตเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อผ่านกระบวนการหมักในสภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (anaerobic condition) จุลินทรีย์จะทำหน้าที่ย่อยสลายแหล่งคาร์บอนเหล่านั้นให้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต รวมถึงการใช้เอนไซม์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เพื่อเร่งการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น จะได้สารลด

แรงดึงผิวชีวภาพ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Abouseoud *et al.*, 2008) ดังนั้นคณะผู้วิจัยเห็นว่าการนำน้ำสกัดชีวภาพจากเปลือกส้มโอเหลือทิ้งมาใช้ทดแทนสารยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่มีใช้อยู่ทั่วไปน่าจะช่วยในลดหรือยับยั้งปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และลดกลิ่นเหม็นจากสิ่งปนเปื้อนได้ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดมลพิษจากสิ่งแวดล้อม และมีความสอดคล้องกับแผนยุทธศาสตร์การเสริมสร้างและพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เกี่ยวกับการบริหารจัดการ และการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน

โดยงานวิจัยนี้จะศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการหมักโดยการนำเปลือกส้มโอเหลือทิ้งมาทำการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ และศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ในกลุ่มที่มีความสามารถในการ

ละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน (Amphoteric compound) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

งานวิจัยนี้ได้เลือกวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร ซึ่งได้แก่ เปลือกส้มโอเหลือทิ้งจากเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอทับทิมสยามจาก อ. ปากพนัง จ. นครศรีธรรมราช โดยแบ่งการหมักเปลือกส้มโอกับน้ำ ในอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้คือ 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ โดยทุกอัตราส่วนจะเติมน้ำตาลความเข้มข้น 2 % (w/v) ซึ่งการเตรียมน้ำหมักในแต่ละอัตราส่วนจะเตรียมในปริมาณ 6 ลิตร (ตารางที่ 1) แล้วหมักในสภาวะปิดและไม่มีการเขย่า (standing close system fermentation) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนที่เหมาะสมที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้มโอ

อัตราส่วน	ปริมาณเปลือกส้มโอ (กิโลกรัม)	ปริมาณน้ำ(กิโลกรัม)
1:1	3	3
1:2	2	4
1:3	1.5	4.5
1:4	1.2	4.8

การเก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักสำหรับการวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72) หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในสัปดาห์ที่ 1 2 3 และในเดือนที่ 1 2 3

2. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการหมักในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมจากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิว

ชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอแล้วนำมาทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงดึงผิว โดยนำอัตราส่วนที่เหมาะสม มาหมักเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72) หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และในเดือนที่ 1, 2 และ 3 โดยจะทำการวัดค่า EA EI และ yield เพื่อทำการเปรียบเทียบ

3. การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมัก เปลือกส้มโอ

3.1 ตกตะกอนด้วยอะซิโตน

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการหมักเปลือกส้มโอนำมาหมวนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยอะซิโตนในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ระเหยอะซิโตน (ดัดแปลงจาก Saimmai *et al.*, 2012) วิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่า EA EI และ SR

3.2 ตกตะกอนด้วยเมทานอล

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักมาตกตะกอนด้วยเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระเหยเมทานอล (ดัดแปลงจาก Saimmai *et al.*, 2012) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่า EA EI และ SR

3.3 ตกตะกอนด้วยเอทานอล

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักมาตกตะกอนด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ระเหยเอทานอล (ดัดแปลงจาก Saimmai *et al.*, 2012) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่า EA EI และ SR

3.4 ตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักไปตกตะกอนด้วยการปรับพีเอช โดยใช้ 6 M HCl ปรับพีเอช เป็น 2.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นเก็บตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน นำไปล้างด้วย 100 mM HCl ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 178,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอช เป็น 7.0 ด้วย 2 N NaOH และทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization (ดัดแปลงจาก Saimmai *et al.*, 2012) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่า EA EI และ SR

