สัญญาเลขที่ R2562C003

สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตและประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียทนด่างโดยใช้ของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าวเป็นสารตั้งต้น

Production and application of biosurfactant produced from alkaline-tolerant bacteria utilizing rice bran oil refining waste as substrate

คณะผู้วิจัย สังกัด

ดร.ณิชากร คอนดี คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 7 มีค. 2565
เลขทะเบียน 1049438
เลขเรียกหนังสือ 9 TP
248
.B57
ณ 432 ร
2563

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2562

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือสารที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพื่อตอบสนองต่อความสนใจในการใช้ผลิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมของสังคมที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี จึงทำให้หลายปีที่ผ่านมามีงานวิจัยศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์หลากหลายด้าน เช่น บำบัดปิโตรเลียมปนเปื้อน บำบัดโลหะหนักปนเปื้อน ชะล้างและทำความสะอาดพื้นผิว เพิ่มประสิทธิภาพฮอร์โมน ปุ๋ย และสารกำจัดวัชพืช ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค บำรุงและทำความสะอาดร่างกาย อาหารเสริมและเครื่องสำอาง เป็นต้น โดยจากการสำรวจสถานการณ์สารลดแรงตึงผิวทั่วโลกในปี 2011 พบว่าตลาดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีมูลค่า 1.7 พันล้านดอลลาร์สหรัฐและเพิ่มขึ้นเป็น 2.2 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2018 และมีแนวโน้มที่มูลค่าของตลาดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปี 2023 จะเพิ่มขึ้นสูงถึง 2.8 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ

งานวิจัยนี้ได้นำดินปนเปื้อนไขมันที่มีความเป็นด่างสูง (pH 10) จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวมาคัดแยกแบคทีเรียทนด่างที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยข้อดีของการใช้แบคทีเรียทนด่างผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ ระหว่างการผลิต และส่งเสริมประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตออกมาก หลังจากได้แบคทีเรียทนด่างที่มีประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแล้ว จึงศึกษาหาสารตั้งต้น สูตรอาหาร วิธีการผลิต และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยพบว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากกว่างานวิจัยอื่น รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้และพบว่าสามารถลดแรงตึงผิว เกิดอิมัลชันกับน้ำมัน และกระจายน้ำมันได้สูง รวมทั้งยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียได้อีกด้วย

เมื่อดำเนินงานวิจัยนี้เสร็จสิ้นจะได้คลังแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสภาวะด่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีศักยภาพในงานการบำบัดไขมันปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งของการนำของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวมาใช้ประโยชน์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มมูลค่าของของเสีย พร้อมทั้งส่งเสริมภาพลักษณ์ขององค์กรในแง่ของความรับผิดชอบต่อสังคมและสิ่งแวดล้อมในเวลาเดียวกัน โครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการใช้ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีในประเทศอีกแนวทางหนึ่ง โดยเป็นจุดเริ่มต้นของโครงการวิจัยต่อยอดในการช่วยส่งเสริมการพัฒนาอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพของประเทศไทย และสอดคล้องกับนโยบายการพัฒนาเศรษฐกิจ 4.0 ซึ่งคาดว่าในอนาคตจะสามารถนำความรู้ที่ได้รับไปพัฒนาต่อยอดเป็นนวัตกรรมที่สามารถนำไปจำหน่ายหรือใช้ประโยชน์ในระดับชาติต่อไป

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกแทนสารลดแรงตึงผิวเคมี เนื่องจากมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวสูงและมีความเป็นพิษต่ำ ในการศึกษานี้ได้แยกแบคทีเรียทนด่างออกจากดินที่ปนเปื้อนด่างที่เก็บจากโรงกลั่นน้ำมันรำข้าวโดยใช้น้ำมันรำข้าวดิบ ไขสบู่ และแวกซ์เป็นสารตั้งต้น จากไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้ มีแบคทีเรียชอบด่างสามสายพันธุ์มีประสิทธิภาพการลดแรงตึงผิวสูงและถูกระบุว่าเป็น *Brevibacterium casei* NK8 (28.3 mN/m), *Microbacterium paraoxydans* NK22 (29.9 mN/m) และ *Pseudomonas mendocina* NK41 (29.4 mN/m) นอกจากนี้น้ำเลี้ยงปลอดเชื้อของ *Brevibacterium casei NK8* มีความสามารถการเกิดอิมัลชัน (45.8%) การกระจายน้ำมัน (73.3%) และ Critical micelle dilution (18.5 เท่า) สูง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Brevibacterium casei NK8* ถูกจัดประเภทเป็น phospholipid โดยใช้ FTIR และการวิเคราะห์ทางเคมี เปลือกข้าวเป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวโดยวิธีการตรึงเซลล์ของ *Brevibacterium casei NK8* ระยะเวลาในการตรึงที่เหมาะสมและปริมาณของเซลล์ตรึงที่เหมาะสมคือ 2 วัน และ 6% ตามลำดับ ปริมาณของสารสกัดเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม คือ 3.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงสุดที่ 5.9 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันจากน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวได้

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

Biosurfactants have been used considerably as alternatives to chemical surfactants due to their high surface activity and low toxicity. In this study, alkaliphilic bacteria were isolated from alkaline contaminated soils collected from a rice bran oil refinery plant using crude rice bran oil, soapstock and wax as substrates. Among all isolates, three bacterial strains showed great results of surface tension reduction and were identified as *Brevibacterium casei* NK8 (28.31 mN/m), *Microbacterium paraoxydans* NK22 (29.92 mN/m) and *Pseudomonas mendocina* NK41 (29.45 mN/m). Moreover, cell-free broth of *Brevibacterium casei* NK8 had high emulsification index (45.83 %), oil displacement (73.33 %) and critical micelle dilution (18.5 times) values. Biosurfactant from *Brevibacterium casei* NK8 was classified as phospholipid using FTIR and chemical analyses. Rice husk was the suitable immobilized material for biosurfactant production by immobilized *Brevibacterium casei* NK8. The optimum immobilization time and concentration of immobilized cells were 2 days and 6%, respectively. The amounts of peptone and yeast extract at 3.0 and 3.0 g/L could achieved highest biosurfactant concentration of 5.9 g/L. Moreover, biosurfactant could enhance grease and oil degradation from oily wastewater of rice bran oil production plant.

สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary) 3

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) 4

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) 5

สารบัญ 1

บทที่ 1 บทนำ 3

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 3

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 6

1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

2.1 จุลินทรีย์ทนด่าง 8

2.2 จุลินทรีย์ชอบด่างที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 9

2.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 11

2.4 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 15

2.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ของเสียการผลิตน้ำมันพืชเป็นสารตั้งต้น 20

Bacillus pseudomycoides BS6 20

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 23

2.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 24

บทที่ 3 วิธีการทดลอง 26

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ 26

3.2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 28

3.3 เชื้อจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 30

3.4 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียไม่ก่อโรคผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 30

3.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียตรึงบนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 32

3.6 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 34

3.7 การศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น 34

3.8 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 38

บทที่ 4 ผลการทดลอง 39

4.1 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียชอบด่างผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 39

4.2 การศึกษาผลของสารตั้งต้นและวัสดุตรึงต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเซลล์ตรึง 42

4.3 การศึกษาหาระยะเวลาตรึงเซลล์ที่เหมาะสม 45

4.4 การศึกษาหาปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสม 46

4.5 การศึกษาหาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสม 48

Brevibacterium casei NK8 51

Bacillus pseudomycoides BS6 51

4.6 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น 51

4.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันและน้ำมันโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 52

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 54

บรรณานุกรม 55

ภาคผนวก ก ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และผลที่ได้รับ 59

ภาคผนวก ข บทความที่ได้รับการเผยแพร่ 61

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือสารที่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะจุลินทรีย์ (Fiechter, 1992) โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำหรือมีขั้ว และส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือไม่มีขั้ว ซึ่งส่งผลให้สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้ (Cooper, 1980) เช่นเดียวกับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี ส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาล ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟส เป็นต้น ส่วนที่ไม่มีขั้วจะเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่มีทั้งขนาดและโครงสร้างแตกต่างกันไป และทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปด้วย ข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ สามารถย่อยสลายได้ มีความเป็นพิษต่ำ (Benincasa et al., 2002) และสามารถทำงานภายใต้สภาวะที่วิกฤติของพีเอช อุณหภูมิ และความเค็มสูงได้ (Mukherjee et al., 2006) ในปัจจุบันจึงมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ทดแทนสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการบำบัดสารมลพิษ เช่น ปิโตรเลียมในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม (Pornsunthorntawee et al., 2008 และ Thavasi et al., 2011a) และโลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน (Banat et al., 2010; Makkar และ Cameotra, 2002) และการใช้ในงานด้านการชะล้าง (detergency) (Nguyen et al., 2010) เป็นต้น

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้โดยแบคทีเรียหลายชนิด และสามารถใช้สารตั้งต้นสำหรับการผลิตที่หลากหลาย ที่น่าสนใจคือแบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นแหล่งอาหารและผลิตสารลดแรงตึงผิว ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และเป็นการสร้างมูลค่าให้กับของเสียอีกด้วย โดยพบว่ามีการนำน้ำมันพืชและของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียในหลายงานวิจัย (Benincasa et al., 2002; Bednarski et al., 2004; Nitschke et al., 2005; Thavasi et al., 2011b) อย่างไรก็ดีเนื่องจากข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทยและส่งออกไปทั่วโลก จึงมีของเสียที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะปลูกและขัดสีข้าวจำนวนมาก จึงได้มีการนำเศษรำข้าวไปสกัดน้ำมันรำข้าวออกมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น บริโภคเป็นอาหารเสริม ทำอาหาร และผสมในเครื่องสำอาง ทำให้ในระหว่างการกลั่นน้ำมันรำข้าวมีของเสียที่เป็นไขมันออกมา เช่น ไขสบู่ แวกซ์ กรดไขมัน เป็นต้น ซึ่งของเสียเหล่านี้ส่วนใหญ่จะนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ที่

มีราคาถูก แต่ก็มีส่วนที่ปนเปื้อนลงสู่ดินและน้ำเสียด้วยซึ่งบำบัดได้ยาก โดยเฉพาะไขสบู่ที่มีคุณสมบัติเป็นด่างสูงซึ่งส่งผลยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียเป็นอย่างมาก ดังนั้นการนำของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าวมาใช้เป็นสารตั้งต้นจะก่อให้ประโยชน์หลายด้านทั้งในเชิงเศรษฐศาสตร์และสิ่งแวดล้อม

จุลินทรีย์ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อก่อโรค (Gunther et al., 2005) ทำให้การผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ควบคุมได้ยาก เพราะต้องลงทุนสร้างห้องปฏิบัติการที่มีระบบความปลอดภัยระดับ BSL2 และต้องมีผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้เฉพาะทาง จึงกลายเป็นข้อจำกัดที่สำคัญต่อการนำแบคทีเรียและผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จะคัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่ก่อโรคมาใช้ประโยชน์ โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะคัดแยกมาจากของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าว และดินปนเปื้อนของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันรำข้าวที่มีความเป็นด่างสูง จากนั้นนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีสบีซีส์นอกเหนือจากที่ระบุในประกาศของกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ฯ แล้วนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณมาก และศึกษาคุณลักษณะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

อย่างไรก็ตามนอกจากการมีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพแล้ว การพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังต้องปรับปัจจัยและสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสม ได้แก่ 1) ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น ปริมาณแหล่งคาร์บอน (สารตั้งต้น) ชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน และปริมาณและชนิดของโคแฟกเตอร์ และ 2) สภาวะที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ และ pH ของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย (Abouseoud et al., 2008) ทำให้งานวิจัยนี้สนใจศึกษาหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยจะดำเนินการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำที่สภาวะเป็นด่างสูง เนื่องจากของเสียที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นมีความเป็นด่างสูงและเพื่อป้องกันปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นๆ ในระหว่างการผลิต นอกจากนี้ยังจะพัฒนาวิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ในปริมาณมากและและอาจช่วยลดขั้นตอนการสกัดแยกได้ด้วย โดยการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตระหว่างการเจริญของเซลล์ในระยะคงที่ (stationary phase) และมีบางส่วนที่ผลิตในระยะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (exponential phase) (Zawawi, 2005) ซึ่งงานวิจัยนี้จะศึกษาหาวิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ระยะการเจริญของเซลล์คงที่โดยใช้เทคนิคตรึงเซลล์ ซึ่งการตรึงเซลล์จะช่วยเพื่อความเสถียรให้กับจุลินทรีย์ ให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถใช้ซ้ำ และทำงาน

แบบต่อเนื่องได้ ทั้งนี้การใช้เซลล์ตรึงผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังช่วยส่งผลให้น้ำหมักที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากกระบวนผลิตปนเปื้อนเซลล์จุลินทรีย์น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เซลล์อิสระและช่วยลดปัญหาการเกิดฟอง ทำให้ไม่จำเป็นต้องเติมสารยับยั้งฟองในระหว่างการผลิต (Khondee et al, 2015) รวมทั้งช่วยให้การสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำได้ง่ายขึ้นและสามารถลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่ง

ในการทดสอบความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เพื่อเป็นการศึกษาวิจัยแบบครบวงจรงานวิจัยนี้จะทดลองประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันในน้ำเสีย ทั้งนี้เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติที่สำคัญคือการละลายสารที่ไม่ชอบน้ำในน้ำได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มการเข้าถึงไขมันของจุลินทรีย์และเพิ่มการย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรียีในน้ำเสียนั่นเอง โดยทั่วไปแล้วการบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณไขมันค่อนข้างสูงทั้งแบบเติมและไม่เติมอากาศ ทั้งนี้จะใช้วิธีการเวียนสลัดจ์อย่างเดียวคงไม่เพียงพอที่จะบำบัดไขมันได้หมด ทำให้มีหลายงานวิจัยศึกษาหาวิธีต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัด ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นการเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารที่ต้องการลงไปในระบบบำบัดน้ำเสียทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม (Herrero and Stuckey, 2015) โดยหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่จะเติมสามารถเตรียมได้หลายรูปแบบขึ้นกับการใช้งาน เช่น จุลินทรีย์ตรึงในเม็ดเจล จุลินทรีย์ที่เกาะกับตัวกลาง จุลินทรีย์แบบเซลล์อิสระ และจุลินทรีย์ที่รวมตัวกันเป็นเม็ด เป็นต้น (Khongkhaem et al., 2016; Khondee et al., 2012; Dahiya et al., 2016; Gao et al., 2011) ถึงแม้จุลินทรีย์จากงานวิจัยเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพการบำบัดสูงแต่ก็มีข้อจำกัดหลายอย่างที่ทำให้ประสิทธิภาพลดลงได้เช่นกัน ได้แก่ การเสียศักยภาพในการย่อยสลายระหว่างการเก็บรักษา การปนเปื้อนของหัวเชื้อ การเกิดการแข่งขันกันจุลินทรีย์ท้องถิ่น เป็นต้น ซึ่งการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถช่วยลดปัญหาเหล่านี้ได้

ทั้งนี้คาดว่าเมื่อสิ้นสุดโครงการวิจัย จะได้คลังแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสภาวะต่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีศักยภาพในงานการบำบัดไขมันปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งของการนำของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวมาใช้ประโยชน์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มมูลค่าของของเสียพร้อมทั้งส่งเสริมภาพลักษณ์ขององค์กรในแง่ของความรับผิดชอบต่อสังคมและสิ่งแวดล้อมในเวลาเดียวกัน โครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการใช้ประโยชน์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีในประเทศอีกแนวทางหนึ่ง โดยเป็น

จุดเริ่มต้นของโครงการวิจัยต่อยอดในการช่วยส่งเสริมการพัฒนาอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพของประเทศไทย และสอดคล้องกับนโยบายการพัฒนาเศรษฐกิจ 4.0 ซึ่งคาดว่าในอนาคตจะสามารถนำความรู้ที่ได้รับไปพัฒนาต่อยอดเป็นนวัตกรรมที่สามารถนำไปจำหน่ายหรือใช้ประโยชน์ในระดับชาติต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกแบคทีเรียทนด่างที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและศึกษาวิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวของบริษัท CEO Agrifood Co., Ltd เป็นสารตั้งต้น รวมทั้งพัฒนาแนวทางการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตขึ้นสำหรับแก้ไขปัญหาที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมดังกล่าว โดยมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1) เพื่อคัดแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้
2) เพื่อคัดเลือกสารตั้งต้นจากกระบวนการกลั่นน้ำมันรำข้าวที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียไม่ก่อโรคทนด่างที่คัดแยกได้
3) เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สภาวะด่างโดยแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่คัดแยกได้
4) เพื่อศึกษาหาวัสดุตรึง วิธีการตรึง และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
5) เพื่อทดสอบลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่คัดแยกได้โดยใช้ของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าวเป็นสารตั้งต้น
6) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันในน้ำเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันรำข้าว

1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

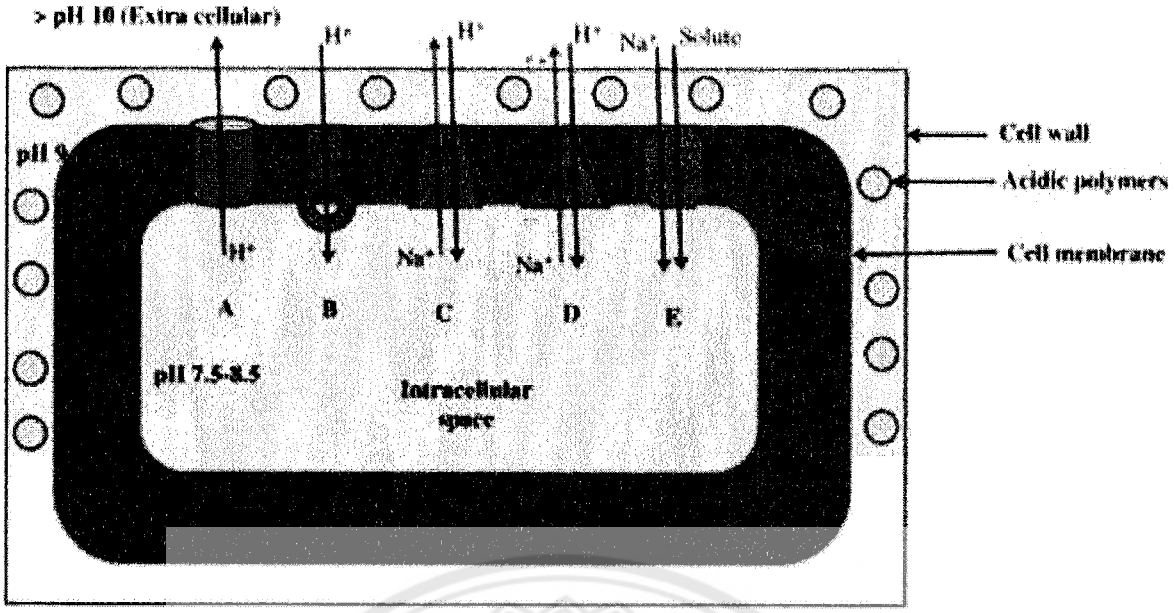
งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของแบคทีเรียในประเทศไทย โดยเน้นแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งงานวิจัยจะครอบคลุมทั้งการศึกษาพื้นฐานเพื่อให้ได้ฐานข้อมูลการผลิตและลักษณะสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ และการวิจัยประยุกต์โดยนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย โดยงานวิจัยนี้จะคัดแยกและเลือกแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในสภาวะด่าง

โดยใช้เสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวในขั้นตอนต่างๆ เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อเป็นการลดต้นทุนและส่งเสริมการนำของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรไปใช้ประโยชน์ สำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีการศึกษาผลของปัจจัยและสภาวะต่างๆ ดังนี้ 1) ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น ปริมาณแหล่งคาร์บอน (สารตั้งต้น) ชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน และปริมาณและชนิดของโคแฟกเตอร์ 2) สภาวะสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิว เช่น ความเค็ม และความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย และ 3) วิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เหมาะสม โดยกลุ่มผู้วิจัยสนใจการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เซลล์ตรึง ส่วนการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสีย ผู้วิจัยจะศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดไขมันในน้ำเสียโรงงานกลั่นน้ำมันรำข้าว จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปแบบต่างๆ เช่น น้ำเลี้ยงหลังการหมักแบบมีเชื้อ น้ำเลี้ยงหลังการหมักปลอดเชื้อ และสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นต้น

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลินทรีย์ทนด่าง

สภาพแวดล้อมที่มีค่าพีเอชสูงมากกว่า 7 จากความเข้มข้นสูงของคาร์บอเนตไอออน(carbonate ions) ซึ่งความเป็นด่างจากค่าพี่เอชที่สูงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปกติ (neutrophiles) แต่จุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นด่างสูง โดยสิ่งมีชีวิตที่เจริญได้ในสภาพวะที่มีความเป็นด่างสูงจะมีการปรับตัวในระดับเซลล์จากกลไกการปรับค่าพีเอชให้สมดุลภายในและภายนอกเซลล์ (pH homeostasis) แบ่งออกเป็น 2 กระบวนการได้แก่ active pH homeostasis คือ เซลล์ของจุลินทรีย์อาศัยกิจกรรมของเมแทบอลิซึม (metabolic activity) เพื่อรักษาค่าพีเอชของไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ให้คงที่ เช่น จากภาวะที่เป็นด่างสูงเซลล์ของจุลินทรีย์อาศัยการผลิตสารขึ้นมาภายในเซลล์จากกระบวนการหมักเพื่อปรับสมดุล และกระบวนการ passive pH homeostasis คือการป้องกันไฮดรอกไซด์ไอออน (hydroxide ion) จากภายนอกไม่ให้เข้าสู่เซลล์ หรือเพิ่มความสามารถของบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ของไซโทพลาสซึมเพื่อไม้ให้ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลง โดยเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus pseudofirmus* OF4 ถูกพบว่าสามารถเพิ่มค่าพีเอชภายในเซลล์ได้ถึง 8.5 ในขณะที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีค่าพีเอช 10 และเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ในขณะที่สภาพแวดล้อมมีค่าพีเอชสูงมากกว่า 10 พีเอชภายในเซลล์ของจุลินทรีย์จะปรับพีเอชภายในเซลล์สูงขึ้นมากกว่า 8.5 ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ชี้ให้เห็นว่าเซลล์จุลินทรีย์สามารถทนต่อสภาวะความเป็นด่างได้ในระดับหนึ่งซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต แต่เมื่อสภาพแวดล้อมมีค่าพีเอชสูงขึ้นเกิดสภาวะที่เหมาะสมของเซลล์จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยผนังเซลล์ และไซโทพลาสซึมของจุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบหลักที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มหรือลดของค่าพีเอชภายในเซลล์ โดยมีการควบคุมการปั้มโปรตอน และโซเดียมไอออนเข้าและออกจากเซลล์ดังภาพ 2.1 โดยเชื้อจุลินทรีย์ชอบด่างสามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมทั่วไป หรือสภาพแวดล้อมทีมีความเป็นด่างที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เช่น ทะเลสาบน้ำเค็ม , ทะเล,ดินเค็ม และเกิดขึ้นจากมนุษย์โดยกิจกรรมจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Kulkarni และคณะ, 2019)



ภาพ 1 แสดงการปรับตัวของเซลล์จุลินทรีย์โดยควบการปั๊มโปรตอน และโซเดียมไอออนเข้าและออกจากเซลล์เพื่อให้ค่าพีเอชภายในเซลล์สมดุลที่สภาวะความเป็นด่างสูง (Horikoshi และคณะ, 1999)

2.2 จุลินทรีย์ชอบด่างที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษางานวิจัยของ Jain และคณะ (2012) ได้มีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินที่มีความเป็นด่าง, น้ำเสียที่มีความเป็นด่าง, สลัดจ์ที่มีความเป็นด่าง และน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันจากโรงงานอุตสาหกรรม นำเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยคัดคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 43 ชนิด จากนั้นคัดเลือกเหลือเพียง 6 จากการทดสอบการเกิดวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเลือด ซึ่งพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิด RJ-06 สามารถลดแรงตึงผิวจาก 69.03 ถึง 46.07 มิลลินิวตันต่อเมตร และผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ถึง 3.15 กรัมต่อลิตรหลังจาก 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของเชื้อ RJ-06 พบว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ *Cronobacter sakazakii* และทำการทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ด้วยการหาค่าอิมัลชันกับไฮโดรคาร์บอนและน้ำมันชนิดต่าง ๆ พบว่าสามารถเกิดอิมัลชันกับไซลีน 70 เปอร์เซ็นต์, ไซโคลเฮกเซน 62 เปอร์เซ็นต์, ไซโคลออกเทน 75 เปอร์เซ็นต์, โทลูอีน 80 เปอร์เซ็นต์, คาร์บอนเตตระคลอไรด์ 65 เปอร์เซ็นต์, ไดคลอโรมีเทน 65 เปอร์เซ็นต์, คีโรซีน 72 เปอร์เซ็นต์, น้ำมันเมล็ดฝ้าย 90 เปอร์เซ็นต์, โจโจ้บาออยล์ 100 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมันถั่วลิสง 90 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ชอบด่าง *Klebsiella* sp. Rj-03 โดยคัดแยกมาจากดินปนเปื้อนน้ำมันเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร Horikoshi มีค่าพีเอช 10 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และ

ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ แป้ง, ซูโครส, ไซโรส, กาแลคโตส, กลูโคส และฟลุกโตส หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ ซึ่งพบว่าปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มากที่สุดจากแหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่แป้ง 10.1 กรัมต่อลิตร, ซูโครส 5.1 กรัมต่อลิตร, ไซโรส 3.25 กรัมต่อลิตร, กาแลคโตส 3.1 กรัมต่อลิตร, กลูโคส 2.75 กรัมต่อลิตร, ฟลุกโตส2.62 กรัมต่อลิตร และมอลโทส 2.19 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทดสอบค่าลดแรงตึงผิวและการเกิดอิมัลชันพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันมีค่าลดแรงตึงผิวดังนี้ แป้ง 40.63 มิลลินิวตันต่อเมตร, ซูโครส 44.06 มิลลินิวตันต่อเมตร, ไซโรส 48.17 มิลลินิวตันต่อเมตร, กาแลคโตส 48.59 มิลลินิวตันต่อเมตร, กลูโคส 49.01 มิลลินิวตันต่อเมตร, ฟลุกโตส 49.13 มิลลินิวตันต่อเมตร และและมอลโทส 52.03 มิลลินิวตันต่อเมตร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ แป้ง, ซูโครส, กลูโคส, ฟลุกโตส, ไซโรส และกาแลคโตส สามารถเกิดอิมัลชันดีที่สุดกับน้ำมันฝ้าย และน้ำมันถั่วลิสง 100, 90, 70 , 70, 60 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Jain และคณะ, 2013) โดยประโยชน์จากการใช้จุลินทรีย์ทนด่างในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่

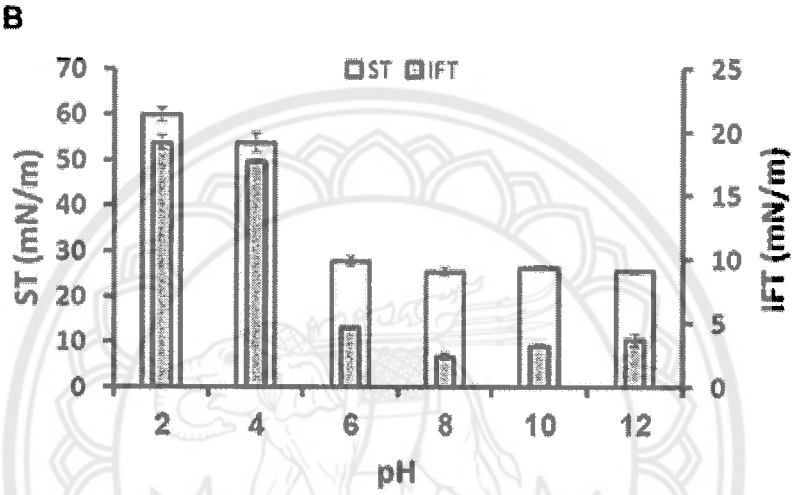
(1) ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ในกระบวนการทำงาน ซึ่งจากสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้