3.5 สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

นำสารละลายส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักมาสกัด 2 ครั้งด้วย chloroform:methanol ในอัตราส่วน 2:1 โดยใช้กรวยแยก (separation funnel) นำชั้นของตัวทำละลายกำจัดน้ำโดยการเติม anhydrous Na_2SO_4 แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ในเครื่องระเหยสุญญากาศ (ดัดแปลงจาก Saimmai *et al.*, 2012) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่า EA EI และ SR

3.6 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 40 ถึง 60 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือโดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 คาลตัน ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสและทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization (ดัดแปลงจาก Saimmai *et al.*, 2012) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่า EA EI และ SR

จากวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทั้ง 6 วิธี เลือกวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเปรียบเทียบค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์ 1 กรัมต่อลิตร โดยเลือกวิธีการเก็บเกี่ยวที่ทำให้กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์สูงที่สุดเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

4. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

4.1 พิเศษที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

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

4.2 ความคงตัวของอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุด ละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น

4.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากวิธีการเก็บเกี่ยวที่ดีที่สุด 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 โดยน้ำหนักตามลำดับแล้ววัดกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ตามวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการยับยั้งแบคทีเรีย

5.1 การเตรียมเชื้อเพื่อการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิว

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

Bacillus cereus, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. จีคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth (MHB) โดยเลือก single colony บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ 180 rpm เป็นเวลา 18 - 24 ชม. นำมาตกตะกอนเซลล์ โดย centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วทำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบด้วย 0.85% NaCl เจือ จางเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.4 (จำนวนเซลล์ประมาณ 3×10^8 cfu/ml) แล้วเจือจางต่อ ด้วย 0.85% NaCl จนได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^6 - 10^7 cfu/ml นำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาตรวจนับจำนวนโคโลนี โดย เกลี่ยบนอาหาร Plate Count agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 - 24 ชม. แล้วคำนวณจำนวนโคโลนีเป็น cfu/ml

5.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิว

ดูดส่วนใสของน้ำหมักจากเปลือกส้มโอ อัตราส่วนที่เหมาะสมมา Centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนและเก็บส่วนใสไว้ทดสอบ โดยนำส่วนใสมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth

(MHB) แบ่งหลอดทดลองออกเป็น 12 หลอด โดยหลอดที่ 1 เป็นอาหาร MHB (Positive Control) หลอดที่ 2 เป็นน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นร้อยละ 100 (Negative Control) ส่วนหลอดที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 เป็นอาหาร MHB ผสมน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นร้อยละ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 และ 0.08 ตามลำดับ ปิเปตเชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตรแต่ละชนิดลงในชุดการทดลองที่ 1 - 12 บ่มเชื้อ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชม. สังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น หากชุดการทดลองใดไม่พบความขุ่นแสดงว่า หลอดทดลองนั้น ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะเป็นความเข้มข้นที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) จากนั้นนำหลอดทดลองที่ไม่พบความขุ่นไปนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate บน อาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) หากหลอดทดลองใดที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ จะพบ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 20 โคโลนี จะเป็นความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย

เชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 99 (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) (ดัดแปลงจาก Saimmai *et al.*, 2012)(Gasaluck and Unsirilai, 2010)

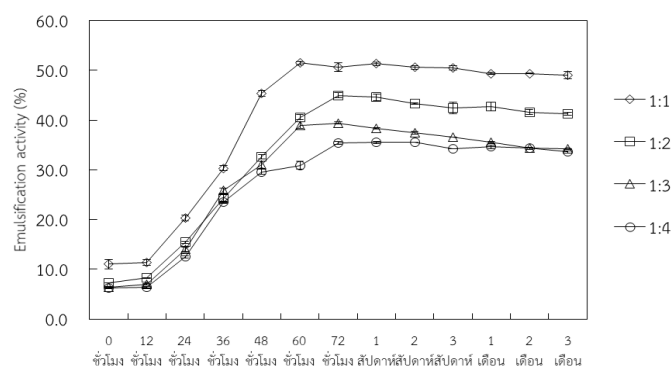
6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูลทาง สถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ p -value < 0.05