(2). การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สภาวะความเป็นด่าง จุลินทรีย์จึงต้องมีการปรับตัวเพื่อสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะนั้น โดยการรักษาความสมดุลของเซลล์จากการผลิตสารออกมาภายในเซลล์ ซึ่งสารที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาเพื่อรักษาความสมดุลของเซลล์อาจเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงทำให้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากขึ้นจากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สภาวะเป็นด่าง

(3) สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลังจากกระบวนการปรับสภาพวัสดุด้วยด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยไม่ต้องมีกีปรับสภาพอาหารให้มีค่าพีเอชเป็นกลางก่อน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อชอบด่างจึงสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีความเป็นด่าง

(4) ช่วยเพิ่มการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสารมารถละลายได้ดีที่สภาวะเป็นด่างจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานได้ดีขึ้น แต่ที่สภาวะเป็นกรดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดการตกตะกอนจึงส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการทำงานต่ำยิ่งขึ้น

ซึ่งจากงานวิจัยของ Joshi และคณะ (2016) ได้มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* W16 โดยทำการแปรผันค่าพีเอชของอาหารในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้แก่ ค่าพีเอช 2, 4, 6, 8, 10 และ12 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากค่าพีเอชต่างกัน เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติของการลดแรงตึงผิวที่พีเอชมีค่ามากกว่า 6 ขึ้นไปสารลดแรงตึงผิวมีการละลายที่ดีทำให้มีค่าลดแรงตึงผิวที่คงที่ แต่เมื่อเทียบกับที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 4 มีค่าลดแรงตึงผิวที่สูงขึ้นเกิดจากการตกตะกอนของสารลดแรงตึงผิวดังภาพที่ 2



ภาพ 2 แสดงการศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจาก *B. licheni**formis*** W16 **ภาย**ใต้การแปรผันค่าพีเอชต่าง ๆ (Joshi และคณะ, 2016)

2.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ สารชีวโมเลกุลที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิต ซึ่งส่วนมากผลิตจากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา ซึ่งอยู่ในรูป ของสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular) และที่ ติดอยู่กับผนังเซลล์ (cell-bounded) และมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิว โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีรูปแบบโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ซึ่งมีองค์ประกอบของโครงสร้างประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ และมีขั้ว เรียกว่า (hydrophilic portion) ส่วนใหญ่ ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาลเป็นโมเลกุลที่มีหมูของคาร์บอกซิล หมู่อะมิโน หมู่ฟอสเฟส เป็นต้น และอีกส่วน คือ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) หรือส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic portion) ซึ่งไม่มีขั้วเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันทั้งชนิดอิ่มตัว(saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) โดยมีทั้งโครงสร้าง และขนาดแตกต่างกันไป จากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมี

โครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงมีความสามารถที่ละลายได้ทั้งในสารละลายที่ไม่มีขั้ว และสารละลายที่มีขั้ว ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่นจาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตรให้เหลือเพียง 30±5 มิลลินิวตันต่อเมตร โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาความสามารถ และคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดีหลายประการ รวมทั้งมีมีโครงสร้างบางชนิดที่มีความซับซ้อนมาก จึงทำให้มี คุณสมบัติบางประการมีความแตกต่าง หรืออาจดีกว่าจากสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตจากกระบวนการทางเคมี โดยข้อดีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีดังนี้

(1) มีความเป็นพิษน้อย จากการใช้กระบวนการผลิตจากทางธรรมชาติ

(2) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradability) โดยจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียอื่น ๆ ตามธรรมชาติ จึงไม่ก่อให้เกิดมลพิษ หรือสารตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม

(3) ไม่เป็นอันตรายเมื่อเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ถูกประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ รวมทั้งทางด้านอุตสาหกรรมยา และอาหาร โดยมีการทดสอบความเป็นพิษเมื่อเข้าสู่ร่างการมนุษย์แล้วไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรืออันตราย

(4) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความจำเพาะสูง ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบางชนิดมีความซับซ้อนสูง รวมทั้งมีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ที่มีความจำเพาะ ทำให้ส่งผลต่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

(5) มีสารตั้งต้นจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รวมทั้งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถผลิตได้จากของเหลือทิ้ง หรือของเสียทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ

แต่อย่างไรสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นมีข้อด้อย หรือข้อจำกัดบางประการจากกระบวนการต่าง ๆในการผลิต ได้แก่

(1) ในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีปริมาณที่มากนั้นมีค่าใช้จ่ายในการผลิตค่อนข้างสูง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีปริมาณมากยังมีจำนวนน้อย และต้องมีการควบคุมปัจจัยในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เหมาะสม และต้องใช้ถังหมักที่เฉพาะเจาะจงสามารถรองรับปัญหาตากการเกิดฟองในระหว่างการผลิตได้

(2) การสกัด หรือการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีความบริสุทธิ์นั้นทำได้ยาก เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จะปะปนอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต จึงทำให้ขั้นตอนของการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความยาก และซับซ้อน โดยเฉพาะในการนำไปประยุกใช้ในอุตสาหกรรมด้านยารักษาโรค เวชสำอาง และอาหาร ที่ต้องการสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความบริสุทธิ์สูง

(3) กลไกและกระบวนการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์มีความซับซ้อนและเข้าใจได้ยาก เช่นจุลินทรีย์บางชนิดจะสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในสภาวะที่ขาดสารอาหาร และออกซิเจน ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดต้องการสภาวะของอาหารและออกซิเจนที่มีความเหมาะสมเพียงพอต่อการผลิต ดังนั้นในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงต้องมีการศึกษาจุลินทรีย์แต่ละสารพันธุ์

ซึ่งจากความหลากหลายของจุลินทรีย์ และสารตั้งต้นที่สามารถใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจึงทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประเภทที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

2.3.1 ไกลโคลิพิด (Glycolipid)

ไกลโคลิพิด คือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลูโคส แมนโนส กาแล็คโตส กรดกลูดูโรนิก แรมโนส และกาแล็คโตซัลเฟต เชื่อมต่อกับไขมัน เช่น กรดอะลิฟาติก (aliphatic acid) และไฮดรอกซิล อะลิฟาติก (hydroxyl-aliphatic) โดยสารลดแรงตึงผิวที่อยู่ในกลุ่มของไกลโคลิพิด ได้แก่ แรมโนลิพิด (rhamnolipid), ทรีฮาโลลิพิด (trehalolipid), โซโฟโรลิพิด (sophorolipid), ไตรเอซิลกลูโคส (triacylglucose), แมนโนซิลอีริธริทอลลิพิด (mannosylerythritol lipid) เป็นต้น

2.3.2 ลิโปเปปไทด์และลิโปโปรตีน (Lipopeptide and Lipoprotein)

ลิโปเปปไทด์และลิโปโปรตีน คือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรีย และยีสต์หลายชนิด ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติของการลดแรงตึงผิวที่โดนเด่น รวมไปถึงความสามารถยับยั้งเชื้อโรค โดยสารลดแรงตึงผิวที่จัดอยู่มนกลุ่มของลิโปเปปไทด์และลิโปโปรตีน ได้แก่ เซอร์แฟคติน (surfactin) หรือซับทิไลซิน (subtilysin) ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพสูงมีโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 โมเลกุล เชื่อมต่อกับหมู่คาร์บอกซิล และหมู่ไฮดรอกซิลของ β-hydroxy fatty acid ด้วยพันธะโควาเลนท์ โดยที่ความเข้มข้นเพียง 0.005 เปอร์เซ็นต์ สามารถ

ลดแรงตึงผิวของสารละลาย 0.1 โมล ของโซเดียมคาร์บอเนตจาก 71.6 มิลลินิวตันต่อเมตร เป็น 27.9 มิลลินิวตันต่อเมตร

2.3.3 กรดไขมัน ฟอสโฟลิพิด และไขมัน (Fatty acid, Phospholipid, and Nutural lipid

กรดไขมันฟอสโฟลิพิด และไขมันสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียและยีสต์หลายสายพันธ์เมื่อใช้ไฮโดรคาร์บอนเป็นสารตั้งต้น ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มนี้มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ขึ้นอยู่กับชนิดของไฮโดรคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นทำให้มีคุณสมบัติเด่นในการก่ออิมัลชัน แต่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวปานกลาง โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดโครีโนมัยโคลิก (corynomycolic acid) ผลิตจาก *Corynebacterium lepus* โดยปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรสามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเหลือ 40 มิลลินิวตันต่อเมตร และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Mycobacterium rhodochrous* เป็นไขมันที่มีคุณสมบัติในการก่ออิมัลชันระหว่างน้ำกับเดกเคน ซึ่งที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้สามารถลดค่าแรงตึงผิวของน้ำเหลือ 44 มิลลินิวตันต่อเมตร ส่วนฟอสโฟลิพิดมักผลิตและสะสมในเซลล์ของแบคทีเรียกับยีสต์ แต่มีจำนวนน้อยที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ โดยฟอสโฟลิพิดมีโครงสร้างประกอบด้วยกลีเซอรอลเชื่อมต่อกับกรดไขมัน 2 หมู่ และฟอสเฟต 1 หมู่ เช่น ฟอสฟาทิดิลไอโนซอทอล (phosphatidylinositol), ฟอสฟาทิดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol), ฟอสฟาทิดิลเอทานอลามีน (phosphatidlyethanolamine) และกรดฟอสฟาทิดิก (phosphatidic acid) ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพฟอสโฟลิพิด ได้แก่ *Thiobacillus thiooxidans*, *Corynebacterium lepus*, *Corynebacterium alkanolyticum* และ *Acinetobacter* sp. ส่วนยีสต์ ได้แก่ *Candida tropicalis* เป็นต้น

2.3.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ ได้แก่ อิมัลแซน (emulsan), ไลโพแซน (liposan), แมนโนโปรตีน (manoprotein) และสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซคคาไรด์กับโปรตีน (polysaccharide-protein complex) Rosenberg และคณะ (1979) พบว่า *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 สามารถผลิต polyanionic,amphipathic, heteropolysaccharide, bioemulsifier หรืออิมันแซน ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยหน่วยของไตรแซคคาไรด์ที่ซ้ำ ๆกันอยู่ 3 ชนิด คือ N-acetyl amino sugar โดยมีกรดไขมันเชื่อมต่อกับพอลิแซคาไรด์ด้วยพันธะ o-ester อิมัลแซนเป็นสารที่ก่อให้เกิดอิมัลชัน (emulsifying agent) ระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำ โดยใช้เพียง 0.001 – 0.01 เปอร์เซ็นต์ และเป็นอิมัลชันที่

มีความคงตัว ส่วนไลโพแซนสามารถผลิตได้จากยีส์ *Candida lipolytica* ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 83 และโปรตีนร้อยละ 17 โดยส่วนของไฮโดรคาร์บอนเป็น heteropolysaccharide ที่ประกอบด้วย กลูโคส กาแลคโตส กาแลคโตซามีน และกรดกาแลคทูโรนิค (galacturonic acid) โดยมีการรายงานว่า *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตแมนโนโปรตีน ซึ่งเป็นสารก่ออิมัลชันได้ดีกับน้ำมัน อัลเคน และเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยประกอบด้วยน้ำตาลแมนโดนสร้อยละ 40 และโปรตีน17 เปอร์เซ็นต์ (Cameron, Cooper และNeufeld, 1988)

2.3.3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคเป็นส่วนของ extracellular membrane viscle ที่รวมตัวกันเป็นอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการนำไฮโดรคาร์บอนเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ โดยงานวิจัยของ Desai และBanat (1997) พบว่า *Acinobacter* sp. สายพันธุ์ HO1-N สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคขนาด 20-50 นาโนเมตร และมีความหนาแน่นการลอยตัว 1.158 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิพิด และลิโปพอลิแซคคาไรด์

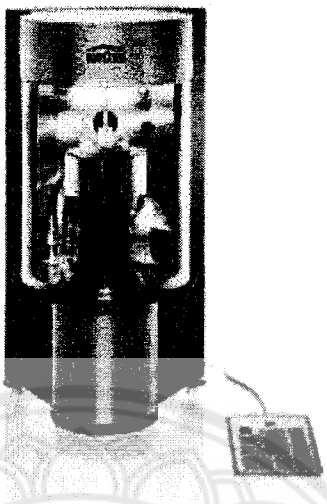
2.4 คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ โดยทั่วไปสามารถทดสอบคุณสมบัติเพื่อประเมินประสิทธิภาพและศักยภาพของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งวิธีที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติได้แก่

2.4.1 ค่าความตึงผิว (Surface tension)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างประกอบด้วยโมเลกุลที่มีขั้ว หรือส่วนที่ชอบน้ำ และไม่มีขั้ว หรือส่วนที่ชอบไขมัน ซึ่งสามารถลดค่าความถึงผิวระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาค คือ ของเหลวกับก๊าซ และของเหลวกับของเหลว โดยหน่วยของค่าแรงตึงผิว ได้แก่ ไดน์ต่อเซนติเมตร (dynes/cm) หรือมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) ซึ่งน้ำมีค่าความตึงผิวที่ 72 มิลลินิวตันต่อเมตร เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในน้ำจะสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ถึง 30 มิลลินิวตันต่อเมตร (Youssef และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ส่งผลต่อการทดสอบค่าแรงตึงผิว ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิ, ionic strength และส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Bodour และ Miller-Maier, 1998) โดยทั่วไปการวัดค่าความตึงผิวสามารถวัดโดยเครื่อง tensiometer ดังภาพ 3 ซึ่งสามารถวัดได้หลายวิธี เช่น วัตถุรูปวงแหวน (Dunouy Ring) หรือวัตถุรูปแผ่นบาง (Wilhelmy Plate) โดยมีหลักการ คือ วัตถุจะถูกจุ่มลงในของเหลวที่ทดสอบ จากนั้นแผ่นวัตถุจะถูกยกขึ้น

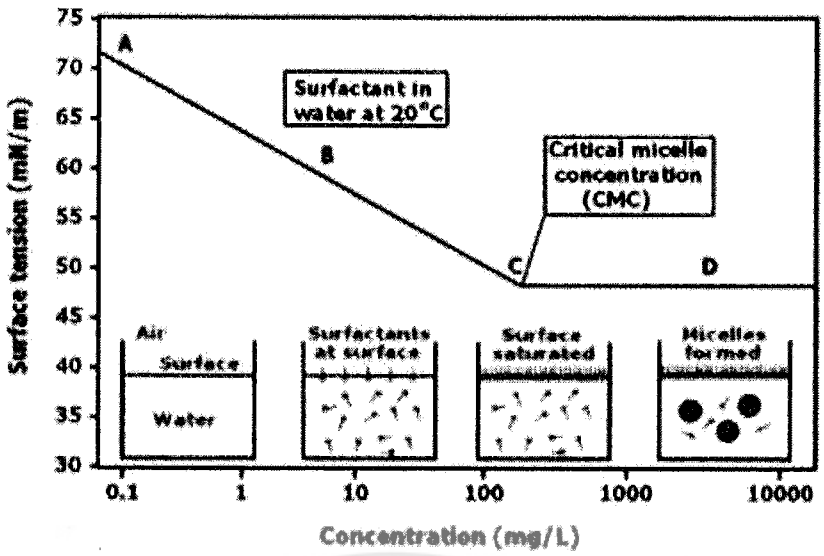
ผ่านผิวหน้าของของเหลวและจะมีแรงดึงเริ่มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยแรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงแผ่นวัตถุออกจากผิวของเหลวจะถูกใช้ในการคำนวณค่าแรงตึงผิวของตัวอย่าง



ภาพ 3 แสดงเครื่อง tensiometer ที่สามารถเปลี่ยนตัววัดให้เป็นได้ทั้งแบบวงแหวนหรือแผ่นบาง (https://www.kruss-scientific.com)

2.4.2 ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่เกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration)

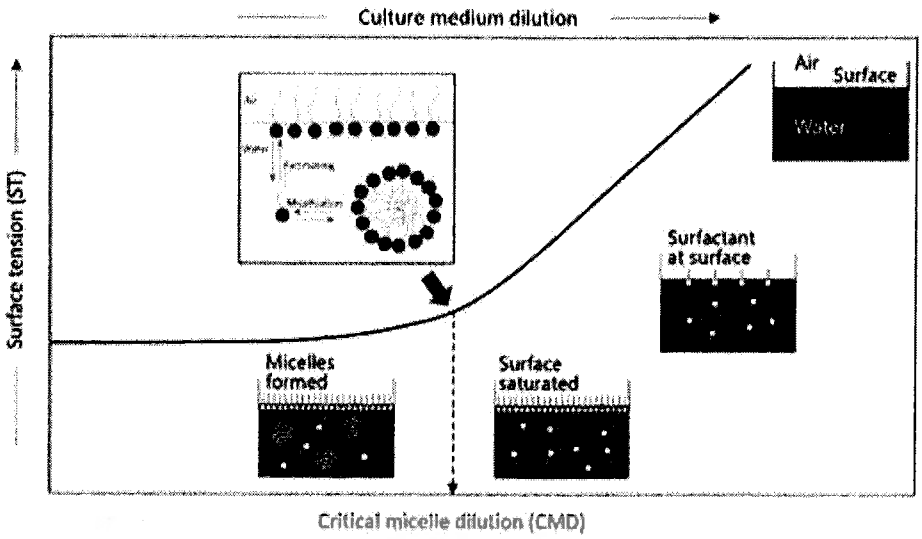
เมื่อมีความความเข้มข้นสูงของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบที่ประกอบด้วยอากาศกับน้ำ หรือน้ำมันกับน้ำ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน ด้วยแรงจับกันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (surfactant self-association) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมกันเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า critical micelle concentration (CMC) เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุด CMC คือ ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวลงไปในสารละลายก็ตาม (Fiechter, 1992) ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถวัดได้โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความตึงผิวกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งความเข้มข้นที่ทำให้ค่าความตึงผิวลดลงได้มากที่สุดก็ คือ ค่า CMC ดังภาพ 4 ดังนั้นถ้าค่า CMC ต่ำ แสดงว่าที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพียงเล็กน้อย ก็จะทำให้เกิดไมเซลล์หรือลดแรงตึงผิวได้



ภาพ 4 แสดงค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เกิดไมเซลล์ critical micelle concentration (CMC) (Migahed และคณะ, 2013)

2.4.3 ค่าการเจือจางสูงสุดที่เกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Dilution)

เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระบบมีความเข้มข้นสูงเพียงพอให้โมเลกุลสามารถหันเข้าหากันและก่อตัวเกิดเป็นรูปแบบไมเซลล์ (micelle) โดยเมื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่ทราบความเข้มข้นมาทำการเจือจางที่ระดับต่าง ๆ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะลดลงตามลำดับการเจือจาง ซึ่งเมื่อถึงจุดหนึ่งการจับตัวกันของสารลดแรงลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปแบบของไมเซลล์จะแยกออกจากกันกลายเป็นโครงสร้างแบบมอนอเมอร์ (monomer) โดยระดับการเจือจางที่มากที่สุดที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงตัวอยู่ในรูปแบบของไมเซลล์ เรียกความเข้มข้น ณ จุดนี้ว่า critical micelle dilution (CMD) ดังแสดงในภาพ 5



ภาพ 5 แสดงค่าการเจือจางที่ต่ำที่สุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เกิดไมเซลล์ critical micelle dilution (CMD) (Migahed และคณะ, 2013)

2.4.4 การเกิดอิมัลชัน (Emulsification index)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความสามารถก่อให้เกิดอิมัลชัน โดยการผสมกันระหว่างสารลดแรงตึวผิวชีวภาพ น้ำ และไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ หรือสารที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อมีการผสมส่วนผสมเข้าด้วยกันจะทำให้เกิดอิมัลชัน นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังสามารถทำลายการเกิดอิมัลชันได้เช่นกัน ซึ่งการวัดค่าความเสถียรของการเกิดอิมัลชันเป็นอีกวิธีในการทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวิเคราะห์จะสังเกตจากความขุ่นที่เกิดขึ้นจากการผสมกันระหว่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับไฮโดรคาร์บอนตั้งทิ้งไว้ 24 ชัวโมง ซึ่งตัวอย่างของไฮโดรคาร์บอนที่ใช้ เช่น เฮกเซน(hexane),โทลูอีน (toluene), เดคเคน(decane), โดเดคเคน(dodecane) และเฮกซะเดคเคน(hexadecane) เป็นต้น (Desai และBanat, 1997)

2.4.5 การกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (มีขั้ว) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือชอบไขมัน (ไม่มีขั้ว) ซึ่งเรียกคุณสมบัตินี้ว่า แอมฟิพาติก (amphiphatic) ส่งผลให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่สามารถรวมตัวเข้ากับตัวทำละลายได้ แต่จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มบนพื้นผิวของตัวทำละลาย (Zawawi, 2005) โดย Youssef และคณะ, (2004) ทดลองได้หยดสารละลายเซอร์แฟคตินความเข้มข้นต่าง ๆ บนเพลต (plate) ที่มีน้ำมันดิบลอยอยู่บนพื้นผิวน้ำจากนั้นทำการวัดเคลียร์โซน(clear zone) หรือวงใสที่

เกิดขึ้นจากการกระจายตัวของน้ำมัน เมื่อหยดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงไป ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างขนาดของเคลียร์โซนกับความเข้มข้นของเซอร์แฟคติน

2.4.6 การวัดมุมสัมผัส (Contract angle)

มุมสัมผัส (contact angle) คือ มุมระหว่างหยดของของเหลว โดยวัดเทียบกับผิววัสดุ ณ จุดที่ผิวทั้งสองเกาะติดกัน ซึ่งการวัดมุมสัมผัสจะมีเกณฑการแบ่งค่าของมุมสัมผัสเพื่อบอกความสามารถในการยึดเกาะของของเหลวกับวัสดุพื้นผิวที่ใช้ หรือเรียกว่าการเปียกของเหลวบนของแข็งว่าเปียกได้ดีหรือไม่ดี โดยเกณฑ์มีดังนี้

(1) มุมสัมผัสเท่ากัน 0 องศา คือการเปียกอย่างสมบูรณ์ ซึ่งเป็นกรณีที่แรงยึดติดมีค่ามากกว่าแรงเชื่อมอย่างมาก เมื่อของเหลวถูกหยดลงบนผิว ของเหลวจะกระจายไปตามผิวของของแข็งจนกลายเป็นชั้นของของเหลวบาง ๆ คลุมพื้นผิวของของแข็งเป็นบริเวณกว้าง

(2) มุมสัมผัสมีค่าระหว่าง 0 ถึง 90 องศา คือ เกิดการเปียกได้ดี ของเหลวจะกระจายไปบนผิวได้เป็นบริเวณกว่าง แต่ก็ยังคงเกาะกันเป็นหยดนูนขึ้นเล็กน้อยจากผิวของของแข็ง

(3) มุมสัมผัสมีค่าตั้งแต่ 90 แต่ไม่ถึง 180 องศา เรียกว่าผิวเปียกยาก คือของเหลวจะรวมกันเป็นหยดรูปทรงค่อนข้างกลม จะมีบริเวณเล็กๆ ที่ฐานของหยดที่ของเหลวยังคงแตะกับผิวของแข็ง

(4) มุมสัมผัสมีค่าเท่ากับ 180 องศา เรียกว่า ผิวไม่เปียก เกิดขึ้นเมื่อแรงยึดติดมีค่าน้อยกว่าแรงเชื่อมอย่างมาก ดังนั้นเหลวจะรวมกันเป็นหยดทรงกลม บริเวณที่ของเหลวแตะกันผิวของแข็งจะอยู่ที่ฐานของทรงกลม ซึ่งเล็กมากจนแทบจะเป็นจุด ซึ่งในลักษณะนี้ของเหลวสามารถกลิ้งไปมาบนผิวได้อิสระ

ซึ่งการเปียก (wetting) คือ ลักษณะของของเหลวที่จะยึดเกาะอยู่บนผิวของของแข็ง การที่ของเหลวจะเปียกบนของแข็งได้ดีหรือไม่นั้นจะเกี่ยวข้องกับแรงสองแรงที่มีอิทธิพล คือ

(1) แรงเชื่อมแน่น (cohesive force) คือแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสารชนิดเดียวกัน คือแรงที่พยายามทำให้โมเลกุลของของเหลวเกาะกลุ่มกันเป็นหยด

(2) แรงยึดติด (adhesive force) คือแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสารต่างชนิดกัน คือ แรงระหว่างโมเลกุลของเหลวและของแข็ง ซึ่งเป็นแรงที่ตรงข้างกับแรงเชื่อมแน่น คือแรงยึดติดจะพยายามทำให้หยดของของเหลวแตกออกจากกัน และกระจายแนบไปกับผิวของของแข็ง

2.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้ของเสียการผลิตน้ำมันพืชเป็นสารตั้งต้น

ของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันพืชได้ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในหลายงานวิจัยด้วยกัน แต่จากประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องระดับความเสี่ยงของเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ฉบับลงวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2557 ได้ทำให้แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันพืชหลายสปีชีส์ได้ถูกจัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* PA1 ที่ใช้น้ำมันบาแบสสุ (babassu oil) (Santa Anna et al., 2001) *Pseudomonas aeruginosa* GS9-119 ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลือง (Rahman et al., 2002) *Pseudomonas aeruginosa* LBI ที่ใช้ของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันดอกทานตะวัน (Benincasa and Accorsini, 2008) *Klebsiella pneumoniae* ที่ใช้ของเสียจากการผลิตน้ำมันปาล์ม (Parveen et al., 2012) เป็นต้น ทำให้ไม่สามารถนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้ แต่ก็ยังมีอีกหลายงานวิจัยคัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มที่ไม่ก่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นว่ายังมีความเป็นไปได้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียไม่ก่อที่ใช้ของเสียจากการผลิตน้ำมันรำข้าวที่สนใจในงานวิจัยนี้

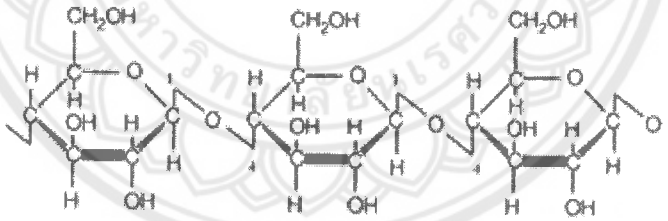
ตาราง 1 แสดงตัวอย่างแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้น้ำมันพืชและของเสียจากการผลิตน้ำมันพืชเป็นสารตั้งต้น

แบคทีเรีย	สารตั้งต้น	ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
Bacillus pseudomycoides BS6	ของเสียจากการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง	ลิโพเปปไทด์	Li et al. (2016)
Bacillus subtilis SK320	น้ำมันมะกอก	ลิโพเปปไทด์	Sekhon et al. (2011)
Lactobacillus delbrueckii	กากน้ำมันถั่วลิสง	ไกลโคลิพิด	Thavasi et al. (2011)
Corynebacterium kutscheri	กากน้ำมันถั่วลิสง	ไกลโคลิโพเปปไทด์	Thavasi et al. (2007)

นอกจากจะนำของเสียที่เป็นน้ำมันจากการผลิตน้ำมันรำข้าว เช่น น้ำมัน ไขสบู่ แวกซ์ มาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ งานวิจัยนี้ยังใช้กากสกัดน้ำมันรำข้าวที่เป็นของเสียประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic wastes) เป็นทั้งสารตั้งต้นสำหรับแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอีกด้วย

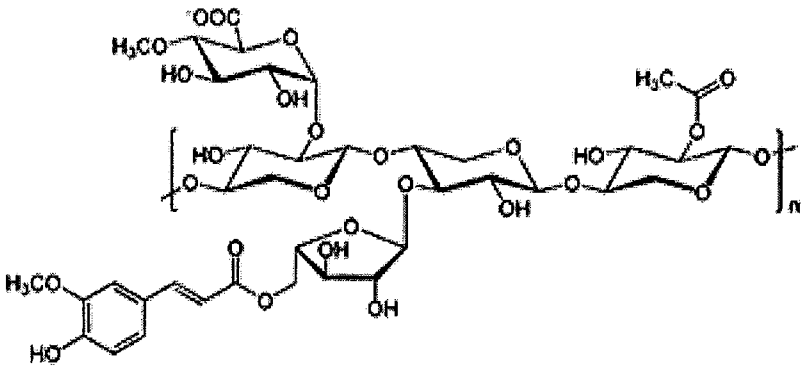
ของเสียประเภทลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบ 3 ส่วนได้แก่ เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยจะมีอัตราส่วนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเสียประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งทั่วไปพบเซลลูโลส (Cellulose) ร้อยละ 35-50, เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) สร้อยละ 20-35, ลิกนิน (Lignin) ร้อยละ 15-20 และองค์ประกอบอื่น ๆ ร้อยละ 15-20

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นโฮโมโพลิเมอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-Glucopyranose) เชื่อมต่อด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic bond) เกิดเป็นโพลิเมอร์กลูแคน (glucan) มีความยาวตามธรรมชาติประมาณ 10,000 หน่วย ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปในธรรมชาติพบเซลลูโลส 2 แบบ คือ crystalline cellulose และ amorphous celluloseโดยส่วนของ crystalline cellulose จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ยากกว่า amorphous cellulose โดยโครงสร้างทางเคมีของของเซลลูโลสดังภาพที่ 6



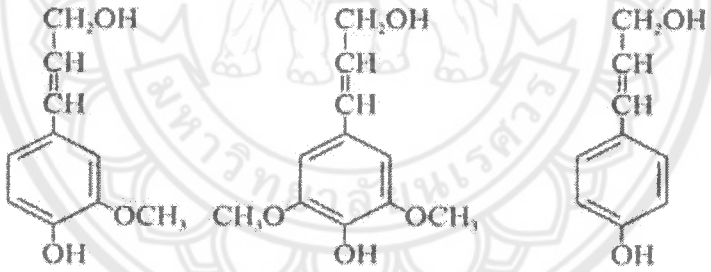
ภาพ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (Eriksson และคณะ,1990)

เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เป็นโฮโมโพลิเมอร์ (homopolymer)ที่มีโครงสร้างเชิงเส้นและแตกแขนงออกโดยเป็นโมเลกุลของน้ำตาลชนิดเดียวกัน หรือเฮทเทอร์โรโพลิเมอร์ (heteropolymer) ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ หลายชนิดผสมกัน เช่น กลูโคส, แมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส ซึ่งพบอยู่ในรูปโพลิเมอร์ไซแลน, แมนแนน, กาแลกแตน และอะราบิแนน สำหรับตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลสแสดงในภาพ 7



ภาพ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไซแลน (Xylan) (Bastawde,1992)

ลิกนิน (Lignin) เป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบ 3 มิติ และไม่ตก**ผลึก ประกอบด้วย**สารประกอบอะโรมาติก 3 ชนิด ได้แก่ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohool และ p-sinapyl alcohol ซึ่งลิกนินมีโครงสร้างพันธะเชื่อมอยู่กับเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส โดยลิกนินมีหน้าที่**ให้ความแข็งแรงแก่**ผนังเซลล์**เพื่อป้อง**การซึมผ่านของน้ำ โครงสร้างทางเคมีของ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohool และ p-sinapyl alcohol ดังภาพ 8 (Kumari และ Singh, 2018)



ภาพ 8 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ coniferyl alcohol, p-sinapyl alcohol **และ** pcoumaryl alcohol (Kumari และ Singh, 2018)

มีหลายงานวิจัยที่ได้นำของเสียประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic wastes) มาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยของเสียเหล่านี้สามารถหาได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ดังตารางที่ 2 ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่จะนำกากสกัดน้ำมันรำข้าวเป็นสารตั้งต้นได้ จากงานของ Jain และคณะ (2013) พบว่าสามารถใช้กากซานอ้อยและกากสกัดน้ำมันสบู่ดำ (วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร) เป็นสารตั้นสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงกว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ตาราง 2 แสดงตัวอย่างแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้น้ำมันพืชและของเสียจากการผลิตน้ำมันพืช

แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ของเสียประเภทลิกโนเซลลูโลส	ความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
Klebsiella sp. RJ-03	เปลือกข้าว	0.94	(Jain และคณะ, 2013)
	กากชานอ้อย	6.20	
	ฟางข้าวสาลี	1.03	
	กากสกัดน้ำมัน *Jatropha*	1.58	
Bacillus subtilis ICF-PC	ซังข้าวโพด	3.95	(Prado และคณะ, 2019)
Pseudomonas aeruginosa DBM 3774	Birch woodchip	2.34	(Hrůzová และคณะ, 2020)
	Spruce woodchip	2.31	
Achromobacter sp. BP(1)5	Rice straw	0.10	(Ni'matuzahroh และคณะ, 2020)
	Corn cob	0.07	

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมนั้น มีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เนื่องจาก จุลินทรีย์ต่างชนิดกันมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน โดย Desai et al. (1994) ระบุว่าแบคทีเรีย *Corynebacterium hydrocarboclastus* ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด เมื่อใช้อัลเคนสายตรงที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 12 ถึง 14 อะตอม เป็นสารตั้งต้น ในขณะที่ Mulligan และ Gibbs (1993) พบว่า *Rhodococcus erythropolis* ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดีที่สุด เมื่อใช้อัลเคนสายตรงที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 12 ถึง 18 อะตอมเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ในปี 2009 Das และคณะ ได้ศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากทะเล โดยพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้มากที่สุดเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณการผลิตอยู่ที่ 2.9 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แป้ง กลูโคส และกลูโคส ตามลำดับ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่สนใจต่อประสิทธิภาพผลิตสารลดแรงตึงผิวด้วย

ชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่นิยมศึกษาควบคู่กันไปกับชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอน โดย Zawawi (2005) ระบุว่าชนิดและปริมาณของไนโตรเจน มีผลต่อค่า pH ของระบบ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พร้อมทั้งยกตัวอย่างแบคทีเรีย *Arthrobacter paraffineu* ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวสูง เมื่อใช้เกลือแอมโมเนียมและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่ *Pseudomonas aerogenosa* สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้สูงสุดเมื่อใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ Silva et al. (2010) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตสารลดแรงตึงผิวของ *Pseudomonas aerogenosa* UCP0992 โดยใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 3% เป็นแหลงคาร์บอน พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวสามารถลดแรงตึงผิวได้มากที่สุดเมื่อใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเปรียบเทียบกับยูเรีย, $(NH_4)_2SO_4$, เปปโทน, $(NH_4)NO_3$, corn steep liquor และ yeast extract โดยให้เหตุผลว่าในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชนิดแรมโนลิพิดนั้น กระบวนการที่เป็น rate-determining factor คือกระบวนการสร้างลิพิด และการที่มีอยู่อย่างจำกัดของไนโตรเจนนั้น จะกระตุ้นการสะสมลิพิดในเซลล์ ซึ่งไนเตรทจะถูกเปลี่ยนเป็นไนโตรเจนได้ยากกว่าแอมโมเนีย เมื่อพิจารณาตามกระบวนการไนตริฟิเคชัน ดังนั้นไนเตรทจึงส่งผลดีต่อกระบวนการสร้างแรมโนลิพิดของแบคทีเรียดังกล่าว Silva et al. (2010) ยังได้ศึกษาผลของ C/N ratio โดยแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ใช้ และควบคุมให้ปริมาณกลีเซอรอลคงที่ที่ 3% โดยใช้ $NaNO_3$ 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 0.6% ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.6% มีปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้มากที่สุดคือ 5.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังเพิ่ม C/N ratio ให้เท่ากับ 150, 75, 46, 37.5 และ 18 ตามลำดับ โดยผลการทดลองพบว่าการเพิ่มอัตราสวนดังกล่าว ไม่ส่งเสริมการผลิตสารลดแรงตึงผิวของแบคทีเรีย ทั้งนี้ทางผู้วิจัยได้ให้ความเห็นว่า C/N ratio ที่มากเกินไปจะส่งผลให้เกิดการสะสมของสารมัธยันตร์ ทำให้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ในทางกลับกันความเข้มข้นของไนโตรเจนที่สูงเกินไปทำให้เซลล์สร้าง cellular material มากเกินไป ส่งผลให้กระบวนการขนส่งสารต่าง ๆ เข้าออกเซลล์เปลี่ยนไปและส่งผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่นเดียวกัน

2.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในน้ำเสียสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียได้ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะไปเพิ่มการเข้าถึงไขมันและน้ำมัน (Bioavailability) สู่เซลล์จุลินทรีย์ย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้จากการละลายไขมันและน้ำให้อยู่ในรูปของไมเซลล์ (Micelle) นั่นเอง โดยสามารถประยุกต์ใช้ทั้งในรูปของหัวเชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อที่มี

สัญญาเลขที่ R2562C0[illegible]
1049438
สำนักหอสมุด
7 มี.ค. 2565

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากงานวิจัยของ Affandi et al. (2014) ได้รายงานว่าการเติมแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในน้ำเสียสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ โดยในการทดลองใช้ *Serratia marcescens* EU555434 บำบัดน้ำมันทำอาหารในน้ำเสีย ซึ่งพบว่าสามารถบำบัดได้สูงถึง 91 เปอร์เซนต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ภายในระยะเวลา 12 วัน

ถึงแม้จะยังไม่พบการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพหรือน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อไปเติมลงในน้ำเสียเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมัน แต่ก็มีความเป็นไปได้เนื่องจากมีงานวิจัยที่สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อไปใช้เพิ่มการย่อยสลายมลพิษอื่นๆ ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมันปิโตรเลียม ได้สูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่เติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะบำบัดได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ (Laorrattanasak et al., 2016) โดยการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนนั้นไม่ต้องการสารลดแรงตึงผิวที่มีความบริสุทธิ์สูง จึงเป็นการประหยัดต้นทุนและประยุกต์ใช้ได้ง่าย

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น HICLAVE HG-50 ยี่ห้อ Hirayama, Japan
- เครื่องชั่งหยาบ (balance for approximate weighing)
- เครื่องชั่งละเอียด (balance for accurate weighing)
- เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (optical Tensiometer)
- เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น Lab 875 ยี่ห้อ SI Analytics, *Germany*
- เครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสง (UV spectrophotometer) รุ่น UV-1800 ยี่ห้อ SHIMADZU, Japan
- ตู้อบ (hot air oven)
- ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
- อ่างคลื่นความถี่สูง (sonicator bath)
- เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) ยี่ห้อ DLAB รุ่น MX-S
- เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (Hotplate Stirrer) ยี่ห้อ LMS, Japan รุ่น HTS-1003
- เครื่อง FT-IR (fourier transform infrared spectroscopy)
- เครื่องวัดมุมสัมผัส (contact angle)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Universal Centrifuge) รุ่น PLC-012E-12 ยี่ห้อ GEMMY, Taiwan
- เครื่องเขย่าสาร (shaker) รุ่น OS-400 ยี่ห้อ HYSC, KOREA
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet) รุ่น HCB-1300V ยี่ห้อ Haier Bio-Medical, China
- ตู้ชีวนิรภัย รุ่น Class II, Type A2 Biosafety Cabinets ยี่ห้อ LABCONCO, USA
- ตู้ดูดความชื้นแบบอัตโนมัติสแตนเลส 70 ลิตร รุ่น ST 70-A ยี่ห้อ NORTHMAN, Thailand
- แท่งแก้วคน (stirring rod)
- ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)

- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- บีกเกอร์ (beaker)
- กระบอกตวง (cylinder)
- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100, 5000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 200, 1000 ไมโครลิตร บริษัท Thermo Scientific
- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 1000 ไมโครลิตร บริษัท Boeco, Germany
- ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 ไมโครลิตร บริษัท Sartorius
- ปิเปตแก้ว (pasteur pipettes) ขนาด 230 มิลลิเมตร บริษัท Volac by Poulten & Graf Ltd., UK
- หลอดทดลอง (test tube)
- หลอดหยอด (dropper)
- กรวยกรอง (filtering funnel)
- กรวยแยก (separating funnel) ขนาด 125, 250 มิลลิลิตร
- ขวดก้นกลม (round bottom flask)
- ขวดแก้ว (duran bottle)
- พาราฟิล์ม (parafilm) บริษัท Bemis, USA
- แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic stirring bars)
- ขวดพลาสติก 120,1000 มิลลิลิตร

3.1.2 วัสดุและสารเคมี

- กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) บริษัท KEMAUS by Elago Enterprises Pty. Ltd., Australia
- เปปโทน (peptone) บริษัท Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract powder) บริษัท Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Ajex Finechem, Australia
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Ajex Finechem, Australia
- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) บริษัท Loba Chemie Pvt. Ltd., India
- ผงวุ้น (agar powder) บริษัท Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- มอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrin) บริษัท

- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท E. Merck, Dramstadt, Germany
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Loba Chemie Pvt. Ltd., India
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Fisher Scientific, UK
- เอทานอล (Ethyl alcohol 95%) บริษัท RCI Labscan Limited, Thailand
- เมทานอล (CH_3OH) บริษัท RCI Labscan, Thailand
- คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) บริษัท RCI Labscan, Thailand
- กรดไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid 37%) ยี่ห้อ Qrec, New Zealand
- กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid 98%) บริษัท RCI Labscan, Thailand
- กรดฟีนอล (C_6H_5OH) บริษัท
- Phenol detached crystals (C_6H_6O) บริษัท Fisher Scientific, UK
- กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) บริษัท
- วานิลลิน ($C_8H_8O_3$) บริษัท
- Brilliant blue G บริษัท PanReac AppliChem, Germany
- Dehydol LS3 TH บริษัท Thai ethoxylate, Thailand
- ผลิตภัณฑ์ล้างจานชนิดเข้มข้น บริษัท 3เอ็ม ประเทศไทย จำกัด
- น้ำมันปาล์ม (palm oil) บริษัท โอลีน จำกัด
- กากบีบน้ำมันมะพร้าว (coconut oil cake) บริษัท อำพลฟู้ดส์ จำกัด
- เมล็ดถั่วเขียว (Mung bean) บริษัท เจียไต๋ จำกัด

3.2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร Horikoshi (HM) ใช้ในกระบวนการกระตุ้นหัวเชื้อแบคทีเรียชอบด่าง (Inoculum stimulation)

- Glucose	10 กรัม
- Peptone	5 กรัม
- Beef extract	5 กรัม
- K_2HPO_4	1 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$	0.2 กรัม

- Na_2CO_3 10 กรัม
- Distilled water 1,000 มิลลิลิตร

โดยทำการผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสัดส่วนที่ชั่งไว้แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร และทำการเตรียมสารละลาย 10% Na_2CO_3 โดยละลาย Na_2CO_3 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำสารละลาย 10% Na_2CO_3 ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แต่สำหรับการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารควรปรับอุณหภูมิของเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อป้องกันการไหม้ของน้ำตาลที่ใส่ลงไปในอาหาร จึงต้องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า โดยอาหารที่ได้จะมีค่า pH เท่ากับ 7 จากนั้นนำสารละลาย Na_2CO_3 มารวมกันจะได้อาหารที่มีค่า pH เท่ากับ 10

3.2.2 อาหาร Horikoshi (HM) ไม่มีน้ำตาล ใช้ในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant production)

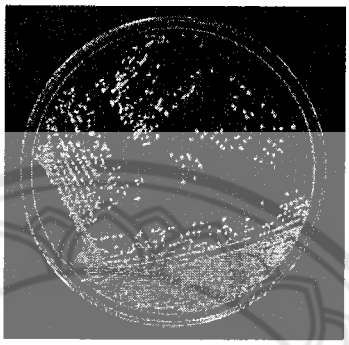
- Peptone 5 กรัม
- Beef extract 5 กรัม
- K_2HPO_4 1 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม
- Na_2CO_3 10 กรัม
- กากบีบน้ำมันมะพร้าว 50 กรัม
- Distilled water 1,000 มิลลิลิตร

โดยทำการผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสัดส่วนที่ชั่งไว้ แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เกิดการกระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) โดยอาหารที่ได้จะมีค่า pH เท่ากับ 10

3.3 เชื้อจุลินทรีย์และสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.1 แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ *Brevibacterium casei* NK8 (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบด่าง (alkaliphilic bacteria) ที่คัดแยกได้จากดินปนเปื้อนไขสบู่ที่มี pH 10 ของโรงงานน้ำมันรำข้าว จ.สิงห์บุรี ประเทศไทย



ภาพ 9 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Brevibacterium casei* NK8 บนอาหารแข็ง HM

3.3.2 สารตั้งต้นสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ของเสียจากการผลิตน้ำมันรำข้าวที่นำมาทดลองใช้เป็นสารตั้งต้น ได้แก่ น้ำมันรำข้าวหยาบ ไขสบู่ และแวกซ์ จากบริษัท CEO Agrifood Co.,Ltd.

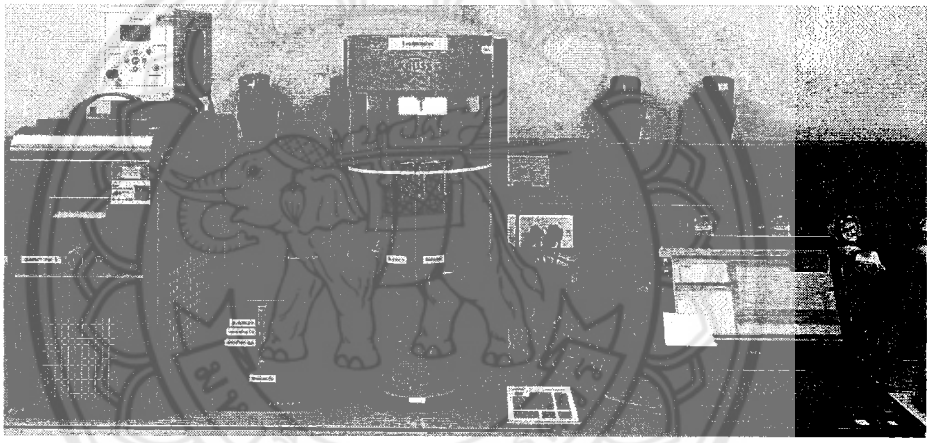
3.4 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียไม่ก่อโรคผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แบคทีเรียทนด่างผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะคัดแยกจากดินปนเปื้อนของเสียจากกระบวนกลั่นน้ำมันรำข้าวของบริษัท CEO Agrifood Co.,Ltd โดยนำดิน 1% และของเสียจากการผลิตน้ำมันรำข้าว 1% เติมลงในอาหาร HM เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วันจากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง HM ที่มีน้ำตาล (Spread plate) แล้วแยกโคโลนีไป Streak บนอาหารแข็ง HM ที่มีน้ำตาล ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว HM ที่มีของเสียจากการผลิตน้ำมันรำข้าว 1% ที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ ก่อนนำน้ำเลี้ยงหลอดเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติการลดแรงตึงผิวต่างๆ เช่น ค่าแรงตึงผิว (Surface tension) การกระจายน้ำมัน (Oil displacement) และการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E24) และการวิเคราะห์ค่า Critical micelle dilution (CMD) จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียทนด่างที่มีแนวโน้มการผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ดี แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA กับบริษัทภายนอก แล้วนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน

ฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn สำหรับนำมาใช้ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

4.1 การวิเคราะห์ค่าแรงตึงผิว (Surface tension) และค่า Critical micelle dilution (CMD)

ค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อสามารถวัดได้โดยเครื่อง Tensiometer และการวิเคราะห์ค่า Critical micelle dilution (CMD) โดยเป็นการหาค่าระดับการเจือจางสูงสุดของสารละลายที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ยังคงเป็นไมเซลล์อยู่ โดยนำสารลดแรงตึงผิวแบบน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อ (cell-free broth) ที่ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับการเจือจาง 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 และ 1000 เท่า แล้ววัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Tensiometer จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับระดับการเจือจางของสารละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อคำนวนหาค่า CMD



ภาพ 10 เครื่อง Tensiometer ยี่ห้อ KRUSS

4.2 การวิเคราะห์การกระจายน้ำมัน (Oil displacement)

การทดสอบค่าการกระจายตัวของน้ำมันสามารถทดสอบโดยนำน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมลงในเพลตแก้ว (glass petri dish) จากนั้นหยดตัวอย่างไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) หรือน้ำมัน ซึ่งในงานวิจัยเลือกใช้เฮกซะเดกเคน (hexadecane) และน้ำมันปาล์ม ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงไปบนเพลตแก้วที่เติมน้ำกลั่นรอจนกระทั่งไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) หรือน้ำมันตัวอย่างแผ่ออกเป็นวงกว้าง แล้วจึงหยดอาหารเหลวปลอดเชื้อ (cell-free broth) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง (centrifuge) 4000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 15 นาที โดยหยดลงไปบนไฮโดรคาร์บอน หรือน้ำมันตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร สังเกตุลักษณะการเกิดวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใสที่เกิดขึ้นหลังจากการหยดอาหารเหลวปลอดเชื้อ นำค่าที่ได้ไปคำนวน

เปอร์เซ็นต์เทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของไฮโดรคาร์บอน หรือน้ำมันก่อนหยดอาหารเหลวปลอดเชื้อดังสมการ

$$\text{ค่าการกระจายน้ำมัน} = \frac{\text{ขนาดของการเกิดวงใส(Clear zone)(ซ.ม.)}}{\text{ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางน้ำมัน(ซ.ม.)}} \times 100$$

4.3 การวิเคราะห์การเกิดอิมัลชัน (Emulsification index, E24)

การทดสอบการเกิดอิมัลชัน (Emulsification Index, E24) โดยนำอาหารเหลวปลอดเชื้อ (cell-free broth) ปริมาตร 2 ml ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) หรือน้ำมันตัวอย่าง ได้แก่ เฮกซะเดกเคน (hexadecane) และน้ำมันปาล์มปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตามชุดการทดลองนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex เป็นระยะเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เกิดอิมัลชันโดยดูจากชั้นของการเกิดอิมัลชันเทียบกับชั้นทั้งหมด บันทึกผลการทดลอง ซึ่งค่าการเกิดอิมัลชันคำนวณได้เป็นร้อยละของการเกิดอิมัลชันเทียบกับชั้นทั้งหมดโดยคำนวณได้จากสมการ

$$\text{การเกิดอิมัลชัน} = \frac{\text{ความสูงของชั้นอิมัลชัน(ซ. ม.)}}{\text{ความสูงของสารผสมทั้งหมด(ซ. ม.)}} \times 100$$

3.5 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยแบคทีเรียตรึงบนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

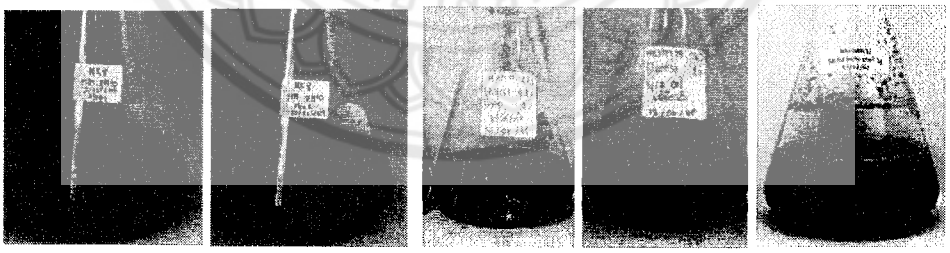
นำหัวเชื้อของในกลีเซอรอล ที่แช่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปเลี้ยงในอาหารเหลว HM (pH10) 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาน้อยที่สุดที่เชื้อเจริญได้มากที่สุด ($1x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว HM (pH 10) 100 มิลลิลิตร 10 % โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปรับค่าการดูดกลืนแสงให้ได้เท่ากับ 1.0 ก่อนนำไปใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

3.5.2 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเซลล์ตรึง

นำขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ HM (pH 10) ที่ไม่มีน้ำตาล 400 มิลลิลิตร ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นเติมหัวเชื้อ 10 % โดยปริมาตร (จากข้อ 5.1) สารตั้งต้น (ของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าว) 0.5 % และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 1-10 % ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ

HM (pH 10) 400 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-5 วัน เพื่อตรึงเซลล์แบคทีเรียทนด่างบนวัสดุตรึง ในแต่ละวันจะนำไปนับจำนวนเชื้อด้วยเทคนิค drop plate เมื่อครบจำนวนเวลาที่ตรึง จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อแอกแล้วเติมอาหารเหลว HM (pH 10) ลงไปใหม่พร้อมด้วย สารตั้งต้น (ของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าว) 1.0-10.0 % เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเซลล์ตรึง เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนแบคทีเรียบนเซลล์ตรึงทุกวัน จากนั้นแยกน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากวัสดุตรึงโดยนำไปกรองผ่านตะแกรง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้ของแต่ละวัน โดยการศึกษานี้จะศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1) ผลของระยะเวลาที่ใช้การตรึงเซลล์แบคทีเรีย ระยะเวลาการตรึงเซลล์ที่เหมาะสมจะเป็นระยะเวลาที่สั้นที่สุดแต่เซลล์ตรึงที่ได้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด
2) ผลของปริมาณเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าปริมาณเซลล์ตรึงน้อยเกินไปอาจทำให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้น้อย แต่ถ้ามากเกินจะทำให้เซลล์ตรึงบางส่วนไม่สามารถเข้าถึงอาหารได้ รวมทั้งทำให้ระบบมีต้นทุนสูง ความเข้มข้นของเซลล์ตรึงที่จะศึกษาจะพิจารณาจากการฟุ้งกระจายของเซลล์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
3) ผลของความเข้มข้นของปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสมจะต้องเพียงพอให้แบคทีเรียในเซลล์ตรึงใช้สำหรับการผลิต แต่ต้องไม่มากเกินไปจนทำให้มีสารตั้งต้นเหลือในอาหาร ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตและความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้



(ก) (ข) (ค) (ง) (จ)

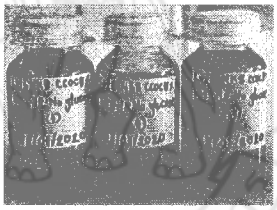
ภาพ 11 แสดงลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อ HM ของขั้นตอน (ก) กระตุ้นเชื้อครั้งที่ 1 (ข) กระตุ้นเชื้อครั้งที่ 2 (ค) ก่อนตรึงเซลล์ (ง) หลังตรึงเซลล์ และ (จ) หลังผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ขั้นตอนการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มจากการนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปรับความเป็นกรดด่างของ

อาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 6 โมลาร์ เพื่อทำการตกตะกอนลิกนิน แล้วจึงสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (2:1) 1 ส่วนต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ส่วน แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตั้งให้เกิดการแยกชั้นในกรวยแยก เก็บชั้นที่เป็นตัวทำละลาย นำชั้นตัวทำละลายทำซ้ำอีก 1 รอบ แช่เย็น 24 ชั่วโมง เพื่อเกิดการแยกชั้น แล้วดูดอาหารส่วนเกินแยกออก จากนั้นนำส่วนที่เป็นตัวทำละลายไประเหยในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้หมด จนได้ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล แล้วจึงละลายอีกครั้งด้วยเมทานอล แยกเฉพาะส่วนของเมทานอลออกมาและนำไประเหยในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในตู้ดูดควัน จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก และรายงานปริมาณสารลดแรงตึงผิวในหน่วยกรัมต่อลิตร โดยมีสูตรคำนวณปริมาณสารสกัดหยาบดังนี้

$$\text{ปริมาณสารสกัดหยาบ (กรัมต่อลิตร)} = \left(\frac{\text{น้ำหนักขวดหลังสกัด} - \text{น้ำหนักขวดก่อนสกัด}}{\text{ปริมาณที่นำมาสกัด}}\right) \times 1000$$