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ

ในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะวัดจากความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (EA) ของน้ำหมักจากเปลือกส้มโอในอัตราส่วนต่างๆ ที่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุดคือ น้ำหมักจากเปลือกส้มโอที่อัตราส่วน 1: 1 มีค่าการเกิดอิมัลชันเท่ากับร้อยละ 51.64 ตามลำดับ ดังรูปที่ 1



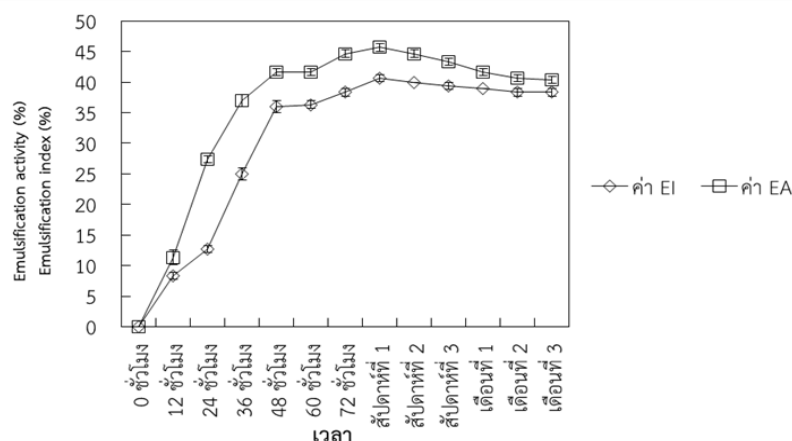
ภาพที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดอิมัลชัน กับระยะเวลาการหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเปลือกส้มโอในอัตราส่วนต่างๆ

จากรูปที่ 1 เมื่อวัดกิจกรรมการเกิดอิมัลชันของทั้ง 4 อัตราส่วนในการหมักเปลือกส้มโอ พบว่าอัตราส่วน 1:1 มีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันสูงสุดคือร้อยละ 51.64 รองลงมาคือ อัตราส่วน 1:2 มีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันร้อยละ 50.32 และอัตราส่วน 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ จากการหมักเปลือกส้มโอทั้ง 4 อัตราส่วน นั้นมีความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนในการหมัก สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีศักยภาพจะนำไปใช้ทางการค้าได้ควรมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากกว่าร้อยละ 50 (Zhu *et al.*, 2019) จากการทดลองในครั้งนี้ อัตราส่วนในการหมักเปลือกส้มโอที่ 1:1 ที่มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มมากกว่าร้อยละ 50 มีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันมากที่สุด (ร้อยละ 51.64) ค่าการอิมัลซิไฟด์เออร์ของสารละลายส่วนใสจากการหมักเปลือกส้มโอแสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอไปประยุกต์ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทางการค้าได้

จากผลการทดลองจึงเลือกน้ำมันจากเปลือกส้มโอที่อัตราส่วน 1:1 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของการหมักเปลือกส้มโออัตราส่วน 1:1

นำส่วนใสที่ได้จากการหมักมาตรวจวัดค่าความสามารถในการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน จากการทดลองพบว่ามีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการหมักและมีแนวโน้มปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักโดยปริมาณสูงสุดที่เวลาในการหมัก 1 สัปดาห์ ด้วยความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยการวัดค่า EA และ EI พบว่าจะเริ่มผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและปลดปล่อยออกสู่น้ำหมักเมื่อเริ่มเข้าสู่การหมักใน ชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก และมีการเพิ่มสูงสุดเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 1 สัปดาห์โดยมีค่า EA และ EI เท่ากับ ร้อยละ 45.67 และ 40.50 ตามลำดับ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ ในอัตราส่วน 1:1

3. การศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอ

หลังจากการหมักเปลือกส้มโอ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และกำจัดตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยง นำ

ส่วนใสที่ได้มาศึกษาการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเลือกใช้วิธีการดังนี้ ตกตะกอนด้วยการปรับค่าพีเอช แอมโมเนียมซัลเฟต อะซิโตน เมทานอล เอทานอล และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

(chloroform:methanol, 2:1) จากวิธีการเก็บเกี่ยวทั้ง 6 วิธี พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มี

ประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ

Recovery method	Yield (g/L)	EA (%)	EI (%)	SR (mN/m)
Acid precipitation	2.87±0.015 ^b	56.03±0.69 ^c	23.67±0.57 ^c	30.66±0.95 ^d
Acetone precipitation	1.96±0.023 ^c	57.73±0.72 ^c	25.26±0.92 ^c	30.92±0.63 ^d
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	1.95±0.042 ^c	58.39±0.20 ^c	25.12±0.83 ^c	32.64±0.56 ^c
MeOH precipitation	2.07±0.025 ^b	60.05±0.93 ^b	38.25±0.73 ^b	38.86±0.69 ^b
EtOH precipitation	2.10±0.042 ^b	61.09±0.93 ^b	41.32±0.79 ^a	37.59±0.92 ^b
CH ₃ Cl:MeOH extraction	3.15±0.045 ^a	65.46±0.59 ^a	41.63±0.60 ^a	40.78±0.49 ^a

*Results represented mean ± standard deviation from triplicate determinations

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

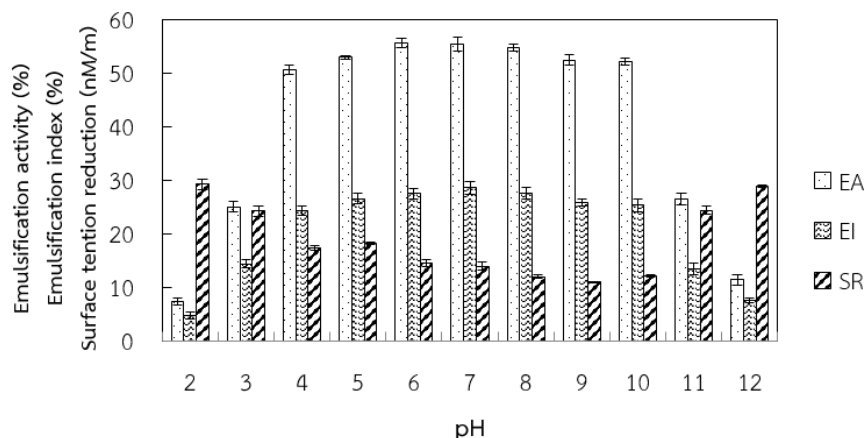
จากการทดลองพบว่าวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการสกัดโดยใช้สารละลายอินทรีย์ (chloroform:methanol, 2:1) มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดสามารถเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวได้ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าการอิมัลซิไฟด์น้ำมันที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร สูงที่สุดที่ร้อยละ 65.46 และ 41.63 สำหรับค่า EA และ EI ตามลำดับ และมีค่าความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว เท่ากับ 40.78 (mN/m)

4. คุณสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอ

4.1 การศึกษาความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่าง ของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 2.0-12.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้ว

นำมาทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว จากการทดลอง พบว่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 2.0-12.0 มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.001$ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอ จะเกิดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิว ในช่วงพีเอช ตั้งแต่ 4 ถึง 10 ซึ่งมีค่าการลดแรงตึงผิวในช่วงร้อยละ 50.65-52.22 และ 24.31-25.32 ของค่า EA และ EI ตามลำดับ และมีค่า SR ในช่วง 17.44-12.10 mN/m เมื่อปรับพีเอชให้ลดลงต่ำกว่า 4 หรือมากกว่า 11 จะทำให้กิจกรรมในการลดแรงตึงผิวลดลงอย่างมาก เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดการตกตะกอนในสถานะที่เป็นกรดสูงและด่างสูง (Dikit *et al.*, 2019) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Vaz *et al.* (2012) ที่พบว่าค่าการอิมัลซิไฟด์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* มีค่าคงที่ในช่วงพีเอช 5.0-10.0 และลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางส่วนเกิดการตกตะกอน ดังภาพที่ 3