ภาพ 12 แสดงลักษณะสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้

3.6 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมจะสนใจที่การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดไนโตรเจน และปริมาณของไนโตรเจน เป็นต้น ทั้งนี้การประเมินประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จะพิจารณาจากการนำน้ำหมักที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดหยาบ และจำนวนแบคทีเรียบนวัสดุตรึง

3.7 การศึกษาชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น

ในการศึกษาหาชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น จะใช้วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้หลักการของสเปกโทรโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer) การหาหมู่ฟังก์ชันโดยใช้เทคนิค FT-IR (Fourier transform infrared) การหามวลโมเลกุลโดยใช้เทคนิค GPC (Gel Permeation Chromatography) ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธี Sulfo-phospho-vanillin

เตรียมสารละลายแบบน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อที่ได้จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Brevibacterium casei* NK8 ที่อยู่ในรูปสารกัดหยาบในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกฟอสเฟตที่ปรับค่าพีเอชที่ 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ต้มในน้ำร้อน 100 องศา เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลาย phosphor-vanillin ปริมาตร 5 มิลลิตร นำมาต้มในน้ำอุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 15 นาที ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลื่นแสงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณไขมัน โดยใช้สารไตรโอลีน เป็นสารมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณไขมัน

โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ให้ละลายไตรโอลีนความเข้มข้น 0 50 100 200 300 400 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นทดสอบตามวิธี sulfo-phospho-vanilin วัดค่าการดูกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ของความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นสารกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

เตรียมสารละลายน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อที่ได้จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Brevibacterium casei* NK8 ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกฟอสเฟตที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาณ 100 ไมโตรลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย Coomeassie reagent ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ว่างให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารผสมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีน โดยใช้สารโบวีนซีรัมแอลบูมีน เป็นสารมาตรฐานสำหรับการวัดโปรตีน

โดยการเตรียมสารมาตรฐาน ให้ละลายสารโบวีนซีรัมแอลบูมินความเข้มข้น 0 25 50 125 250 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นทดสอบตามวิธี Bradford assay วัดค่าการดูกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ของความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น

3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

เตรียมสารละลายน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อที่ได้จากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Brevibacterium casei* NK8 ที่อยู่ในรูปสารกัดหยาบในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกฟอสเฟตที่ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายสารลดแรงตึงผิวที่เตรียมมา 1 มิลลิลิตร ผสมฟีนอลปริมาตร 25 ไมโครลิตร และกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จามลำดับ ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารผสมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีน โดยใช้กลูโคส เป็นสารมาตรฐานสำหรับการวัดปริมาณน้ำตาล

โดยการเตรียมสารมาตรฐาน ในสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0 10 20 40 60 80 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทดสอบตามวิธี phenol-sulfuric acid วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร ของความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้ม

3.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยวิธีแวนาโดโมลิบโดฟอสฟอริกแอซิด

(1) ขั้นตอนการเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ความเข้มข้น 6 Normal

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 240 กรัมจากนั้นเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)

(2) ขั้นตอนการเตรียมสารละลายแวนาเดท-โมลิบเดท

- สารละลาย ก : ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท (Ammonium molybdate: $(NH4)6Mo7O24•4H2O$) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร
- สารละลาย ข : ละลายแอมโมเนียม เมตาวานาเดท (Ammonium metavanadate : $NH4VO3$) 1.25 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ต้นให้เดือดจนสารละลาย ทิ้งให้สารละลายเย็นตัวเท่าอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก 330 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลาย ก เติมลงในสารละลาย B ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(3) ขั้นตอนการย่อยสลายโดยใช้กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) - กรดไนตริก (Nitric acid)

นำตัวอย่างที่ต้องการย่อยปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมด้วยกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตรและกรดไนตริก 5 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยเตาให้ความร้อน (Hot plate) ในตู้ดูดควัน (Fume hood) เพื่อไล่กรดออก จนกระทั้งได้สารละลายที่ใสไม่มีสีทิ้งให้เย็นลง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร และฟีนอล์ฟธาลีน 1 หยด เขย่า

ให้เข้ากันจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 normal จนเปลี่ยนเป็นสีชมพูปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร ทำให้เกิดสีโดยนำตัวอย่างปรับค่าพีเอชให้เป็นกลาง ไม่เกินพีเอช 8 ปิเปตตัวอย่างมา 35 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร เติมสารละลายแวนาเดทโมลิบเดท 10 มิลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ระยะเวลา 10 นาที กลายเป็นสารละลายสีเหลือง

(4) ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต

นำสารไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (Dipotassium phosphate:K2HPO4) อบให้แห้ง จากนั้นชั่งให้ได้ปริมาณ 219.5 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร โดยดูดสารละลายมาตรฐานมาปริมาตร 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิลิตร หรือความเข้มข้นของสารละลายไดโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ 0, 8.78, 17.56, 26.34, 35.12, และ 43.90 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปิเปตตัวอย่างมา 35 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร เติมสารละลายแวนาเดทโมลิบเดท 10 มิลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ระยะเวลา 10 นาที กลายเป็นสารละลายสีเหลือง

(5) ขั้นตอนการวิเคราห์ปริมาตรฟอสฟอรัส

นำตัวอย่าง และสารละลายมาตราฐานฟอสเฟตไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer)ที่ 490 นาโนเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่าฟอสฟอรัส

3.7.5 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันโดย FT-IR (Fourier transform infrared)

ในการวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันสารสกัดหยาบ เพื่อป้องกันผลที่รบกวนจากลิกนินจึงชะสารสกัดหยาบด้วยคลอโรฟอร์ม 2 รอบ อบให้แห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์ เพื่อแยกลิกนินออกจากตัวอย่าง จะวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX โดยมีรายละเอียดเครื่อง FT-IR ดังนี้ ระบบแสง ตัวเครื่องมีระบบปิด (Sealed) ภายในมีสารดูดความชื้น (Desiccated) เพื่อป้องกันความชื้นไปทำลายระบบออฟติก, แหล่งกำเนิดแสง (source) เป็นTemperature stabilized Mid/Far IR range 10000-30 cm-1,กระจกแบ่งแสง (Beam splitter) เป็นชนิด Optimized KBr (7000-370 cm-1), ตัวรับแสง (Detector) เป็น DTGS Mid -IR (KBr) and DTGS Far-IR,อัตราสัญญาณเสียงต่อคลื่นรบกวน 36,000 / 1 Peak to peak(1min meas., 4 cm-1 resolution), ค่าความละเอียดในการแยกพีก คือ 0.3 cm-1, ความเร็ว OPD คือ ตัวแปรต่อเนื่องระหว่าง0.05 และ 5.0 cm/s, ซอฟท์แวร์ เป็น Windows Base including โดยวัดในช่วงสเปกตรัม 4000-400 ต่อเซนติเมตร ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

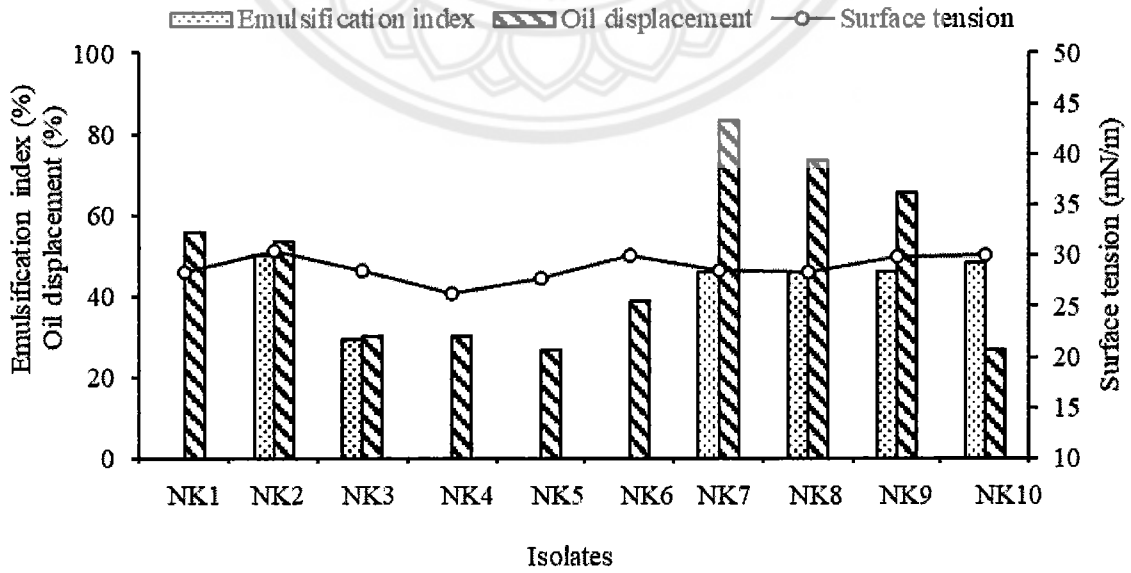
3.8 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในการทดลองใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้เพื่อลดต้นทุนการผลิต งานวิจัยนี้จะศึกษารูปแบบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพก่อนนำไปใช้งาน โดยหลังจากที่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวและวิธีการผลิตที่เหมาะสมได้แล้ว ผู้วิจัยจะศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการบำบัดไขมันในน้ำเสียโรงงานกลั่นน้ำมันรำข้าว ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

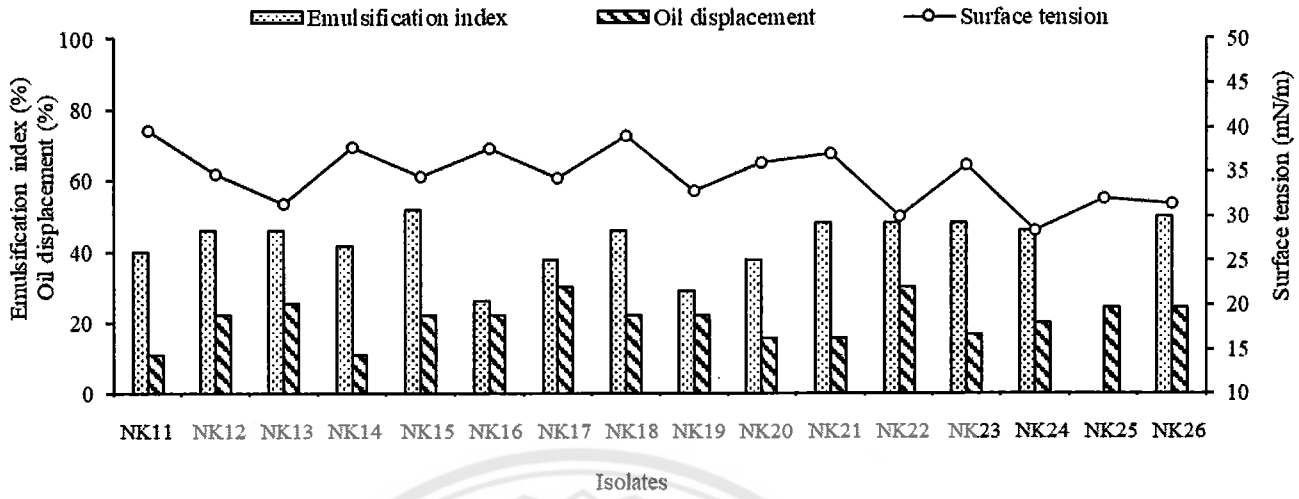
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียซอบด่างผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

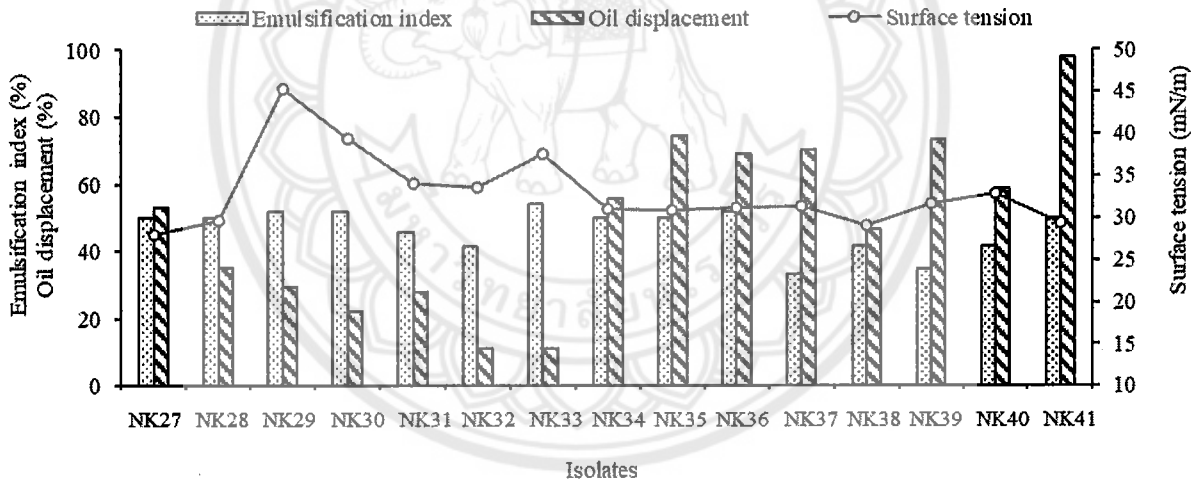
จากการคัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินปนเปื้อนของเสียจากการผลิตน้ำมันรำข้าวได้ทั้งหมด 99 ไอโซเลท โดยพบว่า 41 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียซอบด่าง โดยสามารถลดแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 45 mN/m ค่าการเกิดอิมัลชัน 25.9-54.2 % ค่าการกระจายน้ำมัน 11.1-83.3 % (ภาพ 13-15) โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเจริญเติบโตได้ดี เมื่อใช้น้ำมันรำข้าวหยาบ แวกซ์ และไขสบู่ คือ NK8 NK22 และ NK41 ตามลำดับ Jain และคณะ (2012) คัดแยกแบคทีเรียซอบด่าง *Cronobacter sakazakii* RJ-06 ที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ 46.1 mN/m ซึ่งได้ต่ำกว่างานวิจัยนี้ เมื่อนำน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อจากทั้ง 3 ไอโซเลทไปหาค่า Critical micelle dilution (CMD) พบว่า NK8 NK22 และ NK41 มีค่า CMD เท่ากับ 18.5 6.0 และ 23.0 เท่า ตามลำดับ (ภาพ 16) จากนั้นจึงนำไประบุสายพันธุ์แล้วพบว่าเป็น *Brevibacterium casei* (Strain NK8), *Microbacterium paraoxydans* (Strain NK22) and *Pseudomonas mendocina* (Strain NK41). อย่างไรก็ตาม *Pseudomonas mendocina* NK41 อยู่ในรายชื่อ พรบ.เชื้อโรคและพิษจากสัตว์ จึงได้เลือก *Brevibacterium casei* NK8 เป็นแบคทีเรียซอบด่างผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับการทดลองต่อไป



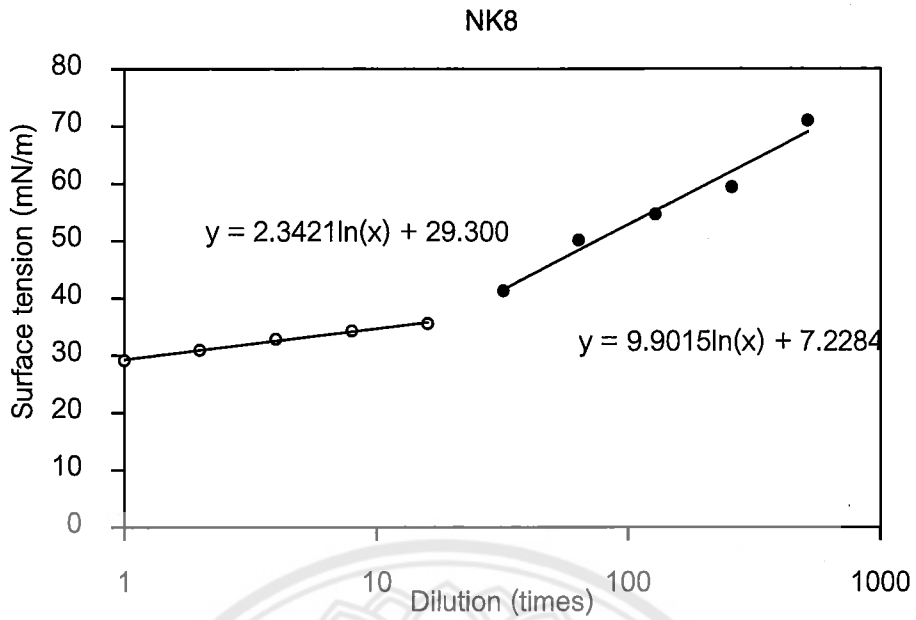
ภาพ 13 แสดงค่าแรงตึงผิว การกระจายน้ำมัน และการเกิดอิมัลชัน ของน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อจากไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้ เมื่อใช้น้ำมันรำข้าวหยาบ 1% เป็นสารตั้งต้น

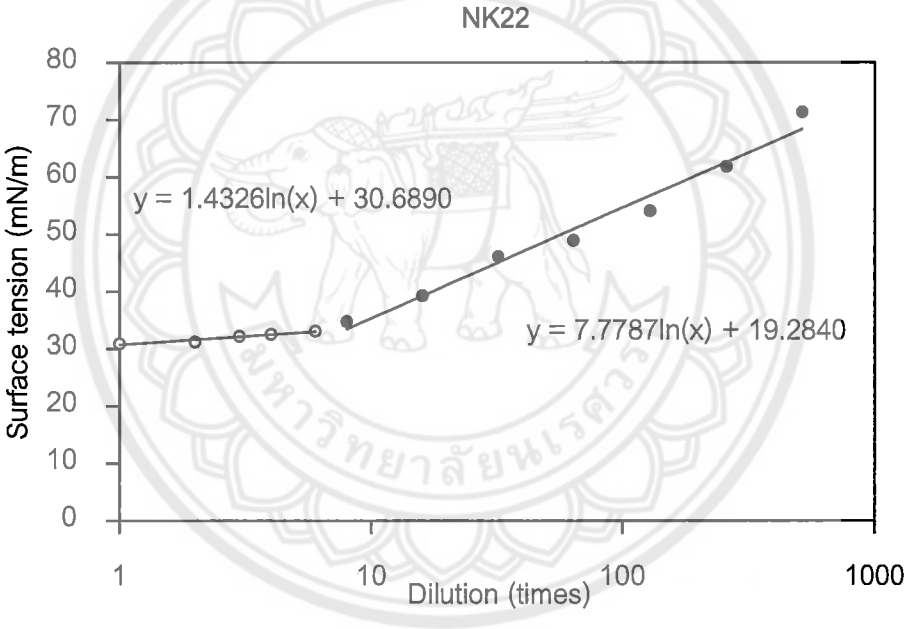


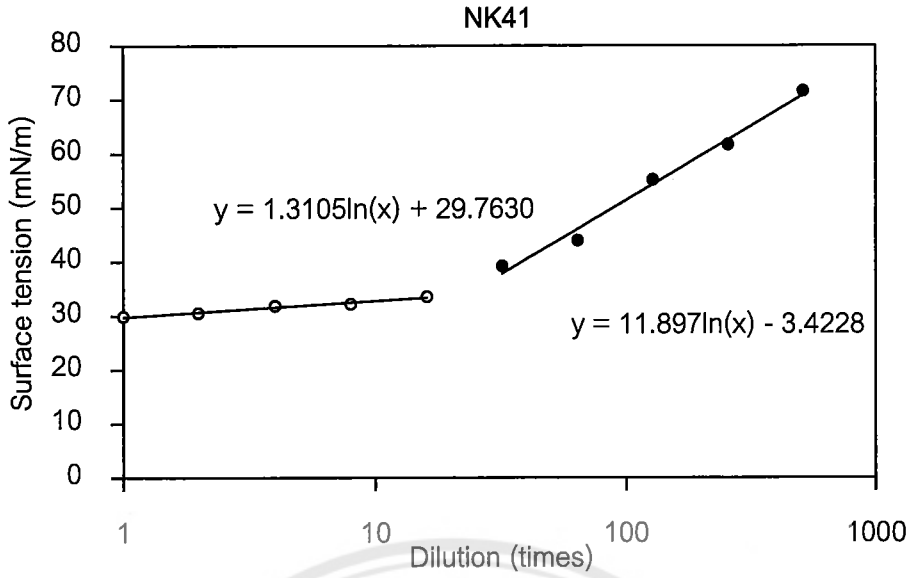
ภาพ 14 แสดงค่าแรงตึงผิว การกระจายน้ำมัน และการเกิดอิมัลชัน ของน้ำเลี้ยงปลอดเซื้อจากไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้ เมื่อใช้แวกซ์ 1% เป็นสารตั้งต้น



ภาพ 15 แสดงค่าแรงตึงผิว การกระจายน้ำมัน และการเกิดอิมัลชัน ของน้ำเลี้ยงปลอดเซื้อจากไอโซเลทต่างๆ ที่คัดแยกได้ เมื่อใช้ไขสบู่ 1% เป็นสารตั้งต้น


NK8
Surface tension (mN/m)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
y = 2.3421ln(x) + 29.300
y = 9.9015ln(x) + 7.2284
1
10
100
1000
Dilution (times)

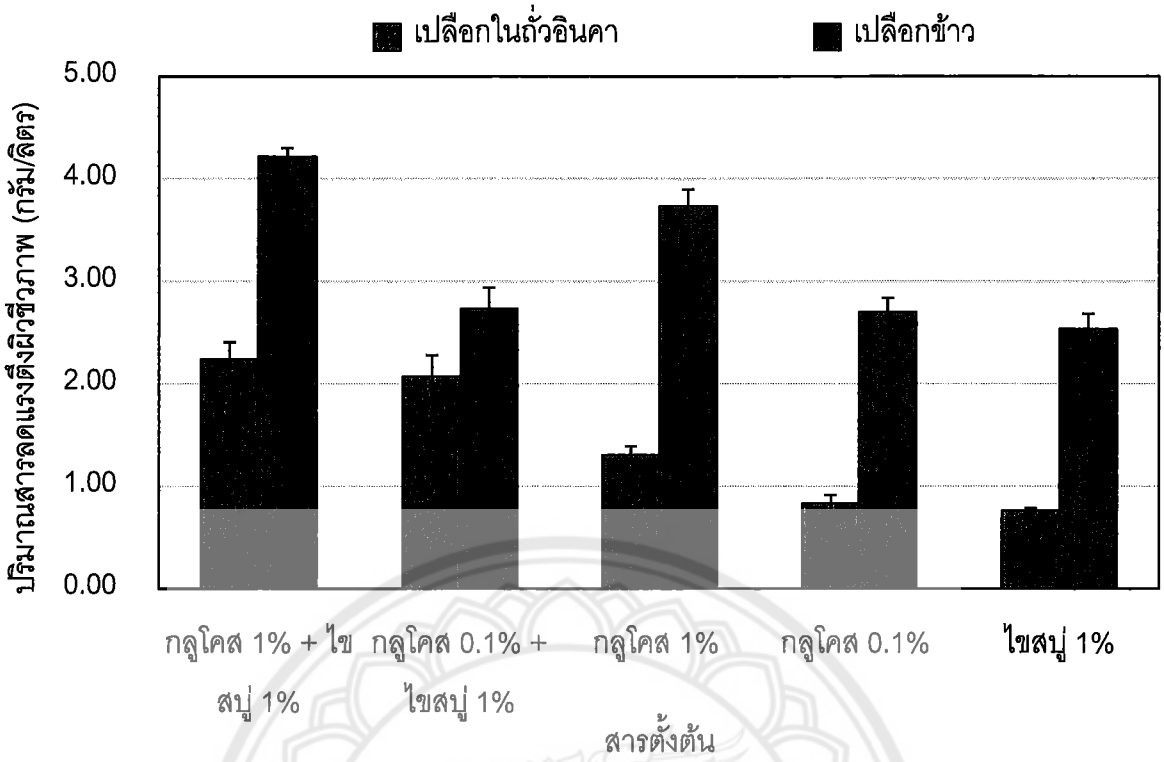

NK22
Surface tension (mN/m)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
y = 1.4326ln(x) + 30.6890
y = 7.7787ln(x) + 19.2840
1
10
100
1000
Dilution (times)



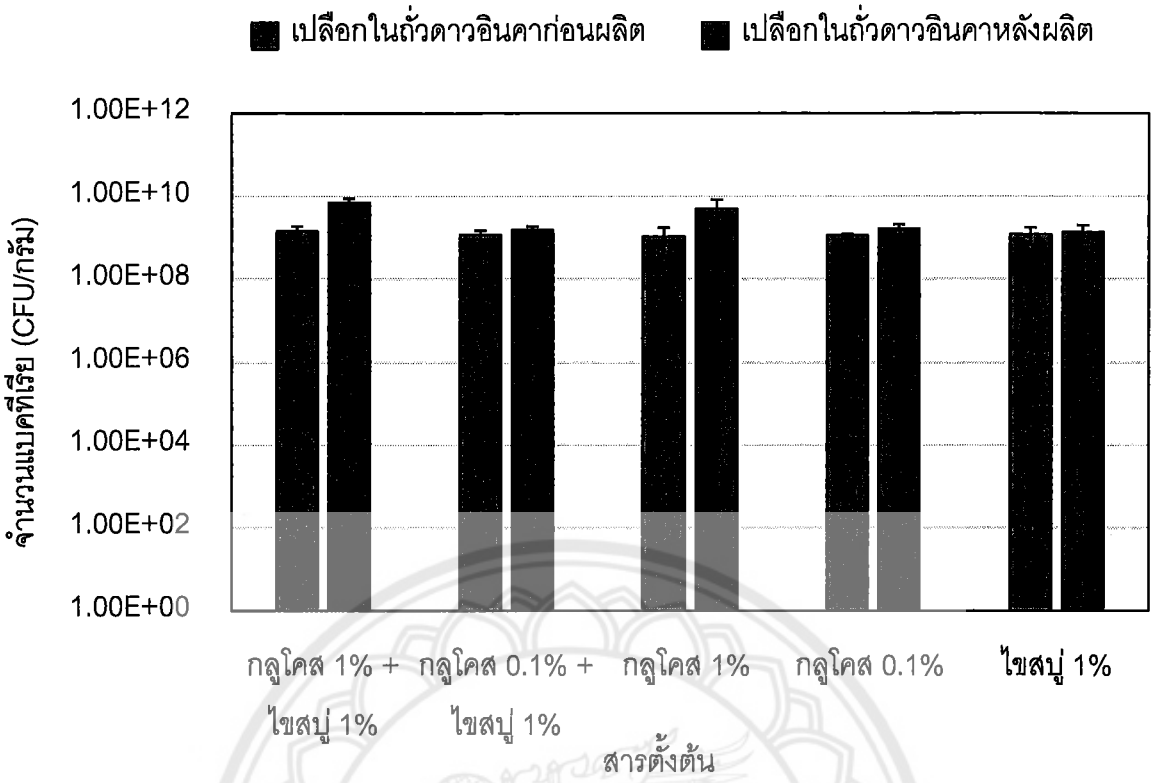
ภาพ 16 แสดงการหาค่า Critical micelle dilution (CMD) **โดยวัดค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อข**องไอโซเลท NK8 NK22 NK41**ที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ เมื่อใช้ของเสียจากการกลั่นน้ำ**มันรำข้าว 1% **เป็นสารตั้งต้น**

4.2 การศึกษาผลของสารตั้งต้นและวัสดุตรึงต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเซลล์ตรึง