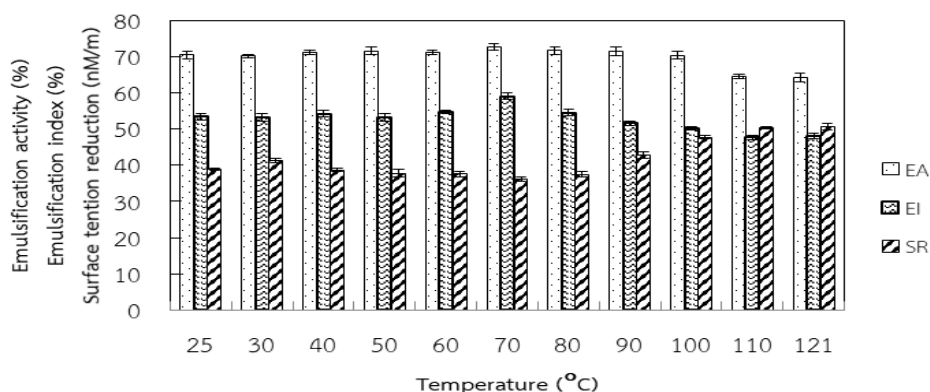


ภาพที่ 3 ผลของระดับพีเอชต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่หมักจากเปลือกส้มโอ

4.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอ ละลายในน้ำกลั่นที่ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส

ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วตั้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงมาที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอ

จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิในช่วง 25-121 องศาเซลเซียส มีผลต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.001$ ซึ่งเห็นได้จากค่า EA และ EI ที่ค่อนข้างคงที่ในช่วงร้อยละ 64.30-72.62 และ 47.66-59.05 ตามลำดับ และค่า SR อยู่ในช่วง 38.83-

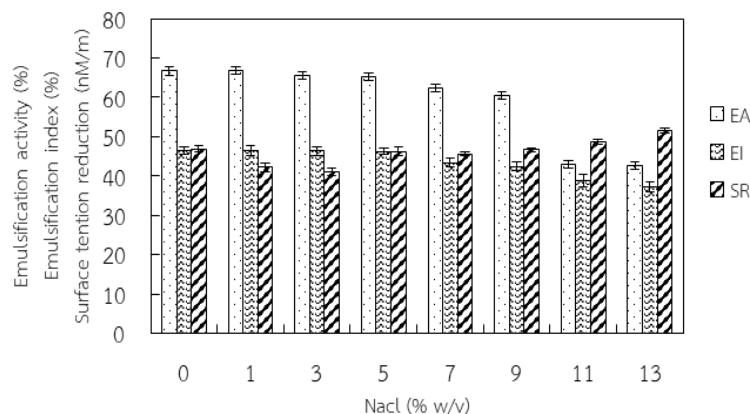
50.63 nW/m ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษา Wang *et al.* (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารอิมัลซิไฟค์เออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* strain JA-1 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 4-

100 องศาเซลเซียส โดยมีค่า EI อยู่ในช่วงร้อยละ 72-75

4.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ในการศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเนื่องจากการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการบำบัดคราบน้ำมันที่ปนเปื้อนในทะเลนั้น องค์ประกอบหลักของน้ำทะเลอาจมีผลต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ จากการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักเปลือกส้มโอพบว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1-9 โดยน้ำหนักมีผลต่อความคงตัวของสาร

ลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.001$ โดยมีกิจกรรมการลดแรงตึงผิวอยู่ในช่วงร้อยละ 60-66 และ 42-46 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ และมีค่า SR อยู่ในช่วง 41.08-46.94 nM/m แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มากกว่าร้อยละ 9 โดยน้ำหนัก กิจกรรมการลดแรงตึงผิวจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 5) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ค่าการลดแรงตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพลดลง จากรายงานของ Thimon *et al.* (1992) ไอออนของเกลือจะมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจากไอออนของเกลือจะจับหมู่คาร์บอกซิลิกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



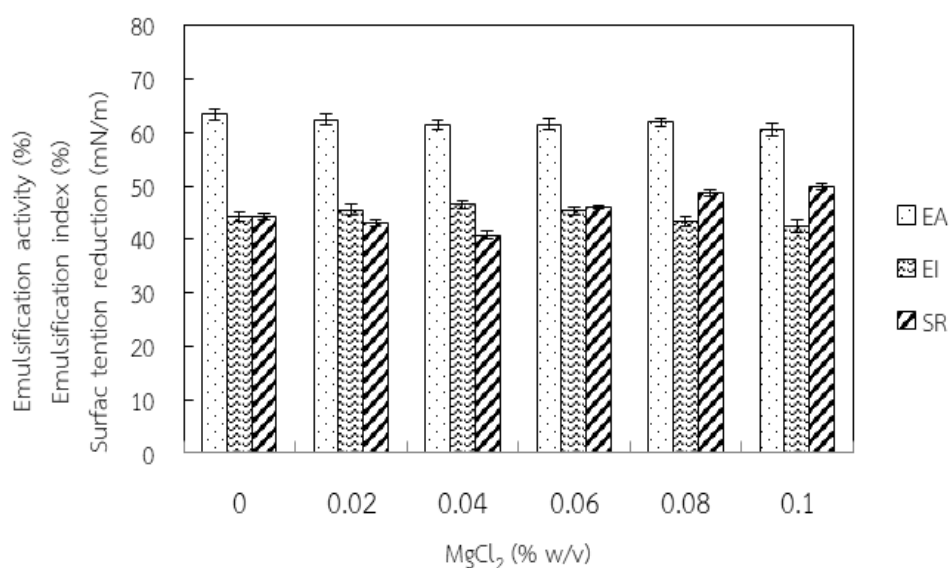
ภาพที่ 5 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอ

ภาพที่ 6 แสดงผลของแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอ แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนัก มีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.001$ โดยมีค่าการลดแรงตึงผิวอยู่ในช่วงร้อยละ 60-63 และ 42-46 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ และมีค่า SR อยู่ในช่วง 40.83-45.89 nM/m จากภาพที่ 7 การศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อ

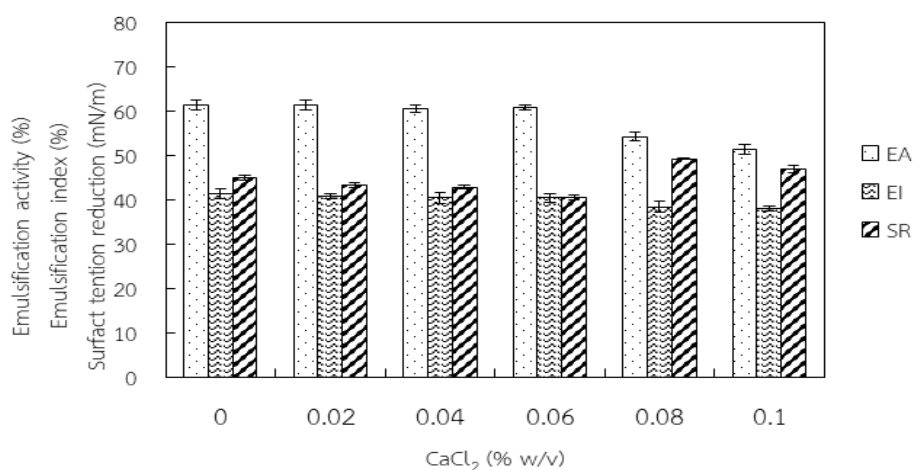
ความสามารถในการลดการตึงผิวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักเปลือกส้มโอ พบว่า ที่แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.06 โดยน้ำหนักมีผลต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.001$ โดยมีค่าการลดแรงตึงผิวอยู่ในช่วงร้อยละ 60-62 และ 40-41 สำหรับ EA และ EI ตามลำดับ และมีค่า SR อยู่ในช่วง 40.58-45.06 nM/m แต่เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่าร้อยละ 0.06 ความสามารถ

ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าลดลงสอดคล้องกับผลการทดลองของ Manerat and Phetrong (2007) ที่ศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Myroides* sp. SM1 ซึ่งแยกจากน้ำทะเลปนเปื้อนน้ำมัน พบว่าอิมัลซิไฟเออร์ชีวภาพที่ผลิต