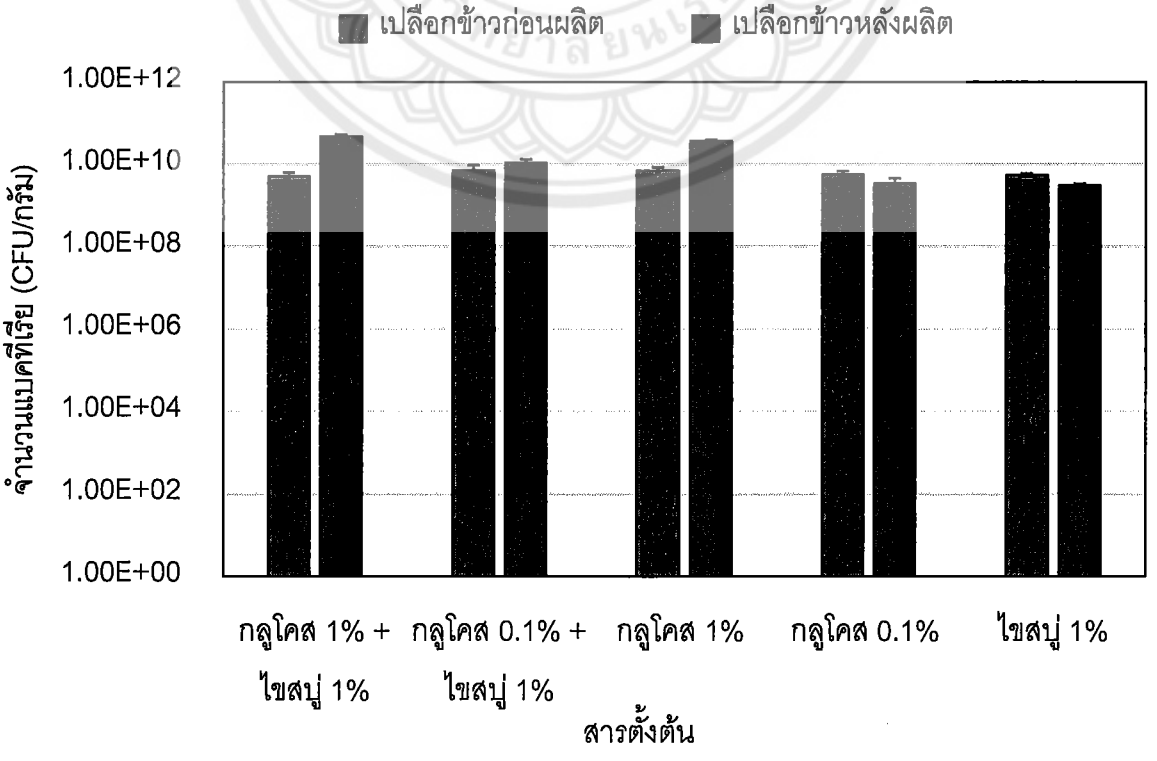
เปลือกในถั่วดาวอินคาและเปลือกข้าวถูกนำมาทดลองใช้เป็นวัสดุตรึง *Brevibacterium casei NK8* ส่วนไขสบู่ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กลูโคสใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อสนับการเจริญของแบคทีเรีย จากผลการทดลองพบว่าเปลือกข้าวเป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์โดยสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากกว่าเปลือกในถั่วดาวอินคาถึง การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบได้มากที่สุดจากการใช้ไขสบู่ร่วมกับกลูโคสเป็นสารตั้งต้น (ภาพ 17) ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียในเซลล์ตรึงโดยเมื่อเติมกลูโคสจะช่วยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในเซลล์ตรึง ส่งผลให้สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากขึ้น ((ภาพ 18-19)



ภาพ 17 แสดงผลของไขสบู่และกลูโคสต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Brevibacterium casei* NK8 ตรึงบนเปลือกในถั่วดาวอินคาและเปลือกข้าว ระยะเวลาตรึงเซลล์ 3 วัน ระยะเวลาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%



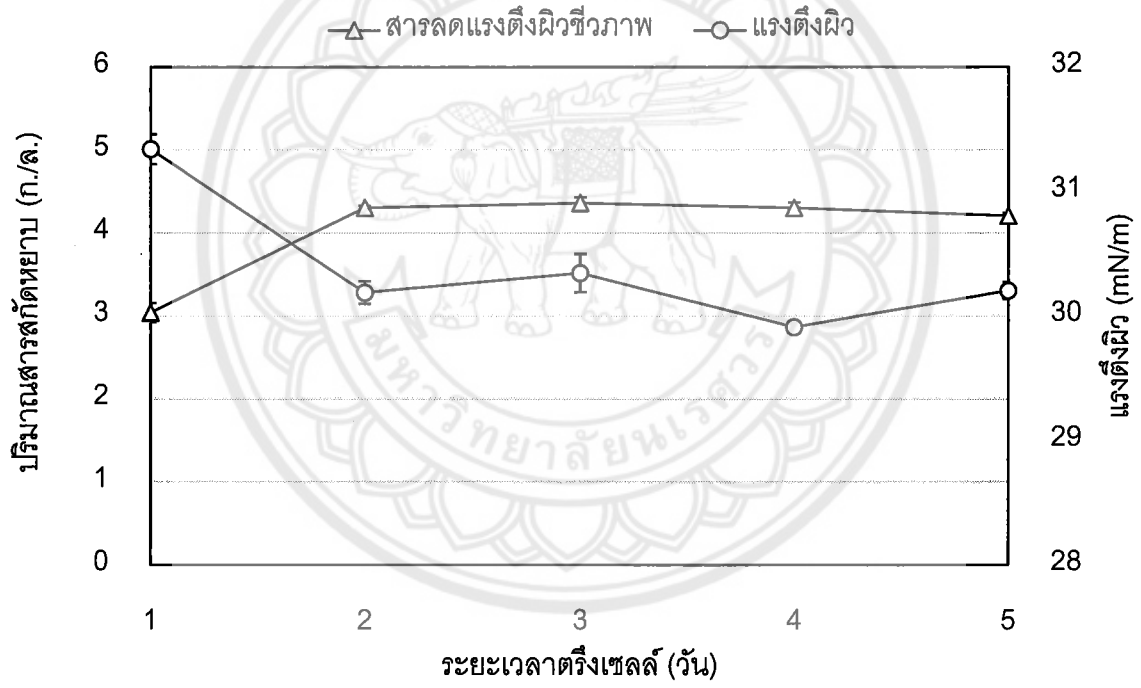
ภาพ 18 แสดงผลของไขสบู่และกลูโคสต่อจำนวน *Brevibacterium casei* NK8 ตรึงบนเปลือกในถั่วดาวอินคา ระยะเวลาตรึงเซลล์ 3 วัน ระยะเวลาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%



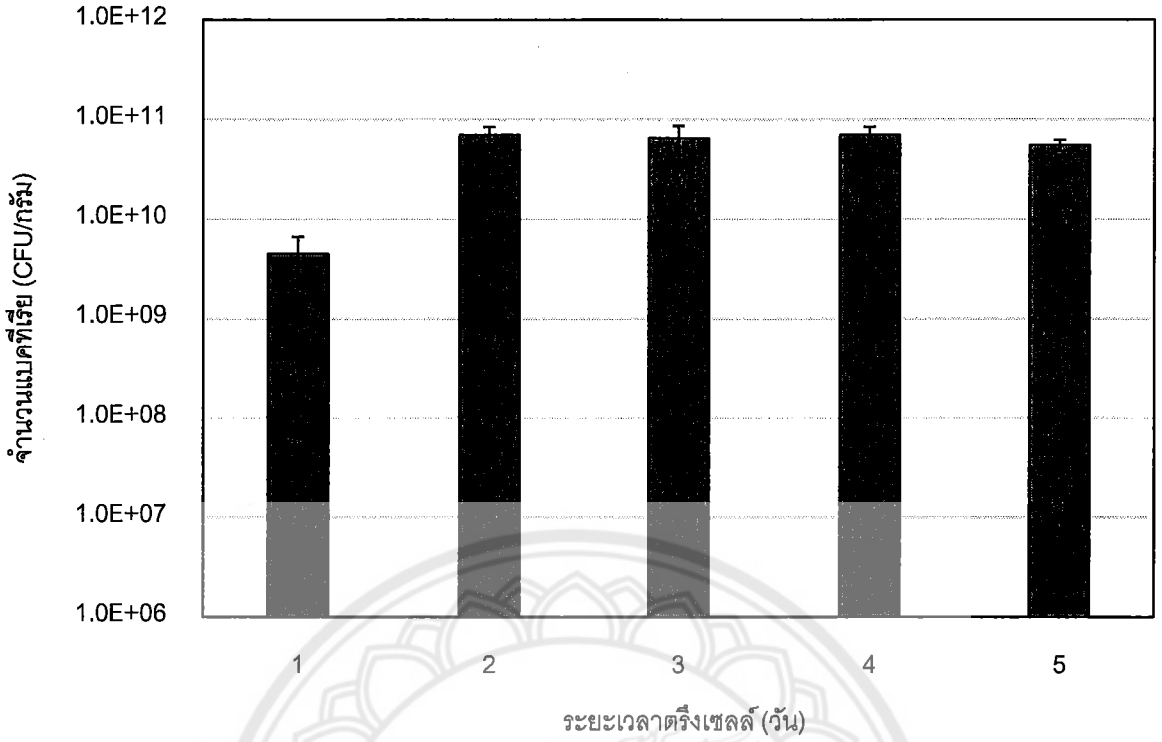
ภาพ 19 แสดงผลของไขสบู่และกลูโคสต่อจำนวน *Brevibacterium casei* NK8 ตรึงบนเปลือกข้าว ระยะเวลาตรึงเซลล์ 3 วัน ระยะเวลาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%

4.3 การศึกษาหาระยะเวลาตรึงเซลล์ที่เหมาะสม

การศึกษาหาระยะเวลาตรึงเซลล์ที่เหมาะสมเป็นการหาระยะเวลาสั้นที่สุดที่สามารถตรึงเซลล์ *Brevibacterium casei NK8* บนเปลือกข้าวและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด เพื่อให้ต้นทุนและระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่ำที่สุด โดยพบว่าระยะเวลาตรึงเซลล์ 2 วัน เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด (ภาพ 20) ซึ่งสอดคล้องกับจำนวน *Brevibacterium casei NK8* ที่ตรึงบนเปลือกข้าว ที่เริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 ของการตรึงเซลล์ (ภาพ 21)



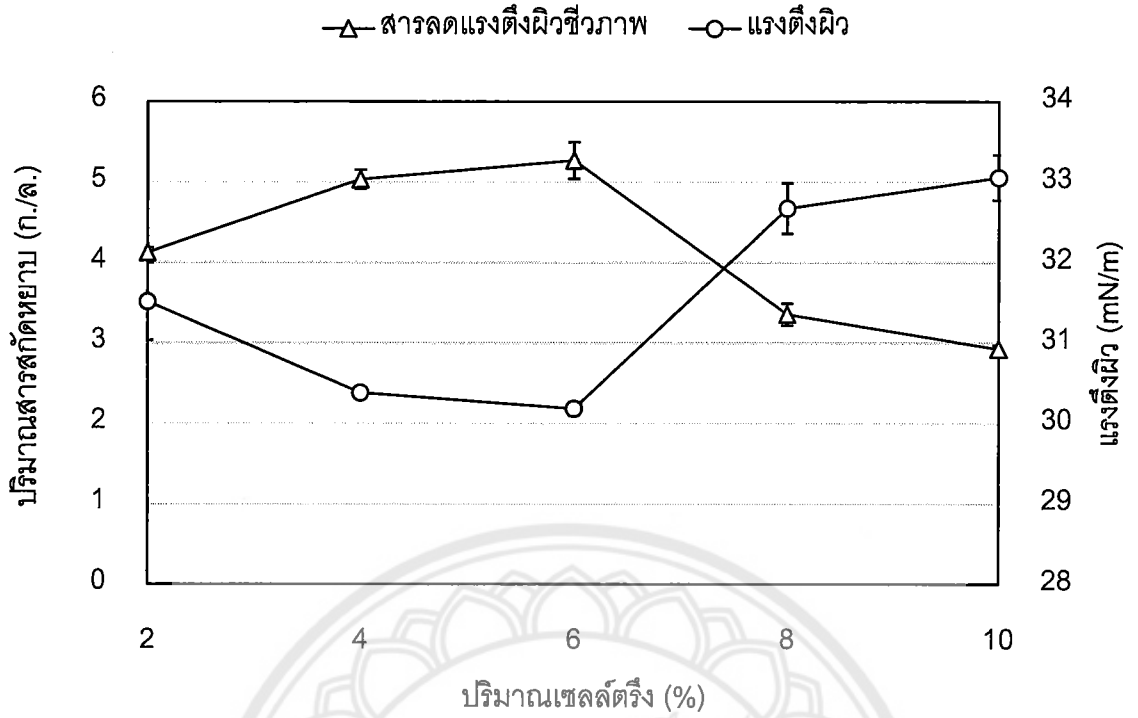
ภาพ 20 แสดงผลของระยะเวลาตรึงเซลล์ *Brevibacterium casei* NK8 บนเปลือกข้าว ต่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าแรงตึงผิว ระยะเวลาผลิต 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%



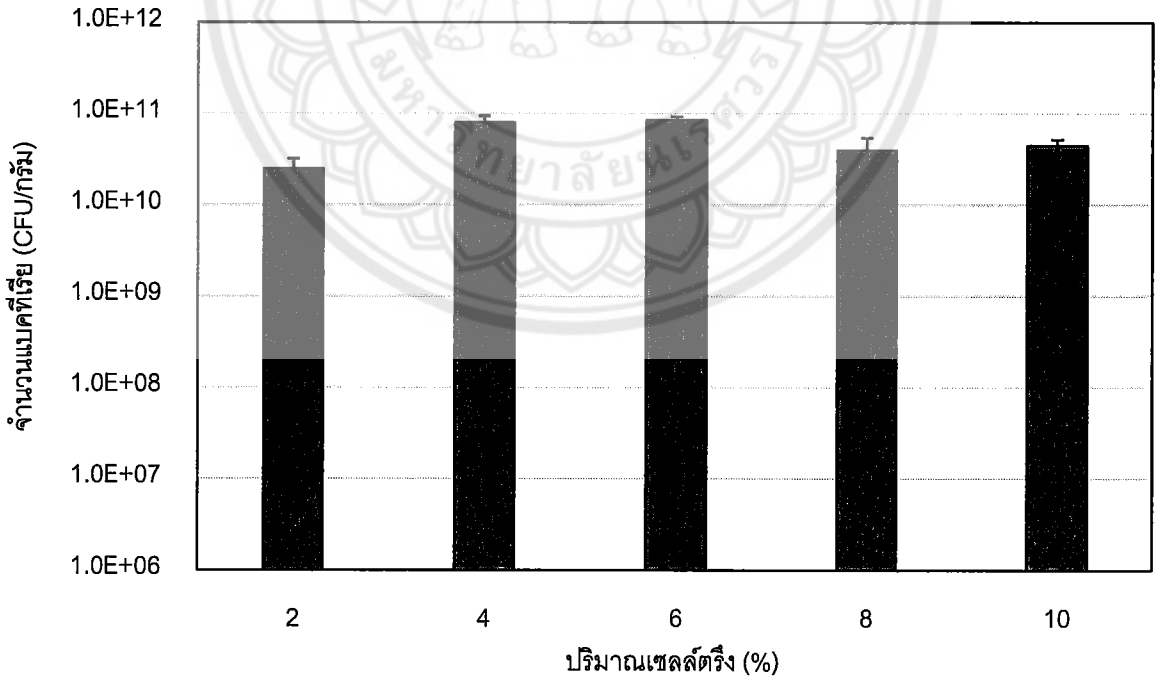
ภาพ 21 แสดงผลของระยะเวลาตรึงเซลล์ *Brevibacterium casei* NK8 บนเปลือกข้าว ต่อจำนวนแบคทีเรียบนเซลล์ตรึง ระยะเวลาผลิต 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%

4.4 การศึกษาหาปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสม

ปริมาณเซลล์ตรึงที่มากเกินไปจะส่งผลลดการถ่ายเทมวลสารระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ตรึง ส่วนปริมาณเซลล์ตรึงที่น้อยเกินไปจะทำให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้น้อยลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาหาปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสม โดยพบว่าปริมาณเซลล์ตรึง 6% เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุดและลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุด (ภาพ 22) และในระหว่างการผลิตจะพบว่าจำนวนแบคทีเรียบนเซลล์ตรึงที่ 4 และ 6% จะมีแนวโน้มเพิ่มจำนวนมากขึ้น (ภาพ 23)



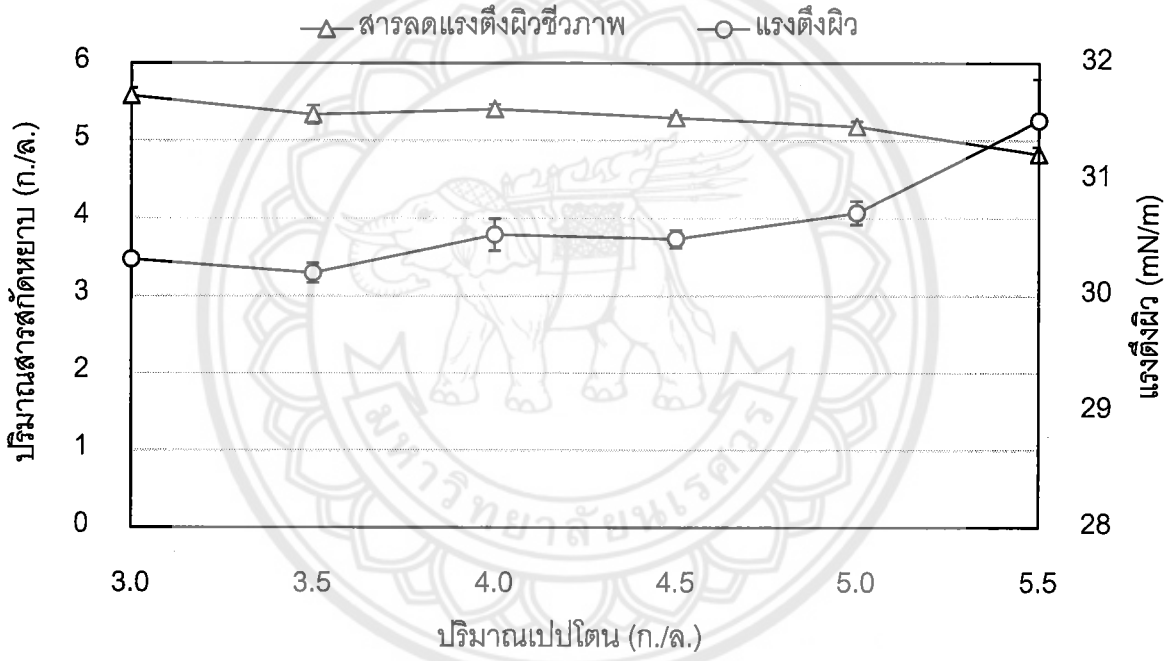
ภาพ 22 แสดงผลของปริมาณเซลล์ตรึง *Brevibacterium casei* NK8 บนเปลือกข้าว ต่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าแรงตึงผิว ระยะเวลาผลิต 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%



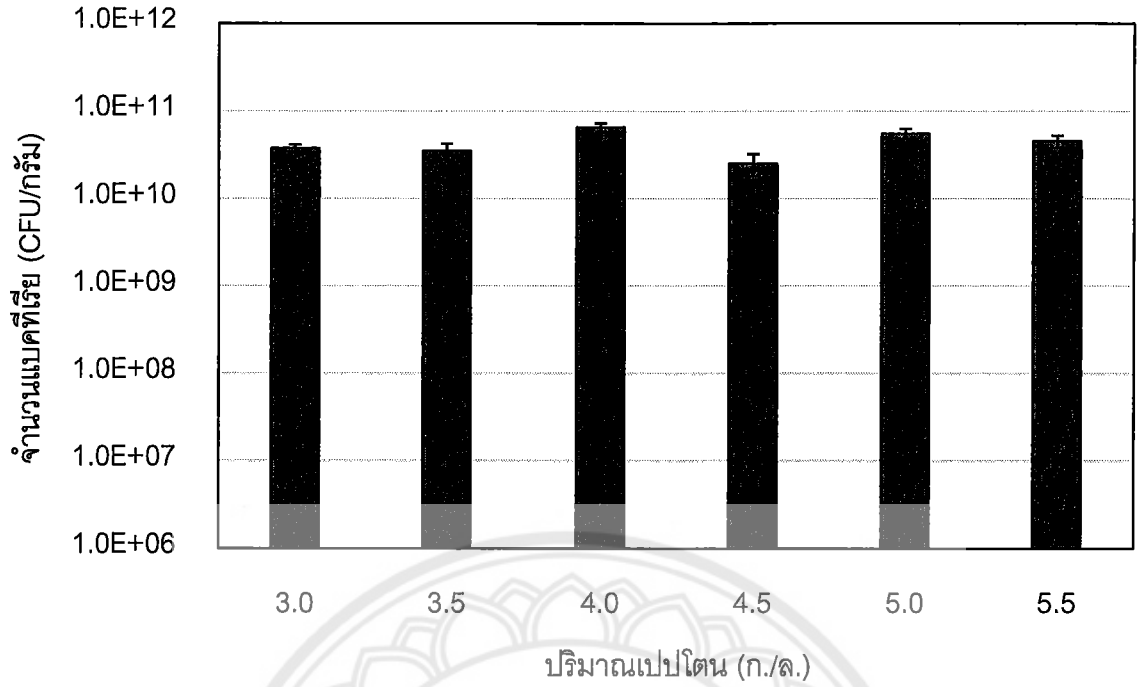
ภาพ 23 แสดงผลของปริมาณเซลล์ตรึงของ *Brevibacterium casei* NK8 บนเปลือกข้าว ต่อจำนวนแบคทีเรียบนเซลล์ตรึง ระยะเวลาผลิต 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%

4.5 การศึกษาหาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสม

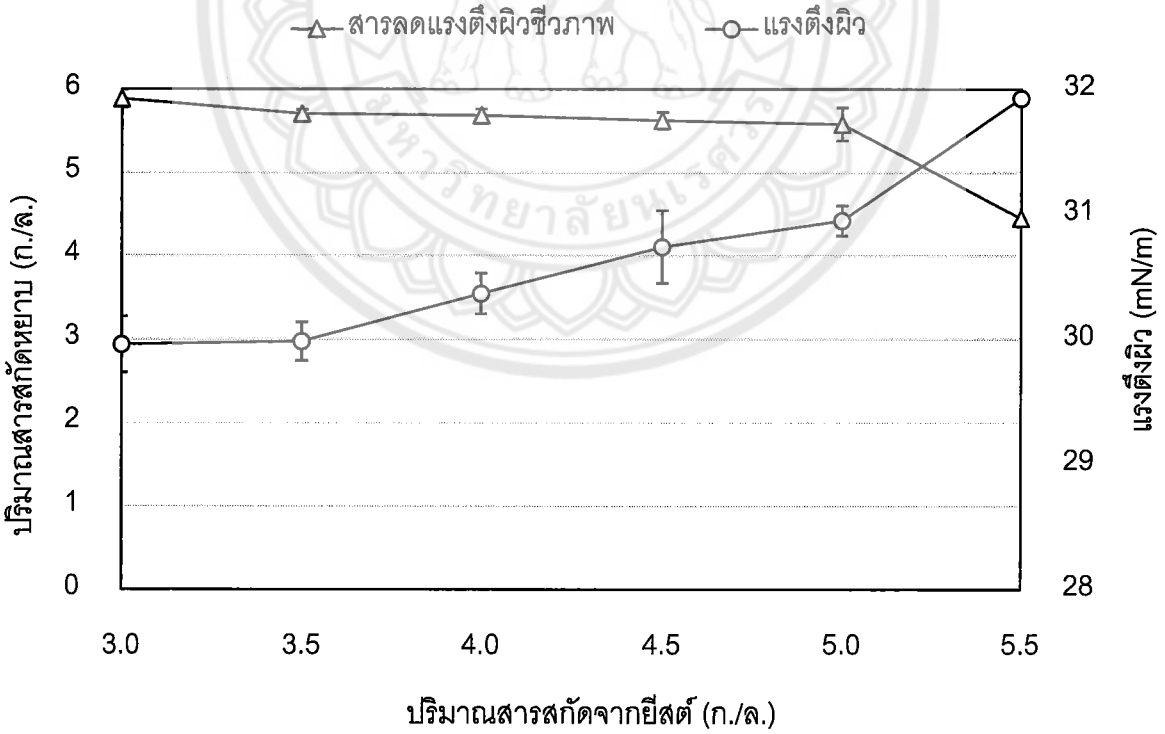
ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงไม่ควรสูงเกินไปจนทำให้แบคทีเรียไม่ต้องการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ทำให้งานวิจัยนี้ศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HM คือ เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ ที่เหมาะสม คือ 3.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพ 24 และ 26) โดยปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มากที่สุดคือ 5.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่างานวิจัยอื่นๆ (ตาราง 3) ส่วนค่าแรงตึงผิวที่ต่ำสุดที่ได้ คือ 28.3 mN/m ส่วนจำนวนแบคทีเรียในเซลล์ตรึงไม่เปลี่ยนแปลงมากนักเนื่องจากแหล่งไนโตรเจนไม่ได้ส่งผลเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอย่างชัดเจนแต่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ภาพ 25 และ 27)



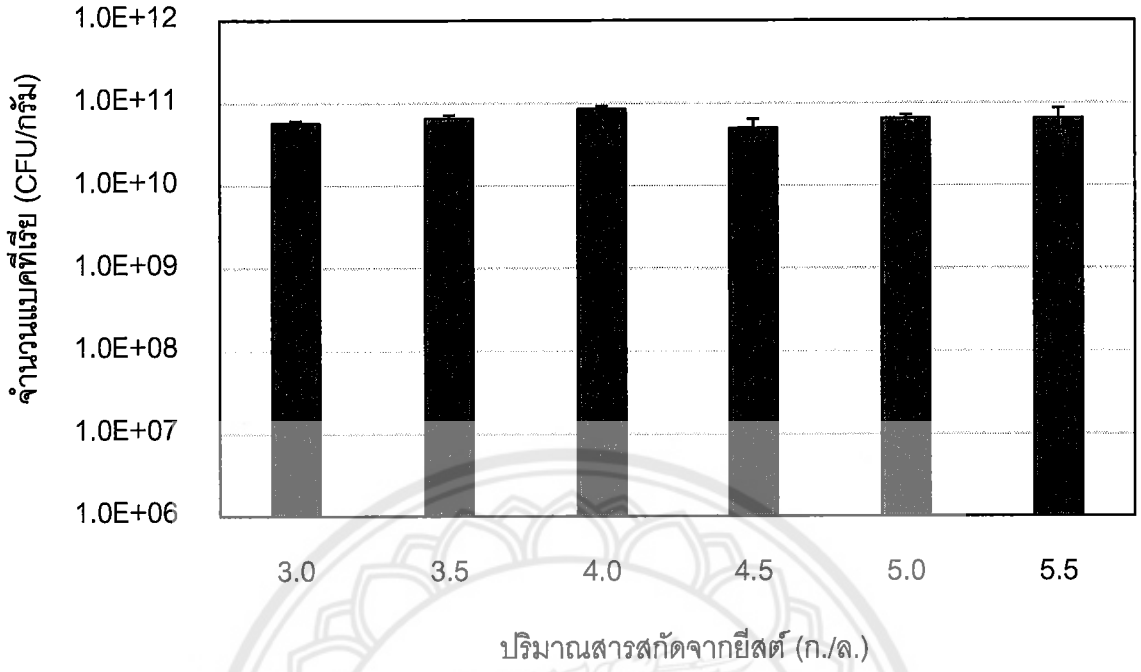
ภาพ 24 แสดงผลของปริมาณเปปโตนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Brevibacterium casei* NK8 ตรึงบนเปลือกข้าวและค่าแรงตึงผิว ระยะเวลาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีภาพ 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%



ภาพ 25 แสดงผลของปริมาณเปปโตนต่อจำนวน *Brevibacterium casei* NK8 บนเปลือกข้าว ระยะเวลาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีภาพ 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%



ภาพ 26 แสดงผลของปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Brevibacterium casei* NK8 ตรึงบนเปลือกข้าวและค่าแรงตึงผิว ระยะเวลาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีภาพ 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%