จากเชื้อ *Myroides* sp. SM1 มีความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-9 โดยน้ำหนักและการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้เพียงเล็กน้อย แต่การเติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4-18 มิลลิโมลทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูญเสียกิจกรรมการอิมัลซิไฟด์น้ำมัน



ภาพที่ 6 ผลของเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเปลือกส้มโอ



ภาพที่ 7 ผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเปลือกส้มโอ

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการหมักเปลือกส้มโอในการยับยั้งแบคทีเรีย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักจากเปลือกส้มโอในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี Broth Dilution Method พบว่าน้ำหมักจากเปลือกส้มโอมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* *Salmonella* sp. *S. aureus* และ *B. cereus* เท่ากับ 23, 24, 5.25 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า น้ำหมักจากเปลือกส้มโอสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *Salmonella* sp.) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*) เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วยลิโปโพลีแซคคาไรด์ที่มีความบางกว่า แบคทีเรียแกรมบวกที่มีชั้นเปปติโดไกลแคนหนาถึง 20-80 นาโนเมตร จึงทำให้สารลดแรงตึงผิวสามารถ เข้าทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนค่าความต่ำสุด (MBC) ที่ สามารถทำลายเชื้อ *E. coli* *Salmonella* sp. *S. aureus* และ *B. cereus* คือ 55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุป

จากการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากการหมักเปลือกส้มโอกับน้ำ ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าที่อัตราส่วน 1:1 มีสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุด โดยมีค่าการเกิดอิมัลชันเท่ากับร้อยละ 51.64 เมื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่ามีกิจกรรมการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการหมักและมีแนวโน้มปริมาณของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักโดยปริมาณ

สูงสุดที่เวลาในการหมัก 1 สัปดาห์ สำหรับการศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชีวภาพจากน้ำหมักจากเปลือกส้มโอพบว่าด้วยการสกัดโดยใช้สารละลายอินทรีย์ (chloroform:methanol, 2:1) มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดสามารถเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวได้ 3.15 กรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาคุณสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้จากการหมักเปลือกส้มโอพบว่ามีความคงตัว ในช่วงพีเอช 4-10 อุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียส ความคงตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 9 มีความคงตัวต่อแมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 และ 0-0.06 ตามลำดับ และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการหมักเปลือกส้มโอในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *Salmonella* sp.) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรังที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัย อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Arun, K.P., Nilotpala, P. Lala, B.S. Prasanna, K.P. and Barda, K.M. 2014. Inhibition of

- pathogenic bacterial biofilm by biosurfactant produced by *Lysinibacillus fusiformis* S9. **Bioprocess Biosystem Engineering** 37: 139-149.
- Dikit, P., Maneerat, C. and Saimmai, A. 2019. The effective emulsifying property of biosurfactant-producing *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 obtained from palm oil contaminated sites. **Applied Biochemistry and Microbiology** 55(6): 615-625.
- Gasaluck, P. and Unsirilai, R. 2010. **Research Report no Biosurfactant from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) conventional fermentation. final.** Suranaree University, Thailand. (in Thai)
- Maneerat, S. and Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. **Songklanakarin Journal of Science and Technology** 29(3): 781-791.
- Saimmai, A., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2012. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. **Annal of Microbiology** 62: 391-402.
- Thimon, L., Peypoux, F. and Michel, G. 1992. Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis* with inorganic cations. **Bioresource technology Letter** 14: 713-718.
- Vaz, D.A., Gudinab, E.J., Alameda, E.J., Teixeira, J.A. and Rodrigues, L.R. 2012. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids Surfactant** 89: 167-174.
- Wang, J., Ji, G., Tian, J., Zhang, H., Dong, H. and Yu, L. 2011. Functional characterization of a biosurfactant-producing thermo-tolerant bacteria isolated from an oil reservoir. **Petroleum Science** 8: 353-356.
- Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z. and Shiina, T. 2011. Biosurfactants for microbubble preparation and application. **International Journal of Molecular Sciences** 12(1): 462-475.
- Zhu, Z., Wen, Y. and Yi, J. 2019. Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: Tea saponin, Quillaja saponin, and Tween 80. **Journal of Colloid Interface Science** 536(15): 80-87.