ภาพ 27 แสดงผลของปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อจำนวน *Brevibacterium casei* NK8 บนเปลือกข้าว ระยะเวลาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีภาพ 3 วัน ปริมาณเซลล์ตรึง 2%

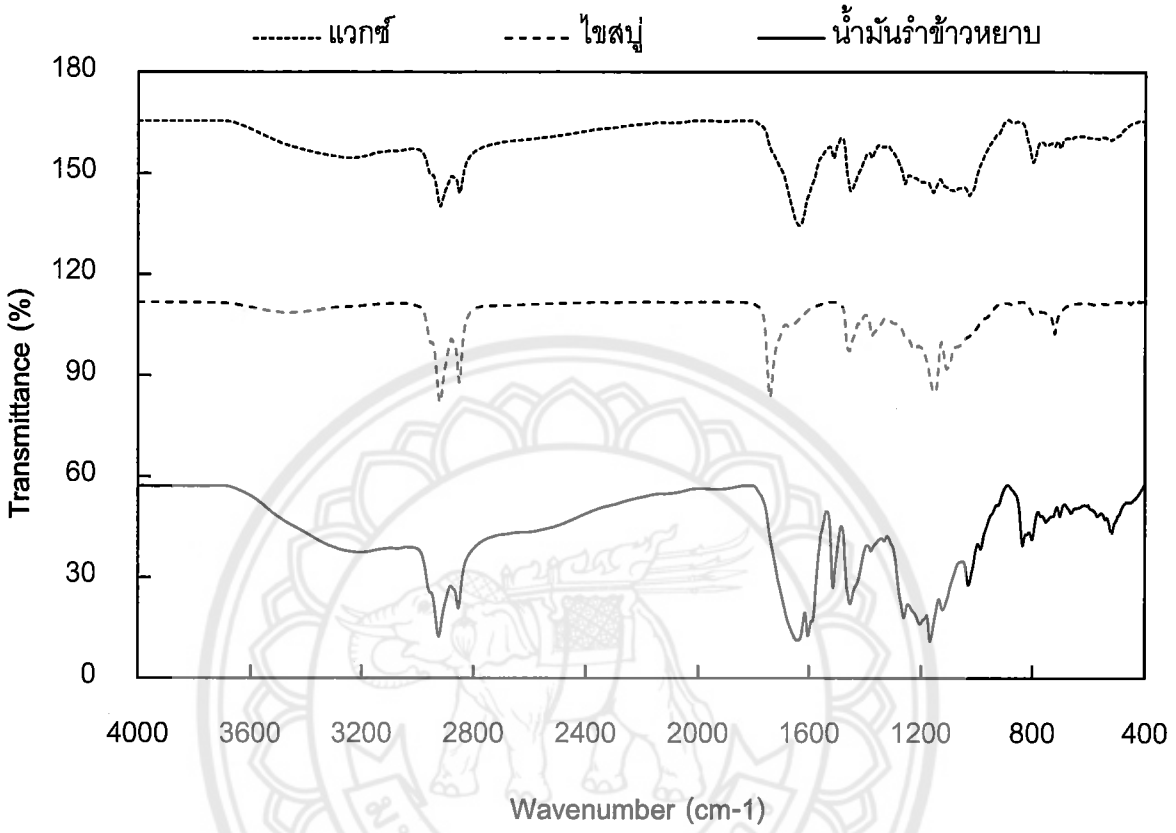
ตาราง 3 แสดงตัวอย่างแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้น้ำมันพืชและของเสียจากการผลิตน้ำมันพืชเป็นสารตั้งต้น

แบคทีเรีย	สารตั้งต้น	ชนิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Brevibacterium casei NK8	ไขสบู่	ฟอสโฟลิพิด	5.9	งานวิจัยนี้
Bacillus pseudomycoides BS6	ของเสียจากการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง	ลิโพเปปไทด์	2.1	Li et al. (2016)
Bacillus subtilis SK320	น้ำมันมะกอก	ลิโพเปปไทด์	1.25	Sekhon et al. (2011)
Lactobacillus delbrueckii	กากน้ำมันถั่วลิสง	ไกลโคลิพิด	1.07	Thavasi et al. (2011)
Corynebacterium kutscheri	กากน้ำมันถั่วลิสง	ไกลโคลิโพเปปไทด์	3.4	Thavasi et al. (2007)

4.6 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น

สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Brevibacterium casei* NK8 เมื่อตรึงบนเปลือกข้าว จะนำมาเปรียบเทียบผลของชนิดสารตั้งต้นที่เป็นของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าวเป็นสารตั้งต้น (น้ำมันรำข้าวหยาบ แวกซ์ และไขสบู่) จากผลการทดลองพบว่าชนิดสารตั้งต้นที่เป็นของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าวไม่ได้ส่งผลต่อชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้เพียงแค่ส่งผลต่อสัดส่วนของน้ำตาล (7.9-9.6%) โปรตีน (0.3-0.8%) ไขมัน (46.6-58.3%) และฟอสเฟต (5.1-7.4%) ในสารสกัดหยาบ จากการวิเคราะห์หมู่ฟังชั้นโดย FTIR พบว่ามี aliphatic C-H of fatty acid chains (2922-2850 cm^{-1}), C=O of ester (1636-1600 cm^{-1}) and C–N of choline (1512-1500 cm^{-1} and 1450-1428 cm^{-1}), asymmetric

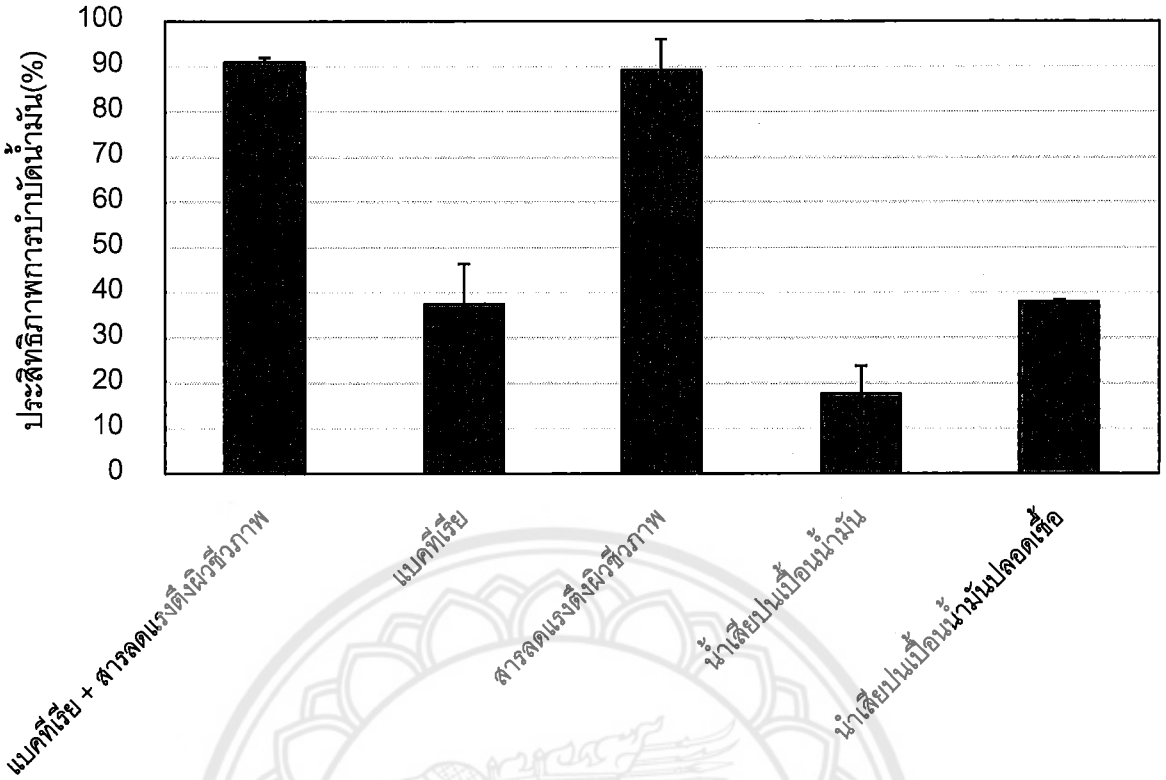
PO_2^- (1260-1204 cm^{-1}), symmetric PO_2^- (1166-1008 cm^{-1}) และ P–O (816-798) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Brevibacterium casei* NK8 เป็นชนิดฟอสโฟลิพิด



ภาพ 28 แสดงผล FTIR ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Brevibacterium casei* NK8 เมื่อใช้ของเสียจากการผลิตน้ำมันรำข้าวร่วมกับกลูโคสเป็นสารตั้งต้น

4.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันและน้ำมันโดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อทดลองนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในรูปแบบน้ำเลี้ยงปลอดเชื้อของ *Brevibacterium casei* NK8 ไปเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียปนเปื้อนไขมันและน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวโดยแบคทีเรียย่อนสลายไขมัน คือ *Bacillus* sp. PO1 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันไปมากขึ้นจาก 38% เป็น 91% (ภาพ 29)



ภาพ 29 แสดงประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียปนเปื้อนน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวโดยใช้แบคทีเรียย่อยสลายน้ำมัน *Bacillus* sp. PO1 **ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (น้ำเลี้ยงปลอดเชื้อจาก** *Brevibacterium casei* NK8 5.5%) **ระยะเวลาการบำบัด** 7 **วัน**

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. คัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินปนเปื้อนของเสียจากการผลิตน้ำมันรำข้าวได้ทั้งหมด 99 ไอโซเลท โดยพบว่า 41 โซเลท เป็นแบคทีเรียชอบด่าง

2. นำแบคทีเรียชอบด่างมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคมีประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ *Brevibacterium casei* NK8

3. ของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าวที่นำมาทดสอบเป็นสารตั้งต้น ได้แก่ น้ำมันรำข้าวหยาบ แวกซ์ และไขสบู่ พบว่า *Brevibacterium casei* NK8 สามารถใช้ไขสบู่แล้วผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดี

4. ปริมาณเปปโตนที่เหมาะสม คือ 3 กรัมต่อลิตร ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม คือ 3 กรัมต่อลิตร

5. วัสดุตรึงที่เหมาะสม คือ เปลือกข้าว

6. ระยะเวลาตรึงที่เหมาะสม คือ 2 วัน

7. ปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสม คือ 6%

8. ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สูงสุด คือ 5.9 กรัมต่อลิตร

9. จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและ FTIR ของสารสกัดหยาบจาก *Brevibacterium casei* NK8 คาดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้อยู่ในกลุ่มของฟอสโฟลิพิด

10. ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ได้ คือ 28.3 mN/m

11. การกระจายน้ำมันรำข้าวที่ได้ คือ 73.3%

12. การเกิดอิมัลชันกับบน้ำมันรำข้าวที่ได้ คือ 45.8%

13. ค่า Critical micelle dilution ที่ได้ คือ 18.5 เท่า

14. จากการทดสอบการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียพบว่าเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันได้สูงกว่าระบบบำบัดปกติจาก 38% เป็น 89%

บรรณานุกรม

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabia, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens. **Desalination**, 223(1–3), 143-151.

Bastawde, K.B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action. **World journal of microbiol and biotechnol**, 8, 355-368.

Biswas, R., Uellendahl, H. and Ahring, B.K. (2015). Wet Explosion: a Universal and Efficient Pretreatment Process for Lignocellulosic. **Biorefineries bio-energy research**, 8, 1101–1116.

Bodour, A.A., and Miller-Maier, R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal** of microbiological methods, 32, 273-280.

Cameron, D.R., Cooper, D.G. and Neufeld, R.J. (1988). The mannoprotein of Saccharomyces cerevisiae is an effective bioemulsifier. **Applied and environmental microbiology**, 54(6), 1420–1425.

Chandra, R., Takeuchi, H. and Hasegawa, T. (2012). Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: a review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and sustainable energy reviews**, 16(3), 1462–1476.

Chen, X., Yu, J., Zhang, Z. and Lu, C. (2011). Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibres from rice straw. **Carbohydrate polymers**, 85, 245–50.

Desai, J.D. And Banat I.M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, 61(1), 47–64.

Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application. **Trends in biotechnology**, 208-217.

Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P. (1990). **Microbial and enzymatic degardation of wood and wood component**. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG.

Horikoshi, K. (1999) Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, 63, 735-750.

Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P. and Angelidaki, I. (2009). Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a bio refinery concept. **Bioresource technology**, 100(9), 2562–2568.

Kulkarni, S., Dhakar, K. and Joshi, A. (2019). **Microbial Diversity in the Genomic Era.** Academic Press is an imprint of Elsevier

Kumari, D. and Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. **Renewable and sustainable energy Reviews**, 90, 877–891.

Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V. and Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. **Fuel processing technology**, 199, 106244.

Lang, S. and Wullbrandt, D. (1999). Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied microbiology and biotechnology**, 51, 22-32.

Lee, J.S., Parameswaran, B., Lee, J.P. and Park, S.C. (2008). Recent developments of key technologies on cellulosic ethanol production. **Journal of scientific and industrial research,** 67(11), 865-873.

Jain R.M., Mody, K., Mishra, A. and Jha, B. (2012). Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. **Carbohydrate polymers,** 87, 2320– 2326.

Jain R.M., Mody, K. and Joshi, N., Mishra, A. and Jha, B. (2013). Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. **Colloids and surfaces B: biointerfaces,** 108, 199–204.

Marcelino, P.R.F., Peres, G.F.D., Terán-Hilares, R., Pagnocca, F.C., Rosa, C.A., Lacerda, T.M., dos Santosa J.C. and da Silvaa, S.S. (2019). Biosurfactants production by yeasts using

sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial crops & products**, 129, 212–223.

Migahed, M.A., Attya, M.M., Rashwan, S.M., Abd El-Raouf, M. and Al-Sabagh, A.M. (2013). Synthesis of some novel non-ionic surfactants based on tolyltriazole and evaluation their performance as corrosion inhibitors for carbon steel. **Egyptian journal of petroleum**, 22(1), 149-160.

Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y. and Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. **Journal bacteriology**, 175(20), 6459–6466.

Nigam, P.S., Gupta, N. and Anthwal, A. (2009) **Biotechnology for agro-industrial residues utilization**. Springer Science+Business Media B.V.

Mahvi, A.H., Maleki, A. and Eslami, A. (2004). Potential of rice husk and rice husk ash for phenol removal in aqueous systems. **American journal of applied sciences**, 1(4), 321–6.

Romaní, A., Tomaz, P.D., Garrote, G., Teixeira J.A. and Domingues, L. (2016). Combined alkali and hydrothermal pretreatments for oat straw valorization within a biorefinery concept. **Bioresource technology**, 220, 323–332.

Rosenberg, E. and Ron, E. Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, 52, 154-162.

Saha, B.C. and Cotta, M.A. (2006). Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. **Biotechnology progress**, 22(2), 449–453.

Stanmore, B.R. (2010). Generation of energy from sugarcane bagasse by thermal treatment. **Waste and biomass valorization**, 1(1), 77-89.

Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. and Fredrickson, H.L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and environmental microbiology**, 61(5), 1706-13.

Youssef, N.H, Dunean, K.E., and Melnerney, M.J (2005). Importance of 3-Hydroxy Fatty Acid Composition of Lipopeptides for Biosurfactant Activity. **Applied environment microbiology**, 71(12), 7690–7695.

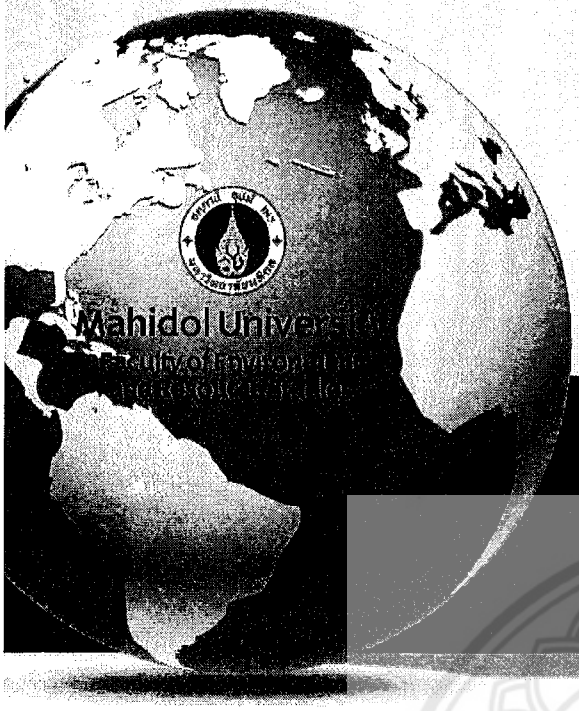
ภาคผนวก ก
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และผลที่ได้รับ

ตาราง 4 แสดงการเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และผลที่ได้รับ

วัตถุประสงค์/กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ทำได้จริง
1. คัดแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้	1.1 คัดแยกแบคทีเรียผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินปนเปื้อนของเสียจากการผลิตน้ำมันรำข้าวได้ทั้งหมด 99 isolates โดยพบว่า 41 isolates เป็นแบคทีเรียทนด่าง 1.2 นำแบคทีเรียทนด่างมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคมีประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ *Brevibacterium casei* NK8
2. คัดเลือกสารตั้งต้นจากกระบวนการกลั่นน้ำมันรำข้าวที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	2.1 ของเสียและสารตั้งต้นจากการกลั่นน้ำมันรำข้าวที่นำมาทดสอบ ได้แก่ น้ำมันรำข้าวหยาบ แวกซ์และไขสบู่ พบว่า *Brevibacterium casei* NK8 สามารถใช้ไขสบู่แล้วผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้สูงที่สุด
3. ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	3.1 สูตรอาหารที่เหมาะสม ประกอบด้วย เปปโตน 3 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัม K_2HPO_4 1 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลตร แล้วเติม 10% Na_2CO_3 100 มิลลิลิตร
4. ศึกษาหาวัสดุตรึง วิธีการตรึงและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	4.1 วัสดุตรึงที่เหมาะสม คือ เปลือกข้าว 4.2 ระยะเวลาตรึงที่เหมาะสม คือ 2 วัน 4.3 ปริมาณเซลล์ตรึงที่เหมาะสม คือ 6% 4.4 ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้สูงสุด คือ 5.9 กรัมต่อลิตร
5. ทดสอบลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียไม่ก่อโรคที่คัดแยกได้	5.1 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและ FTIR ของสารสกัดหยาบจาก *Brevibacterium casei* NK8 คาดว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้อยู่ในกลุ่มของ Phospholipid 5.2 ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดที่ได้ คือ 28.3 mN/m

โดยใช้ของเสียจากการกลั่นน้ำมันรำข้าวเป็นสารตั้งต้น	5.3 การกระจายน้ำมันที่ได้ คือ 73.3% 5.4 การเกิดอิมัลชันที่ได้ คือ 45.8% 5.5 ค่า Critical micelle dilution ที่ได้ คือ 18.5 เท่า
6. ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันในน้ำเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันรำข้าว	6.1 จากการทดสอบการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียพบว่าเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดไขมันและน้ำมันได้สูงกว่าระบบบำบัดปกติจาก 38% เป็น 91%

ภาคผนวก ข
บทความที่ได้รับการเผยแพร่



The 3rd Environment and Natural Resources International Conference

22 – 23 November 2018, Chonburi, Thailand

Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University

http://www.en.mahidol.ac.th/enric

ENRIC 2018

Global Development with Environmental Sustainability

Session 1:
Environmental Pollution Monitoring and Control

Session 2:
Social Environment Issue and Others

Session 3:
Natural and Resource Management

Session 4:
Climate Change Mitigation and Adaptation

Poster Presentation

HOME

Plenary Speech on

"Thailand's Development and Environmental Sustainability Reform"

Wijarn Simachaya, Ph.D.
Permanent Secretary of Ministry of Natural Resources and Environment, Thailand
E-mail: simachaya.s@gmail.com

DR. Wijarn Simachaya is the Permanent Secretary of the Ministry of Natural Resources and Environment, Thailand. His main responsibilities are natural resources and environmental plans, strategy development, as well as international cooperation on natural resources and environment issues. He is also a representative of the ministry of various UN, Sub-regional, and ASEAN forums. He has worked as a leader of green growth and government reform strategy development for Thailand. Besides, He serves as a chairman of the long-term strategy (20-year plan) on natural resources and environmental management, including water resources management, sustainable forest management, together with pollution control management and environmental governance for the Ministry. He has been a supervisor of 16 departments and public organizations of the ministry, along with the 76 provincial offices for natural resources and environment throughout the country.

DR. Wijarn joined the Office of Environmental Policy and Planning Board in 1984 and Pollution Control Department in 1992. He used to serve as a director of the Environment Division of the Mekong River Commission Secretariat (International Organization) in Lao PDR during 1997-1998. He has served as several high ranking positions in the Ministry, including Inspector-General and Deputy Permanent Secretary of the Ministry of Natural Resources and Environment, Director-General of the Pollution Control Department for 2 terms and the Secretary-General of the Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning.

DR. Wijarn holds 2 Bachelor's degrees in Chemical Education and Laws from Chiang Mai University and Ramkhamhaeng University, respectively, a Master's in Environmental Science from Kasetsart University and a Graduate Diploma in Sanitary Engineering from Chulalongkorn University. His highest degree is a Doctorate in Philosophy (Ph.D.) in Environmental Engineering from University of Guelph, Canada in 1990.

Plenary Speech on

"EEC: A New Plan for the Present and the Future"

Mr. Pakarathon Tienchai

Governor of Chonburi Province, Thailand

E-mail: chonburi.pa@gmail.com

Date of Birth 14 June 1962

Work Experience

- October 2016 – Present Governor of Chonburi Province
- 2012 Governor of Sa Kaeo Province
- 2010 Vice Governor of Chonburi Province
- 2009 Vice Governor of Yasothon Province

Education

- Master of Arts (M.A.), National Institute of Development Administration (NIDA)
- Bachelor of Political Science (B.Pol.Sc.), Thammasat University

Training

- The National Defence College Program (NCD)
- Executive Development Program, Ministry of Interior (MOI)
- District Chief Officer Development Program
- Department of Provincial Administration (DOPA)

Plenary Speech on

"Public Participation in Sustainable Environment: A Case Study of the Philippines"

Alex B. Brillantes, Jr., PhD
The National College of Public Administration and Governance, University of Philippines
Diliman, Philippines
E-mail: abbrillantes@up.edu.ph

Alex B. Brillantes, Jr, is Professor at the National College of Public Administration and Governance at the University of the Philippines where he also served as its dean for two terms from 2002 to 2008. He obtained his PhD and MA in Political Science from the University of Hawaii as scholar of the East West Center, and MPA and AB Political Science from the University of the Philippines. He also took special courses at the Institute for Policy Studies and the Institute for Public-Private Partnership in Washington DC, and at the Kennedy School of Government at Harvard University. Dr. Brillantes is a member of the Pi Gamma Mu and Phi Kappa Pi International Honor Societies.

Brillantes is President of the Asian Association for Public Administration with its secretariat in Seoul, Korea. He is also President of the Philippine Society for Public Administration. He earlier served as Chairman of the Philippine Social Science Council, Board Member of the *Galing Pook* Foundation, the Local Government Development Foundation and Trustee of the Local Government Academy.

Brillantes has had close to ten years of actual government experience when he was seconded full time to work in the government as Commissioner of the Commission on Higher Education where he served as Chair of the Board of Regents of 21 State Universities and Colleges. Brillantes also was Executive Director of the Local Government Academy of the Department of Interior and Local Government.

Brillantes was visiting Professor in Kobe University, Meiji University and at the Graduate Research Institute for Policy Studies in Japan; Visiting Fellow at Queensland University of Technology in Brisbane, Australia; delivered lectures at the National Institute of Development Administration in Bangkok, Thailand, Tunghai University in Taiwan, Gadajah Maddah University in Jogjakarta and University of Indonesia in Jakarta, Indonesia. He taught a special course on Poverty Reduction: Gawad Kalinga at the Euromed School in Marseilles, France.

He served as international consultant on institutional development, decentralization and governance for several local and international agencies including the Asian Development Bank, the World Bank, the United Nations Development Program. the US Agency for International Development, the Canadian International Development Agency, the Australian Agency for International Development, the Japan International Cooperation Agency, and the European Union, among others.

Professor Brillantes has published articles on public administration and governance and institutions, decentralization and development administration in several local and international journals including the *Asian Survey, Administrative Science Quarterly, Kasarinlan, the Asian Review of Public Administration, International Public Management Review, and the Philippine Journal of Public Administration* where he served as Editor in Chief. He has written and co-edtied several books including *Dictatorship and Martial Law*; *The Philippine Presidency* (with Bienvenida Amarles-Ilago; and *Innovations and Excellence in Local Governance*. He was the lead editor of the book, *Reinventing A Local Government in the Philippines: The Makati Experience* and was one of the contributors to the book, *The Quest for a Federal Republic: The PDP Laban Model of Philippine Federalism.* 3.0, (2017. He was editor of the book *Local Governments in the Philippines: A Book of Readings* with Proserpina Domingo Tapales.

Dr. Brillantes was a recipient of the International Publications Award (IPA) of the University of the Philippines for several years from 2003 to 2018. Professor Brillantes was Centennial Professorial Chair Awardee for UP Diliman in celebration of the Centennial of the University. He was also awarded the Centennial Achievement Award by the University of the Philippines Baguio Alumni Association; the Tanglaw ng Bayan Award by the Polytechnic University of the Philippines; Outstanding Ilocano Educator by the University of Northern Philippines; and Distinguished Alumnus of the East West Center / East West Center Association (Hawaii).

Chair of the Conference

Associate Professor Sayam Aroonsrimorakot, Ph.D.

Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Thailand

Editorial Team

1. Professor Mario T. Tabucanon, Ph.D.	UNU Institute for the Advanced Study of Sustainability, Japan
2. Professor Warren Y. Brockelman, Ph.D.	Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Thailand
3. Associate Professor He Man, Ph.D.	School of Journalism and Communication, Hebei University, China
4. Associate Professor Kampanad Bhaktikul, Ph.D.	Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Thailand
5. Associate Professor Nguyen Huynh Phan, Ph.D.	Institute for Research and Development of New Technologies, Viet Nam
6. Associate Professor Rattanawat Chaiyarat, Ph.D.	Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Thailand
7. Associate Professor Sura Pattanakiat, Ph.D.	Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Thailand
8. Assistant Professor Acharaporn Kumsopa, Ph.D.	Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Thailand
9. Assistant Professor Paul Joseph Grote, Ph.D.	Suranaree University of Technology, Thailand
10. Assistant Professor Tomihiro Tobino, Ph.D.	Department of Urban Engineering, the University of Tokyo, Japan
11. Assistant Professor Wenchao Xue, Ph.D.	Department of Energy, Environment, and Climate, School of Environment, Resources and Development, Asian Institute of Technology, Thailand
12. Benjamin Schulte, Ph.D.	Webster University, Thailand
13. Norberto Asensio, Ph.D.	Faculty of Psychology, University of the Basque Country, Spain

Advisory Committee

1. Assistant Professor Jongdee To-im, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
2. Assistant Professor Preeyaporn Koedrith, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
3. Assistant Professor Thamarat Phutthai, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
4. Allan Sriratana Tabucanon, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
5. Harin Sachdev, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
6. Jirataya Pansuk, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
7. Kamalaporn Kanongdate, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
8. Monthira Yuttitham, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
9. Naphatsarnan Phasukarratchai, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
10. Narin Boontanon, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
11. Navaporn Karnjanasiranon, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
12. Noppol Arunrat, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
13. Piangjai Peerakiatkhajohn, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
14. Poonperm Vardhanabindu, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
15. Sukanya Sereenonchai, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
16. Suparee Boonmanunt, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
17. Sureewan Sittijanda, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
18. Thomas Neal Stewart, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
19. Witchaya Rongsayamanont, Ph.D.	Mahidol University, Thailand
20. Mr. Juan Carlos Calderon Lopez	Mahidol University, Thailand

Organizing Committee

1. Chitsanupong Prathum, Ph.D.	2. Apirom Angsurat
3. Apitsara Chotipaporn	4. Chutintorn Moonthongnoi
5. Isaree Apinya	6. Jantima Poonsopa
7. Naphatrawee Charoensawad	8. Panee Nakraikhing
9. Parynya Chwawiwathana	10. Patama Sangsinsap
11. Praewa Wongburi	12. Sawatdirak Saingam
13. Sirinapat Charmondusit	14. Supalak Wattanachalarmyot
15. Suphawadee Jampala	16. Sureekarn Totaiya
17. Theerawut Chiyanon	18. Wantanee Poklang
19. Yutthapol Pongpleesal	

The 3rd Environment and Natural Resources International Conference (ENRIC 2018):
Global Development with Environmental Sustainability
22 – 23 November, 2018, Chonburi, Thailand

Tentative Program

Day 1: 22nd November, 2018

Time	Event
Room: Saen Suk 1-2	
08.00 - 09.00	Registration
09.00 - 09.30	**Opening Ceremony** Mahidol University's Audio Visual Presentation Faculty of Environment and Resource Studies's Audio Visual Presentation Welcome Speech by Mr. Pakarathon Tienchai, Chonburi Governor
	Conference Report by Associate Professor Dr. Kampanad Bhaktikul, Dean of the Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University
	Welcome Speech and Conference Opening Remarks by Dr. Wijarn Simachaya, Permanent Secretary of Ministry of Natural Resources and Environment
	Presentation of Souvenir to the Honored Guest Group Photograph
09.30 - 10.30	**Keynote Speaker** **"Thailand's Development and Environmental Sustainability Reform" by** **Dr. Wijarn Simachaya, Permanent Secretary of Ministry of Natural Resources and Environment**
10.30 - 11.00	Break
11.00 - 12.00	**"EEC: A New Plan for the Present and the Future" by Mr. Pakarathon Tienchai, Chonburi Governor**

Time	Event	
12.00 – 13.00	Lunch (**Saensamran 1 – 3, 2nd Floor**)	
	Session 1: Environmental Pollution Monitoring and Control **Room: Saen Suk 1** **Chair Session: Professor Dr. Hideki Nakayama** **Co-chair Session: Dr. Harin Sachdev and Dr.Thomas Neal Stewart**	**Session 2: Social Environmental Issue & Others** **Room: Saen Suk 2** **Chair Session: Dr. Sukanya Sereenonchai** **Co-chair Session: Dr. Witchaya Rongsayamanont and Mr. Juan Carlos Calderón López**
13.00 – 13.15	No. 2018-01 The Application of Tannin Extract from Plants to Reduce the Concentration of Arsenic Sayam Aroonsrimorakot* and Niwooti Whangchai	No. 2018-23 Sampling and Isolation of *Ganoderma Lucidum* in Que Phong, Nghe An Province Le Minh Thanh* and Le Minh Xuan
13.15 – 13.30	No. 2018-08 Contamination by Airborne Fungi in Hair and Beauty Salons at Sri Khai Municipality, Warinchamrap District, Ubon Ratchathani Province Laksanee Boonkhao* and Patompomg Chamnannetiwit	No. 2018-31 Using Animals such as Buffaloes in Thai Tourism Industry: An Analytical Review of Animal Ethics Sayam Aroonsrimorakot and Meena Laiphrakpam*
13.30 – 13.45	No. 2018-19 Kinetic Adsorption of Hazardous Methylene Blue from Aqueous Solution onto Iron-Impregnated Powder Activated Carbon	No. 2018-35 Sustainable Low-Carbon Community Development: A Study Based on a Royal Project for Highland Community Development in Thailand

Time	Event	
	Athit Phetrak*, Thanaporn Maswanna, Sirirat Sangkarak, Sumate Ampawong, Jutarat Rakprasit, Suda Ittisupornrat and Doungkamon Phihusut	Kampanad Bhaktikul*, Sayam Aroonsrimorakot and Meena Laiphrakpam
13.45 – 14.00	No. 2018-16 Characterization of Manganese Oxide-Biomineralization by the Psychrophilic Marine Bacterium, *Arthrobacter* sp. Strain NI-2 and Its Spontaneous Mutant Strain NI-2′ Hideki Nakayama*, Yusuke Shin, Toru Sumita, Kazuya Urata and Yasuyuki Ikegami	No. 2018-51 Factors Affecting the Efficiency of Applying the Green Office Principles in Organization Chonticha Korattana*, Sayam Aroonsrimorakot, Chalong Arunlertaree and Anong Hambananda
14.00 – 14.15	No. 2018-21 Influence of PM_{10} from the Outside Area Affecting on the Northern Part of Thailand Sirapong Sooktawee*, Aduldech Patpai, Suteera Boonyapitak, Rungrawee Kongsong, Nirun Piemyai and Usa Humphries	No. 2018-56 Food Safety and Consumption Quality Potentials of Cassava Lines Grown in Three Rain-Fed Plantation Areas in Thailand Petchludda Chaengsee, Pasajee Kongsil*, Nongnuch Siriwong, Sukanda Kerddee, Piya Kittipadakul, Rutai Ruangthamsing and Krittaya Petchpoung
14.15 – 14.30	No. 2018-32 Life Cycle Assessment of Two Limestone Quarries in Thailand with Environmental Footprint Technique	No. 2018-60 Manage the Environment for Security Development with the Legal Method at Vietnam

Time	Event	
	Thanapat Atikij* and Sayam Aroonsrimorakot	Nguyen Hoang Thuy*
14.30 – 15.00	Break	
	Session 1: Environmental Pollution Monitoring and Control **Room: Saen Suk 1** **Chair Session: Professor Dr. Hideki Nakayama** **Co-chair Session: Dr. Harin Sachdev and Dr.Thomas Neal Stewart**	**Session 2: Social Environmental Issue & Others** **Room: Saen Suk 2** **Chair Session: Dr. Sukanya Sereenonchai** **Co-chair Session: Dr. Witchaya Rongsayamanont and Mr. Juan Carlos Calderón López**
15.00 – 15.15	No. 2018-37 Removal of Methylene Blue Dye by Silver and Zirconium Doped TiO_2 Photocatalyst under Visible Light Pornrat Sanitnon, Siriluk Chiarakorn* and Chamorn Chawengkijwanich	No. 2018-61 Solutions for the Sustainable Development of Marine Resources in Vietnam in the Current Period Tran Huong Giang*
15.15 – 15.30	No. 2018-41 Heavy Metal Accumulation and Health Risk Assessment through Consumption of Vegetables around Loei River, Loei Province Netnapa Pongpetch* and Vanlop Thathong	No. 2018-62 Type of Story Related to "Human-Fairy Marriage" in Vetnam and Other Southeast Asian Islands Countries Mount with Environment Thu Minh Nguyen*

Time	Event	
15.30 – 15.45	No. 2018-59 Study on Production of Decomposing Cellulose Microbial Product from Microorganism Isolates from Nghi Yen Landfill Le Minh Thanh* and Nguyen Van Tiep	No. 2018-63 Female Blends and Religious Beliefs of Type of Story Related to "Human-Swan (Kinnari) Maiden Marriage" in Folk Stories Southeast Asia Thu Minh Nguyen*
15.45 – 16.00	No. 2018-67 Radiological Hazard Assessment and Excess Lifetime Cancer Risk Evaluation in Surface Soil Samples Collected from Mueang District in Rayong Province, Thailand Prasong Kessaratikoon*, Ruthairat Boonkrongcheep, Kittiya Eiadkaew and Sitthipong Polthum	No. 2018-68 Socioeconomic and Environment Challenges of Artisanal and Small-Scale Tin Mining Sectors in Bangka Barat Regency, Bangka Belitung, Indonesia Ranto Ranto*, Gusti Indah, Rendy Rendy and Sandy Pratama
16.00 – 16.15	No. 2018-77 Bacterial Growth Competition and Their Nitrate Reduction End-Products in the Steady State Chemostat of Nitrate Reducing Bacteria Isolated from Estuarine Sediments Iman Rusmana* and Dave Nedwell	No. 2018-83 Livable City – Liveable Life: Assessment of Happiness of Citizens of Danang, a City in the Central of Vietnam – Research for Social and Sustainable Development Nguyen Thi Hang Phuong*, Le My Dung, Luu Thi Thuy and Bui Van Van

Time	Event	
16.15 - 16.30	No. 2018-82 Environmental Pollution of Solid Waste Burial Sites in Nghe An Province, Vietnam Chau Dao Thi Minha* and Loi Nguyen Van	No. 2018-74 Comparative SWOT Analysis of the Key Stakeholders for Assessing Irrigation Governance in Cambodia Hironori Hamasaki* and Kong Sophaek
16.30 -16.45	No. 2018-84 A Simple Method for Synthesis of Triamine-SiO_2 Material toward Aqueous Nitrate Adsorption Phuoc Toan Phana, Trung Thanh Nguyen*, Nhat Huy Nguyen and Surapol Padungthon	
10.30 - 11.00 & 14.30 - 15.00	Posters Presentation and Demonstration Session	
	No. 2018-02 Kjeldahl Method and Sensory Analyses of a Thornback Ray (*Raja clavata*), Eel (*Anguilla* spp), and Tilapia (*Orechromis mossambicus*) Meat; As a Nutritious Product Alternative Juan Carlos Calderón López*, Harin Sachdev and Gabriela Alejandra Lemus Calderón	
	No. 2018-12 Security Food Alternative through Evaluation by Sensory and Bromatological Analyses of Protein from Corn H-59 (*Zea mays*) and Taro	

Time	Event
	Root (*Colocasia esculenta*), in the Elaboration of Tortilla as a Food Supplement Juan Carlos Calderón López*, Harin Sachdev and Fernando Antonio Moran Perz
	No. 2018-13 Bromatological and Sensory Analysis of a Corn (*Zea mays*) Flour Fortified with Moringa (*Moringa oleífera*), to Increase Its Nutritional Value Juan Carlos Calderón López*, Thamarat Phutthai, Yancy Carolina Moran Mendoza and Manuel Adolfo Calderón Turcios
	No. 2018-16 Characterization of Manganese Oxide-biomineralization by the Psychrophilic Marine Bacterium, *Arthrobacter* sp. Strain NI-2 and Its Spontaneous Mutant Strain NI-2′ Hideki Nakayama*, Yusuke Shin, Toru Sumita, Kazuya Urata and Yasuyuki Ikegami
	No. 2018-20 Optimization Studies Using Response Surface Methodology for Cr(VI) Adsorption on Graphite Oxide-Plaster Composite Doungkamon Phihusut*, Athit Phetrak, Monruedee Chantarat, Patchapun Rattanapun, Jakkrit Khamjerm and Sudthida Pliankarom Tanasupsin
	No. 2018-78 Isolation and Screening of Alkaliphile Bacteria for Biosurfactant Production Using Agricultural/Agro-Industrial Wastes as Substrate

Time	Event
	Natcha Ruamyat, Ekawan Luepromchai and Nichakorn Khondee*
	No. 2018-79 Formulation of Lipopeptide-based Washing Agent for Oil-Based Drill Cutting Treatment Kanyarat Sikhao, Ekawan Luepromchai, Witchaya Rongsayamanont, Suwat Soonglerdsongpha and Nichakorn Khondee*
17.00 - 21.00	**Welcome Reception (Gala Dinner with Special Event: Loi Krathong Festival)** **Room: Saensamran 1** - 3, 2nd Floor
18.00 – 18.30	Arrivals
18.30 – 18.40	Welcome & Short Intro by Associate Professor Dr. Sayam Aroonsrimorakot, Conference Chair
18.40 – 19.00	Opening Speech by Associate Professor Dr. Kampanad Bhaktikul (Dean of the Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University)
19.00 – 20.30	Dinner & Thai Dancing
20.30 – 21.00	Special Event: Loi Krathong Festival

Day 2: 23rd November, 2018

Time	Event	
Room: Saen Suk 1-2		
08.00 - 09.00	Registration	
09.00 - 10.00	**Keynote Speaker** **"Public Participation in Sustainable Environment: A case Study of the Philippines" by Professor Alex Brillantes,** **The National College of Public Administration and Governance, University of Philippines Diliman, Philippines**	
10.00 - 10.30	Break	
	Session 1: Environmental Pollution Monitoring and Control (Cont.) **Room: Saen Suk 1** **Chair Session: Assoc. Prof. Dr. Sayam Aroonsrimorakot** **Co-chair Session: Dr.Thomas Neal Stewart and Mr. Juan Carlos Calderón López**	**Session 4: Climate Change Mitigation and Adaptation** **Room: Saen Suk 2** **Chair Session: Professor Mohammed Sharif** **Co-chair Session: Dr. Allan Sriratana Tabucanon and Dr. Chitsanupong Prathum**

Time	Event	
10.00 – 10.15	No. 2018-85 Cancer Risk of 1,3-Butadiene Exposure to Various Receptors Living Near Heavy Traffic Area in Bangkok, Thailand Sureeporn Lorussachan*, Auemphorn Mutchimwong, Jaruwan Wongthanate, Rattapon Onchang and Wanna Laowagul	No. 2018-30 Study of Acid-Catalyzed Esterification Pretreatment of High Free Fatty Acid Crude Rice Bran Oil for Biodiesel Production Tin Mar Lar Thein*, Vinod K. Jindal, Ranjna Jindal and Nuttawan Yoswathan
10.15 – 10.30	No. 2018-86 Efficiency of Activated Carbon and White Charcoal from Textile Dyeing Industry in Synthetic Wastewater Sayam Aroonsrimorakot*, Meena Laiphrakpam and Supapan Athirot	No. 2018-33 Change of Forest Area and Its Associated CO_2 Emissions at Provincial Level in Southern Part of Thailand Bussarin Thanutchangsang, Jantira Rattanarat and Thongchai Kanabkaew*
10.30 – 10.45	No. 2018-87 The Self-Heat Two-Stage Biomass Gasification Facility-Benefits, Questions and Prospects T. Fujino, M. Iijima, T. Shimogo and H. Sato	No. 2018-39 Vegetation Survey and Applied Remote Sensing Techniques for Monitoring Carbon Storage in Reclaimed Land of Reforestation at Banpu Lignite Mine, Northern Thailand Suppagarn Thiteja*, Soontorn Khamyong, Amarin Boontun, Panlop Huttagosol and Arisara Charoenpanyanet

Time	Event	
10.45 – 11.00	No. 2018-88 Tracking the Sedimentary Heavy Metals for Better Understanding the Anthropogenic Impact on Watershed Environment: A Study in Lower Chao Phraya River Watershed, Thailand Wenchao Xue*, Thanyachanok Onkong and Thammarat Koottatep	No. 2018-55 Evaluation of Cassava Germplasm for Drought Tolerance Breeding Program in Thailand Chidchanok Pragob, Pasajee Kongsil*, Sukanda Kerddee, Piya Kittipadakul, Chalermpol Phumichai and Krittaya Petchpoung
	Session 3: Natural and Resources Management **Room : Saen Suk 1** **Chair Session: Assoc. Prof. Dr. Sayam Aroonsrimorakot** **Co-chair Session: Dr. Navaporn Karnjanasiranon and Dr. Piangjai Peerakiatkhajohn**	**Session 4: Climate Change Mitigation and Adaptation (Cont.)** **Room : Saen Suk 2** **Chair Session: Professor Mohammed Sharif** **Co-chair Session: Dr. Allan Sriratana Tabucanon and Dr. Chitsanupong Prathum**
11.00 – 11.15	No. 2018-10 Solid Waste Management in a Secondary School in Ubon Ratchathani Province Jeeraporn Tippila* and Thathiya Srichan	No. 2018-58 Evaluating Changes in Flood Regime in Canadian Watersheds Using Peaks Over Threshold Approach Mohammed Sharif*, Kampanad Bhaktikul and Donald Burn
11.15 – 11.30	No. 2018-11 Using Contingent Valuation Method for Estimating the Willingness to Pay for Mangrove Forest: A Study in West	No. 2018-65 Alternative Energy in Household Using Used Vegetable Oil

Time	Event	
	Session 3: Natural and Resources Management (Cont.) **Room: Saen Suk 1** **Chair Session: Assoc. Prof. Dr. Sayam Aroonsrimorakot** **Co-chair Session: Dr. Navaporn Karnjanasiranon and Dr. Piangjai Peerakiatkhajohn**	**Session 1: Environmental Pollution Monitoring and Control** **Room: Saen Suk 1** **Chair Session: Assoc. Prof. Dr. Sayam Aroonsrimorakot** **Co-chair Session: Dr.Thomas Neal Stewart and Mr. Juan Carlos Calderón López**
13.00 – 13.15	No. 2018-70 Monitoring Plant Species Diversity and Carbon Storage in a Recovery Dry Dipterocarp Forest on Volcanic Rock at Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Northern Thailand Soontorn Khamyong*, Teuanchay Phongkhamphanh, Panida Kachina, Niwat Anongrak and Kriangsak Sri-ngernyuang	No. 2018-14 Efficiency of Thai Morning Glory Plants (*Ipomoea aquatica*) in Domestic Wastewater Treatment and Reuse Potentials Manassanun Yammanas*, Akeanan Jongsrisupat, Phattarasin Choontanom, Warunsak Liamlaem and Chongrak Polprasert
13.15 – 13.30	No. 2018-71 Restoration of Water Storage Potential in a Degrade Dry Dipterocarp Forest by Enrichment Planting of Pine in Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Northern Thailand Thananiti Thichan*, Soontorn Khamyong, Panida Kachina and Niwat Anongrak	No. 2018-89 Direct Contact Membrane Distillation for Decolorization of Reactive Dye Wastewater Pyae Phyo Kywe* and Chavalit Ratanatamskul

Time	Event	
13.30 – 13.45		No. 2018-34 Enhanced Photocatalytic Performance of Al Doped Zinc Oxide for Dye Degradation Supphasin Thaweesak, Pancharat Supapatarnun, Suteemon Intarat, Weeraya Intarabut, Teera butburee and Piangjai Peerakiatkhajohn*
13.45 – 14.00	Break	
Room: Saen Suk 1-2		
14.00 – 14.30	**Closing Ceremony** Conference's Audio Visual Presentation Conference Overall Conclusions Reported by Associate Professor Dr. Sayam Aroonsrimorakot, Conference Chair Occasion – Presentation of Certificate to Chair and Co-chair Session – Outstanding Conference Papers Award Closing Speech by Associate Professor Dr. Kampanad Bhaktikul, Dean of the Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University	

Table of content

Title	Page
Keynote Speaker	**I**
Organizer of the Conference • Chair of the Conference • Editorial Team • Advisory Committee • Organizing Committee	**V**
Tentative Program	**VII**

No.	Title	Author/s	Page
Oral Presentation			
Session 1: Environmental Pollution Monitoring and Control			
2018-08	Contamination by Airborne Fungi in Hair and Beauty Salons at Sri Khai Municipality, Warinchamrap District, Ubon Ratchathani Province	Laksanee Boonkhao* and Patompomg Chamnannetiwit	1
2018-14	Efficiency of Thai Morning Glory Plants (*Ipomoea aquatica*) in Domestic Wastewater Treatment and Reuse Potentials	Manassanun Yammanas*, Akeanan Jongsrisupat, Phattarasin Choontanom, Warunsak Liamlaem and Chongrak Polprasert	7
2018-16	Characterization of Manganese Oxide-Biomineralization by the Psychrophilic Marine Bacterium, *Arthrobacter* sp. Strain NI-2 and Its Spontaneous Mutant Strain NI-2'	Hideki Nakayama*, Yusuke Shin, Toru Sumita, Kazuya Urata and Yasuyuki Ikegami	11
2018-19	Kinetic Adsorption of Hazardous Methylene Blue from Aqueous Solution onto Iron-Impregnated Powder Activated Carbon	Athit Phetrak*, Thanaporn Maswanna, Sirirat Sangkarak, Sumate Ampawong, Jutarat Rakprasit, Suda Ittisupornrat and Doungkamon Phihusut	21
2018-21	Influence of PM_{10} from the Outside Area Affecting on the Northern Part of Thailand	Sirapong Sooktawee*, Aduldech Patpai, Suteera Boonyapitak, Rungrawee Kongsong, Nirun Piemyai, and Usa Humphries	30
2018-34	Enhanced Photocatalytic Performance of Al Doped Zinc Oxide for Dye Degradation	Supphasin Thaweesak, Pancharat Supapatarnun, Suteemon Intarat, Weeraya Intarabut, Teera butburee and Piangjai Peerakiatkhajohn*	42
2018-37	Removal of Methylene Blue Dye by Silver and Zirconium Doped TiO_2 Photocatalyst under Visible Light	Pornrat Sanitnon, Siriluk Chiarakorn* and Chamorn Chawengkijwanich	49
2018-41	Heavy Metal Accumulation and Health Risk Assessment through Consumption of Vegetables around Loei River, Loei Province	Netnapa Pongpetch* and Vanlop Thathong	56

No.	Title	Author/s	Page
2018-59	Study on Production of Decomposing Cellulose Microbial Product from Microorganism Isolates from Nghi Yen Landfill	Le Minh Thanh* and Nguyen Van Tiep	65
2018-67	Radiological Hazard Assessment and Excess Lifetime Cancer Risk Evaluation in Surface Soil Samples Collected from Mueang District in Rayong Province, Thailand	Prasong Kessaratikoon*, Ruthairat Boonkrongcheep, Kittiya Eiadkaew and Sitthipong Polthum	72
2018-77	Bacterial Growth Competition and Their Nitrate Reduction End-Products in the Steady State Chemostat of Nitrate Reducing Bacteria Isolated from Estuarine Sediments	Iman Rusmana* and Dave Nedwell	81
2018-82	Environmental Pollution of Solid Waste Burial Sites in Nghe An Province, Vietnam	Chau Dao Thi Minh* and Loi Nguyen Van	93
2018-84	A Simple Method for Synthesis of Triamine-SiO_2 Material toward Aqueous Nitrate Adsorption	Phuoc Toan Phan, Trung Thanh Nguyen*, Nhat Huy Nguyen and Surapol Padungthon	97
2018-85	Cancer Risk of 1,3-Butadiene Exposure to Various Receptors Living Near Heavy Traffic Area in Bangkok, Thailand	Sureeporn Lorussachan*, Auemphorn Mutchimwong, Jaruwan Wongthanate, Rattapon Onchang and Wanna Laowagul	107
2018-87	The Self-Heat Two-Stage Biomass Gasification Facility-Benefits, Questions and Prospects-	T. Fujino*, M. Iijima, T. Shimogo and H. Sato	115
2018-89	Direct Contact Membrane Distillation for Decolorization of Reactive Dye Wastewater	Pyae Phyo Kywe* and Chavalit Ratanatamskul	121
2018-01	The Application of Tannin Extract from Plants to Reduce the Concentration of Arsenic **(Only Abstract)**	Sayam Aroonsrimorakot* and Niwooti Whangchai	126
2018-32	Life Cycle Assessment of Two Limestone Quarries in Thailand with Environmental Footprint Technique **(Only Abstract)**	Thanapat Atikij* and Sayam Aroonsrimorakot	127
2018-86	Efficiency of Activated Carbon and White Charcoal from Textile Dyeing Industry in Synthetic Wastewater **(Only Abstract)**	Sayam Aroonsrimorakot*, Meena Laiphrakpam and Supapan Athirot	128
2018-88	Tracking the Sedimentary Heavy Metals for Better Understanding the Anthropogenic Impact on Watershed Environment: A Study in Lower Chao Phraya River Watershed, Thailand **(Only Abstract)**	Wenchao Xue*, Thanyachanok Onkong and Thammarat Koottatep	129
Oral Presentation Session 2: Social Environmental Issue and Others			
2018-23	Sampling and Isolation of *Ganoderma Lucidum* in Que Phong, Nghe An Province	Le Minh Thanh* and Le Minh Xuan	130
2018-51	Factors Affecting the Efficiency of Applying the Green Office Principles in Organization	Chonticha Korattana*, Sayam Aroonsrimorakot, Chamlong Arunlertaree and Anong Hambananda	136

No.	Title	Author/s	Page
2018-56	Food Safety and Consumption Quality Potentials of Cassava Lines Grown in Three Rain-Fed Plantation Areas in Thailand	Petchludda Chaengsee, Pasajee Kongsil*, Nongnuch Siriwong, Sukanda Kerddee, Piya Kittipadakul, Rutai Ruangthamsing and Krittaya Petchpoung	142
2018-60	Manage the Environment for Security Development with the Legal Method at Vietnam	Nguyen Hoang Thuy*	152
2018-61	Solutions for the Sustainable Development of Marine Resources in Vietnam in the Current Period	Tran Huong Giang*	161
2018-62	Type of Story Related to "Human-Fairy Marriage" in Vetnam and Other Southeast Asian Islands Countries Mount with Environment	Thu Minh Nguyen*	168
2018-63	Female Bleds and Religious Beliefs of Type of Story Related to "Human-Swan (Kinnari) Maiden Marriage" in Folk Stories Southeast Asia	Thu Minh Nguyen*	178
2018-68	Socioeconomic and Environment Challenges of Artisanal and Small-Scale Tin Mining Sectors in Bangka Barat Regency, Bangka Belitung, Indonesia	Ranto Ranto*, Gusti Indahb, Rendy Rendy and Sandy Pratama	185
2018-74	Comparative SWOT Analysis of the Key Stakeholders for Assessing Irrigation Governance in Cambodia	Hironori Hamasaki* and Kong Sopheak	192
2018-83	Livable City - Liveable Life: Assessment of Happiness of Citizens of Danang, a City in the Central of Vietnam - Research for Social and Sustainable Development	Nguyen Thi Hang Phuong*, Le My Dung, Luu Thi Thuy and Bui Van Van	198
2018-31	Using Animals such as Buffaloes in Thai Tourism Industry: An Analytical Review of Animal Ethics **(Only Abstract)**	Sayam Aroonsrimorakot and Meena Laiphrakpam*	205
2018-35	Sustainable Low-Carbon Community Development: A Study Based on a Royal Project for Highland Community Development in Thailand **(Only Abstract)**	Kampanad Bhaktikul*, Sayam Aroonsrimorakot and Meena Laiphrakpam	206
Oral Presentation Session 3: Natural and Resource Management			
2018-10	Solid Waste Management in a Secondary School in Ubon Ratchathani Province	Jeeraporn Tippila* and Thathiya Srichan	207
2018-11	Using Contingent Valuation Method for Estimating the Willingness to Pay for Mangrove Forest: A Study in West Lombok, Indonesia	Endah Saptutyningsih* and Diswandi Diswandi	212
2018-40	Ecosystem Services Provided by Potential Wild Edible Plant Species in the Cordillera Region, Philippines	Joyce N. Paing*	220
2018-50	Valuation of Irrigated Water Used in Crop Production: A Case of Rice and Sugarcane in Nakhon Pathom Province	Irwin Vich Gonsalves, Ratchaphong Klinsrisuk* and Piyakarn Teartisup	228

No.	Title	Author/s	Page
2018-70	Monitoring Plant Species Diversity and Carbon Storage in a Recovery Dry Dipterocarp Forest on Volcanic Rock at Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Northern Thailand	Soontorn Khamyong*, Teuanchay Phongkhamphanh, Panida Kachina, Niwat Anongrak and Kriangsak Sri-ngernyuang	233
2018-71	Restoration of Water Storage Potential in a Degrade Dry Dipterocarp Forest by Enrichment Planting of Pine in Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Northern Thailand	Thananiti Thichan*, Soontorn Khamyong, Panida Kachina and Niwat Anongrak	250
Oral Presentation			
Session 4: Climate Change Mitigation and Adaptation			
2018-30	Study of Acid-Catalyzed Esterification Pretreatment of High Free Fatty Acid Crude Rice Bran Oil for Biodiesel Production	Tin Mar Lar Thein*, Vinod K. Jindal, Ranjna Jindal and Nuttawan Yoswathana	275
2018-33	Change of Forest Area and Its Associated CO_2 Emissions at Provincial Level in Southern Part of Thailand	Bussarin Thanutchangsang, Jantira Rattanarat and Thongchai Kanabkaew*	286
2018-39	Vegetation Survey and Applied Remote Sensing Techniques for Monitoring Carbon Storage in Reclaimed Land of Reforestation at Banpu Lignite Mine, Northern Thailand	Suppagarn Thiteja*, Soontorn Khamyong, Amarin Boontun, Panlop Huttagosol and Arisara Charoenpanyanet	292
2018-55	Evaluation of Cassava Germplasm for Drought Tolerance Breeding Program in Thailand	Chidchanok Pragob, Pasajee Kongsil*, Sukanda Kerddee, Piya Kittipadakul, Chalermpol Phumichai and Krittaya Petchpoung	300
2018-65	Alternative Energy in Household Using Used Vegetable Oil	Jiraporn Khongaseam, Narin Boontanon* and Suwanna Kitpati Boontanon	311
2018-66	Sustainable Swine Farming Transformation Case Study of Economic and Environment Evaluations of Turning Ordinary to Smart Green Farming System	Mukkarin Klunpukdee and Narin Boontanon*	321
2018-69	People's Perception and Adaptive Behaviours for Mitigating Climate Change	Sarawut Peakhunthod* and Monica Price	330
2018-76	Statistical Downscaling for Regeneration of Historical Daily Rainfall	Allan Sriratana Tabucanon*	341
2018-58	Evaluating Changes in Flood Regime in Canadian Watersheds Using Peaks Over Threshold Approach **(Only abstract)**	Mohammed Sharif*, Kampanad Bhaktikul and Donald Burn	351
Poster Presentation			
2018-02	Kjeldahl Method and Sensory Analyses of a Thornback Ray (*Raja clavata*), Eel (*Anguilla* spp), and Tilapia (*Orechromis mossambicus*) Meat; As a Nutritious Product Alternative	Juan Carlos Calderón López*, Harin Sachdev and Gabriela Alejandra Lemus Calderón	352

No.	Title	Author/s	Page
2018-12	Security Food Alternative through Evaluation by Sensory and Bromatological Analyses of Protein from Corn H-59 (*Zea mays*) and Taro Root (*Colocasia esculenta*), in the Elaboration of Tortilla as a Food Supplement	Juan Carlos Calderón López*, Harin Sachdev and Fernando Antonio Moran Pérez	357
2018-13	Bromatological and Sensory Analysis of a Corn (*Zea mays*) Flour Fortified with Moringa (*Moringa oleifera*), to Increase Its Nutritional Value	Juan Carlos Calderón López*, Thamarat Phutthai, Yancy Carolina Moran Mendoza and Manuel Adolfo Calderón Turcios	361
2018-16	Characterization of Manganese Oxide-Biomineralization by the Psychrophilic Marine Bacterium, *Arthrobacter* sp. Strain NI-2 and Its Spontaneous Mutant Strain NI-2'	Hideki Nakayama*, Yusuke Shin, Toru Sumita, Kazuya Urata and Yasuyuki Ikegami	365
2018-20	Optimization Studies Using Response Surface Methodology for Cr(VI) Adsorption on Graphite Oxide-Plaster Composite	Doungkamon Phihusut*, Athit Phetrak, Monruedee Chantarat, Patchapun Rattanapun, Jakkrit Khamjerm and Sudthida Pliankarom Tanasupsin	375
2018-78	Isolation and Screening of Alkaliphilic Bacteria for Biosurfactant Production Using Agricultural/Agro-Industrial Wastes as Substrate	Natcha Ruamyat, Ekawan Luepromchai and Nichakorn Khondee*	383
2018-79	Formulation of Lipopeptide-based Washing Agent for Oil-based Drill Cutting Treatment	Kanyarat Sikhao, Ekawan Luepromchai, Witchaya Rongsayamanont, Suwat Soonglerdsongpha and Nichakorn Khondee*	390
Reviewer Team			**398**
Sponsors			**401**

Isolation and Screening of Alkaliphilic Bacteria for Biosurfactant Production Using Agricultural/Agro-Industrial Wastes as Substrate

Natcha Ruamyat[a], Ekawan Luepromchai[b,c] and Nichakorn Khondee[a,c]*

[a]*Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Thailand*
[b]*Microbial Technology for Marine Pollution Treatment Research Unit, Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand*
[c]*Research Program on Remediation Technologies for Petroleum Contamination, Center of Excellence on Hazardous Substance Management, Chulalongkorn University, Thailand*

Abstract

Biosurfactants have been used considerably as alternatives to chemical surfactants due to their high surface activity and low toxicity. In this study, alkaliphilic bacteria were isolated from alkaline contaminated soils collected from a rice bran oil refinery plant using crude rice bran oil, soapstock and wax as substrates. Among all isolates, three bacterial strains showed great results of surface tension reduction and were identified as *Brevibacterium casei* NK8 (28.31 mN/m), *Microbacterium paraoxydans* NK22 (29.92 mN/m) and *Pseudomonas mendocina* NK41 (29.45 mN/m). Moreover, cell-free broth of *Brevibacterium casei* NK8 had high emulsification index (45.83 %), oil displacement (73.33 %) and critical micelle dilution (18.5 times) values. The potential of an alkaliphilic *Brevibacterium casei* NK8 to utilize different agricultural/agro-industrial wastes for biosurfactant production was evaluated. The wastes were hydrolyzed by alkali during sterilization process. Production of biosurfactant was found to be the highest with defatted rice bran (1.86 g/L) as compared to rice husk, durian shell and corn husk. The using of low-price lignocellulosic substrates enhance potential economical production of biosurfactant on further industrial scale.

Keywords: Alkaliphilic bacteria/ Biosurfactant/ Agricultural/agro-industrial wastes/ Lignocellulosic wastes/ Alkaline pretreatment

1. Introduction

Biosurfactants, amphipathic products of biological origin, have generated wide interest as potential nontoxic alternative surface-active agents (Gutnick and Bach, 2017). Biosurfactant have the unique property of reducing the surface and interfacial tension of liquids, resulting to their many applications in the field of agriculture, petroleum, microbial enhanced oil recovery, biomedical sciences, cosmetics, food processing and pharmaceuticals. Chemically, the biosurfactants are classified into lipopeptides, glycolipids, neutral lipids, fatty acids, phospholipids, polymeric and particulate compounds (Chen et al., 2015).

Many biosurfactants are produced by microorganisms during aerobic fermentation at neutral condition. To prevent contamination and enhance biosurfactant solubilization, this research interest in the production of biosurfactant by alkaliphilic bacteria. Moreover, alkaliphilic exoenzymes produced during fermentation, such as alkaline cellulases and/or alkaline proteases, can enhance biosurfactant effectiveness (Horikoshi, 1996; Satyanarayana et al., 2005). Alkaliphiles can be isolated from normal environments such as garden soil, while they can be found higher in alkaline environments. Highly alkaline environments for microorganisms include alkaline contaminated soils and industrial-derived alkaline effluents.

*Corresponding Author: Nichakorn Khondee
E-mail address: nichakornk@nu.ac.th

A major limitation of the commercialization of biosurfactant has always been their cost, as they are more expensive than petroleum-based surfactant. To overcome this obstacle, agricultural/agro-industrial wastes comprised of lignocellulosic biomass are inexpensive, renewable and abundant, thus provides a unique natural resource for large-scale and cost-effective biosurfactant production. Lignocellulosic biomass is a complex matrix that is relatively resistant to degradation. Sugars are locked in a recalcitrant structure that requires a pretreatment step to release them (Hassan et al., 2018). Many conventional methods are currently used to pretreat lignocellulosic biomass such as steam/steam explosion, grinding/milling, hot water/autohydrolysis, acid treatment and alkali treatment (Amin et al., 2017) . In this research, agricultural/agro-industrial wastes were pretreated during sterilization process in Horikoshi alkaline medium. Then, alkaliphilic biosurfactant-producing bacteria could be cultivated subsequently without pH adjustment. The advantage of alkali pretreatment is carried out under milder condition than acid method by using non-polluting and non-corrosive chemicals such as ammonia, sodium hydroxide, sodium carbonate, and calcium hydroxide. Alkali pretreatment have been identified as methods that release low concentrations of inhibitors (e.g., acetic and formic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), and phenolic compounds) that are potentially inhibitory to microbes (Koppram et al., 2014).

The objective of this work was to screen the effective alkaliphilic bacteria and investigate the potential agriculture residues as substrate for biosurfactant production. Firstly, alkaliphilic biosurfactant-producing bacteria were isolated from alkaline oil contaminated soils from vegetable refinery plant using oily-byproducts as substrate. Secondly, several parameters were used to test surface activity of isolated strains such as surface tension, oil displacement, emulsification index and critical micelle dilution. Thirdly, agricultural/agro-industrial wastes in Thailand were hydrolyzed by alkali and utilized by the isolated alkaliphilic bacteria to produce biosurfactant. The pretreated agricultural/agro-industrial wastes contain soluble sugar and oil that could be used as substrates instead of oily-byproduct from crude rice bran oil refinery.

2. Methodology

2.1 Soil samples and oily by-products

Soil samples and oily by-products were collected from rice bran oil refinery plant in Thailand. Soil samples were collected at a depth of 15 cm and stored at 4°C. The pH of all soil samples was about 10. Oily by-products were obtained from CEO Agrifood Co. Ltd, included crude rice bran oil, soapstock and wax.

2.2 Isolation and screening of alkaliphilic bacteria

Soil samples were inoculated into Horikoshi medium (HM) of pH 10 for enrichment of bacteria using oily-byproducts as substrate. Enriched samples were diluted and spread on the HM agar plates containing (g/L) glucose 10, peptone 5, yeast extract 5, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, Na_2CO_3 10 and agar 20, pH 10. Plates were incubated at 30°C for 24 h and individual colonies were picked up and further streaked on HM agar plate in order to obtain pure culture. All the bacterial isolates were maintained on HM agar at 4°C for subsequent experiments.

To study biosurfactant production potential, each isolate was cultured in HM broth using oily-by products as substrate. The culture medium samples were autoclaved at 110°C for 10 min and centrifuged at 8,000 rpm for 30 min to remove bacterial cells. Various methods were used to study surface activity of cell-free broth such as surface tension, emulsification index and oil displacement. The surface tension was measured by digital tensiometer (Kruss, BP100) at 25°C using the plate method.

The emulsification index was determined by vortexed an equal volume of rice bran oil and cell-free broth for 2 min. Then, left the mixture to stand for 24 h. The emulsification index was determined as the percentage of the height of the emulsified layer (mm) divided by the total height of the liquid column (mm).

The oil spreading assay was performed by added 20 mL of distilled water to glass petri dishes, followed by 10 µL of rice bran oil on the surface of the water. Then, 10 µL of the cell-free broth was dropped to the center of the oil layer. The diameter of the clear zone formed by the oil displacement was measured and calculated compared to the diameter of the oil layer.

2.3 Selection of alkaliphilic bacteria for biosurfactant production

Critical micelle dilution (CMD) value was used to selected alkaliphilic bacteria for further study. The culture medium samples were autoclaved at 110°C for 10 min and centrifuged at 8000 rpm for 30 min to remove bacterial cells. Cell-free broth was diluted with distilled water from 2 to 512 times. Then, the diluted cell-free broth was measured the surface tension. The CMD value was determined from plotting dilution versus surface tension.

2.4 Molecular identification of the selected alkaliphilic bacterial strains

Pure culture plate of the selected strains was sent to a sequencing service by Macrogen Inc (Seoul, South Korea). The 16S rRNA gene sequences were compared with GenBank using the BLASTn program.

2.5 Biosurfactant production using agricultural/ agro-industrial wastes under alkaline condition

Several agricultural/agro-industrial wastes in Thailand was examined as alternative substrate for biosurfactant production: rice husk, durian shell, corn husk and defatted rice bran. Rice husk, durian shell and corn husk were collected from agricultural area in Phitsanulok province. Defatted rice bran was supported by CEO Agrifood Co. Ltd. All agricultural/agro-industrial wastes were dried and mashed into size of 1 mm. For inoculum preparation, a loopful of bacteria was transferred to HM broth and incubated for 48 h at 30°C with agitation of 200 rpm. The optical density of inoculum was adjusted to 1.0 at 600 nm. Biosurfactant was produced by culturing 10% (v/v) inoculum in HM broth without glucose containing 1.0% (w/v) mashed agricultural/agro-industrial wastes for 4 days at 30°C with agitation of 200 rpm. Amount of produced biosurfactant was analyzed by acid precipitation and solvent extraction method. The cell number was analyzed by the plate count technique.

2.6 Biosurfactant yield analysis

The produced biosurfactant was extracted from culture broth by using the same procedure as Khondee et al. (2015). Briefly, the cell-free broth was adjusted pH to 2.0 by using 6 M HCl to precipitate the biosurfactant. Then, an equal volume of chloroform:methanol (2:1) was added to the acidic cell-free broth and shaking for 30 min. The solvent mixture was separated and evaporated by a rotary evaporator at 45°C. The product was dissolved in methanol and separated from remaining oil. The solvent was evaporated at 60°C. Dry weight of crude product was measured to calculate biosurfactant yield.

3. Results and discussion

3.1 Isolation of biosurfactant-producing alkaliphilic bacteria

A total of 41 isolates with different morphological types were isolated from alkaline contaminated soils collected from rice bran oil refinery plant. All isolated were identified surface activity by various methods which are surface tension, emulsification index and oil displacement. Three strains were selected from each oil inducers: NK8, NK22 and NK41 (Formerly known as NKHM8, NKHM22 and NKHM41). All three strains could reduce surface tension of HM broth from 37.55 to below 30.00 mN/m. Emulsification index of these strains were in the range from 45 to 50%. However, oil displacement of bacterial strain NK8 and NK41 showed much higher than NK22. The residual wax used as inducer for NK22 might affect to oil displacement activity. Jain et al. (2012) reported that the cell-free broth of alkaliphilic *Cronobacter sakazakii* RJ-06 showed the highest surface tension reduction to 46.07 mN/m, while emulsification index with vegetable oils were in between 90% to 100%. The uronic acid and proteinaceous component of bacterial biosurfactant played an important role in the emulsification of hydrocarbons and oils, apart from functional groups (acetyl) present in the biopolymer, which also provide hydrophobicity, imparting enhanced emulsifying activity (Bramhachari et al., 2007). Therefore, different chemical structure of biosurfactant from diverse bacterial strain affect to the variation of surface activities.

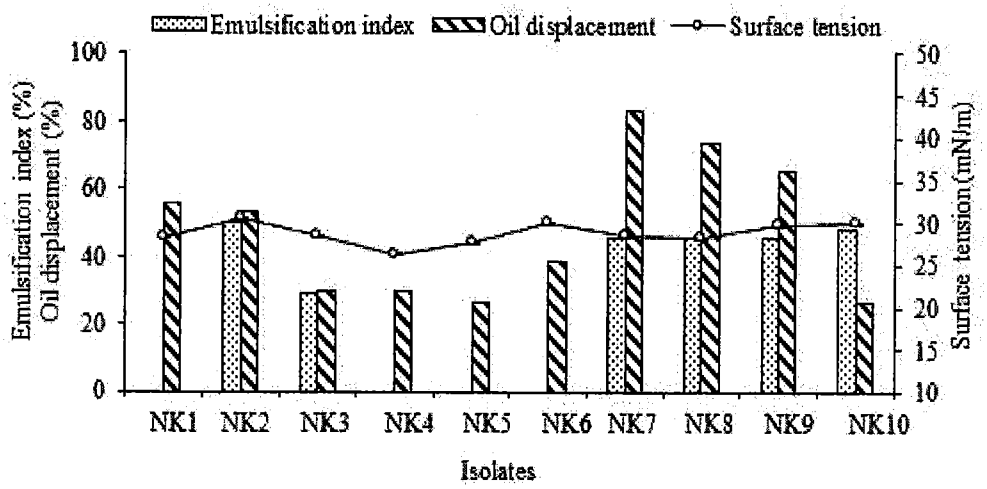


Figure 1. Cell-free broth surface tension (mN/m), emulsification index (%) and oil displacement (%) of the isolated strains cultivated in HM using crude rice bran oil as carbon source.

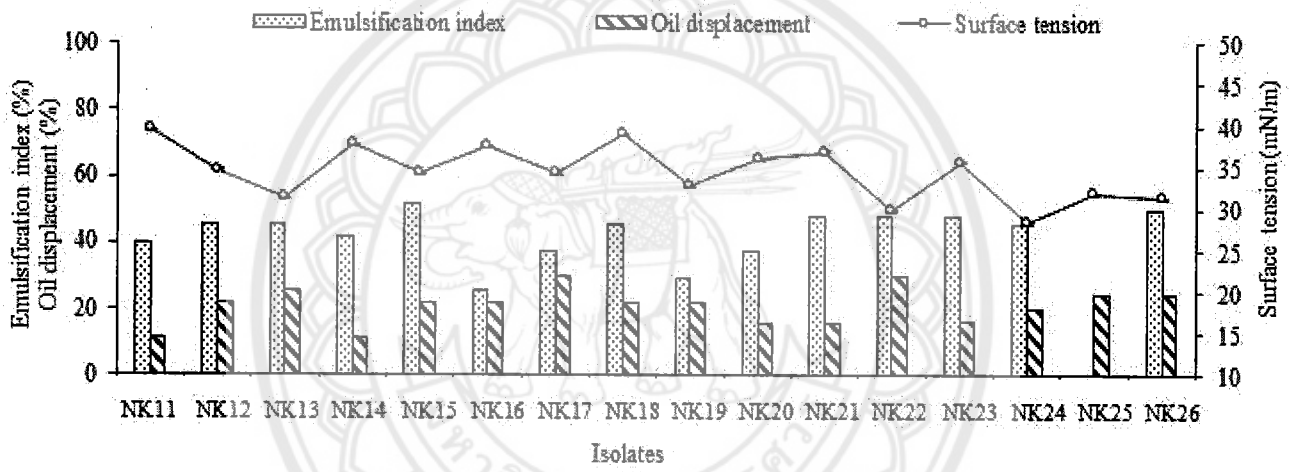


Figure 2. Cell-free broth surface tension (mN/m), emulsification index (%) and oil displacement (%) of the isolated strains cultivated in HM using wax as carbon source.

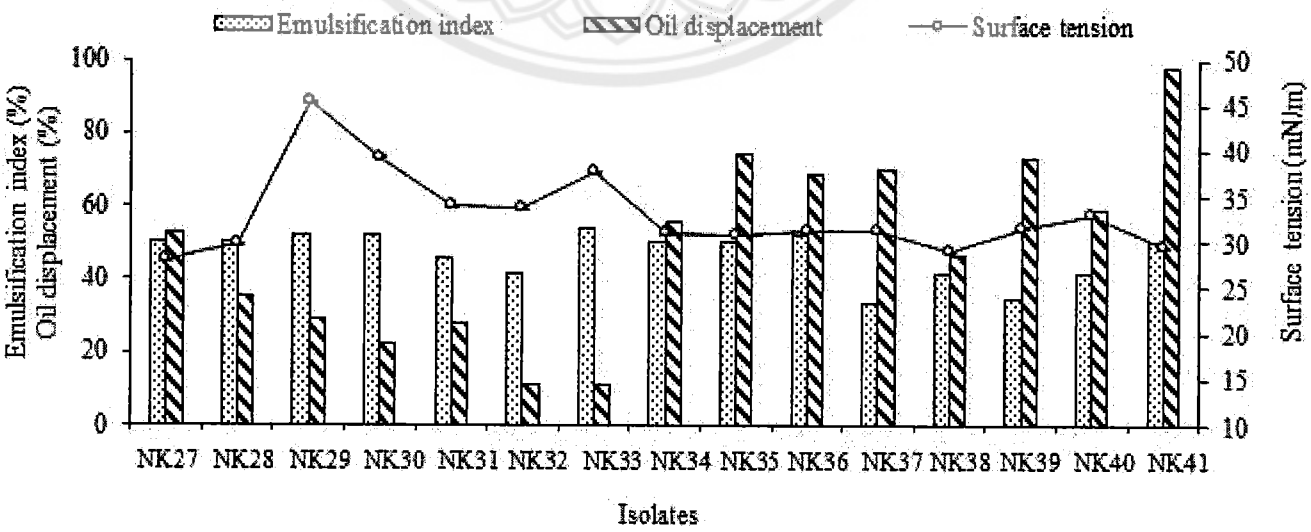


Figure 3. Cell-free broth surface tension (mN/m), emulsification index (%) and oil displacement (%) of the isolated strains cultivated in HM using soapstock as carbon source.

3.2 Selection of alkaliphilic bacteria for biosurfactant production

CMD value was used to evaluate surface activity of the produced biosurfactant in cell-free broth. It was determined by calculating graph intersection from two equations showed in Figure 4. The high CMD value indicated that the produced biosurfactant provided great interfacial tension reduction between air-water interface. NK8, NK22 and NK41 had CMD values of 18.5, 6.0 and 23.0 times respectively. Molecular identification of the isolates was performed with NK8, NK22 and NK41 strains by comparing 16S rRNA gene sequencing from Macrogen Inc to the database of known 16S rRNA sequences. The molecular identification of these strains show that these strains belongs to: *Brevibacterium casei* (Strain NK8), *Microbacterium paraoxydans* (Strain NK22) and *Pseudomonas mendocina* (Strain NK41). *Pseudomonas* spp. have been in the pathogens list of Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. Therefore, *Brevibacterium casei* NK8 was selected for further study.

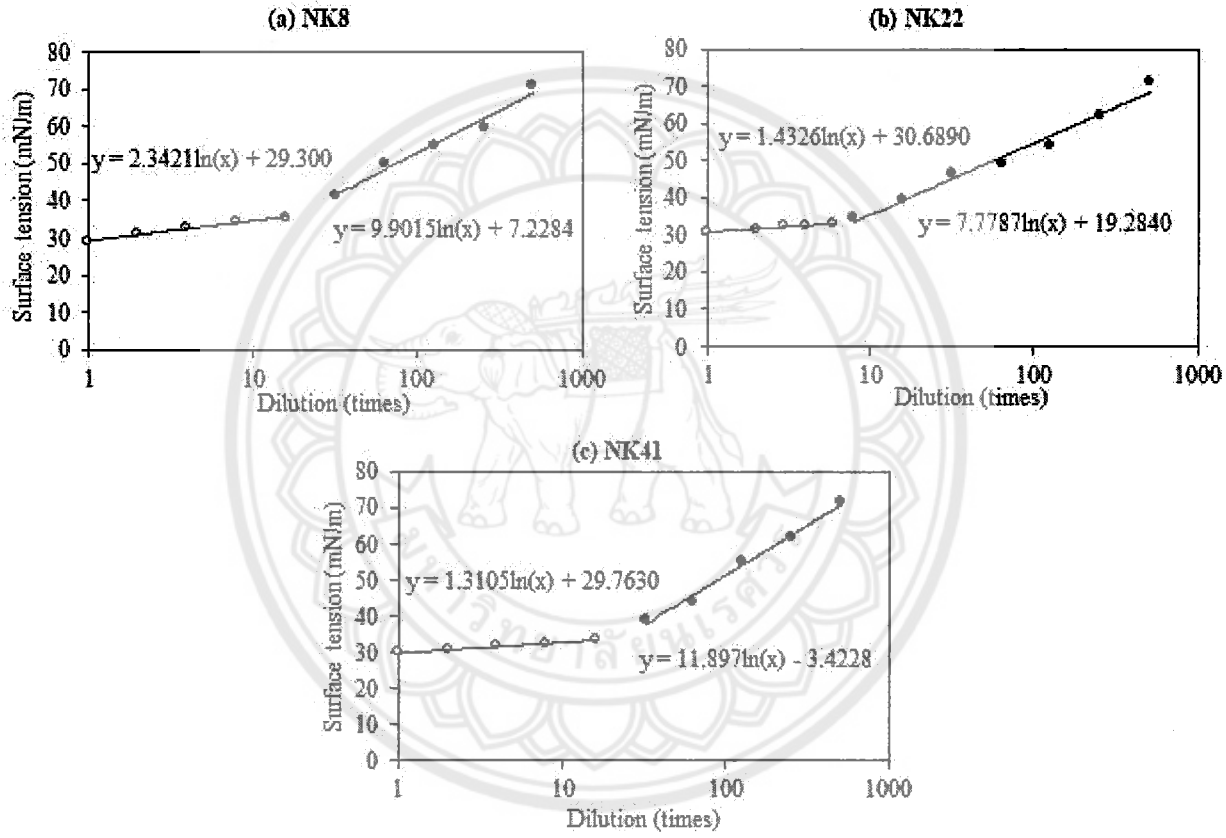


Figure 4. Surface tension of cell-free broth dilutions of (a) NK8, (b) NK22 and (c) NK41.

3.3 Utilization of agricultural/agro-industrial wastes for biosurfactant production by alkaliphilic bacteria

This research considered on the using of agricultural/agro-industrial wastes instead of glucose and oil to enhance cost-effective biosurfactant production. Moreover, the using of oily-byproduct lead to the cleaning problem of pilot-scale fermenter. The lignocellulosic wastes were pretreated by alkali hydrolysis during media sterilization process. The majority of hemicellulose and some portion of lignin are dissolved away from cellulose into pre-hydrolysis liquid through depolymerization and degradation (Bujanovic et al., 2012). This pre-hydrolysis liquid contains carbon sources for bacterial growth. Various agricultural/agro-industrial wastes used in the research were rice husk, durian shell, corn husk and defatted rice bran. Defatted rice bran provides greater biosurfactant production than other wastes (Figure 5(a)). The lower amount of *Brevibacterium casei* NK8 in HM broth of rice husk was from

the attachment on the remaining biomass, while pre-hydrolysis process (Figure 5(b)). Defatted rice bran contains starchy, cellulosic polysaccharide, lipid and soluble proteins remains unutilized (Lee et al., 2009; Jojima et al., 2010). Therefore, the higher biosurfactant production from the vegetable oil extracted waste might due to the using of sugar as substrate couple with residual oil as inducer. Jain et other wastes were almost degraded from al. (2013) produced biosurfactant from several lignocellulosic wastes by alkaliphilic *Klebsiella* sp. RJ-03. They also reported the higher biosurfactant yield obtained from de-oiled *Jatropha* cake (1.58 g/L) than rice husk (0.94 g/L). The vegetable oil extracted wastes were found to be the promising substrate with respect to yield of biosurfactant.

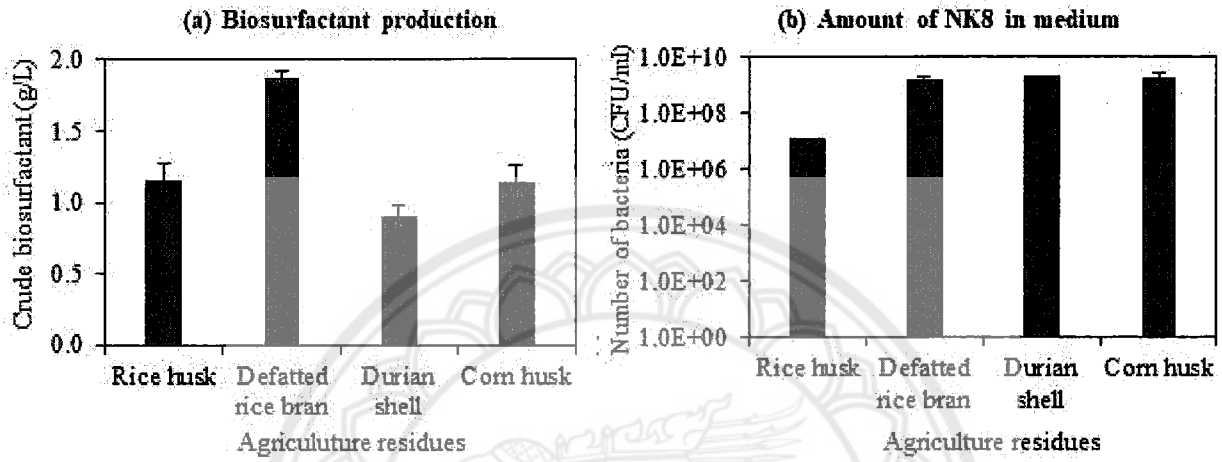


Figure 5. Amount of crude biosurfactant (a) and number of *Brevibacterium casei* NK8 in media (b) after culturing with agricultural/agro-industrial wastes in HM broth.

4. Conclusions

Biosurfactant producing bacteria were found from alkaline contaminated soils collected from rice bran oil refinery plant. Among 41 alkaliphilic bacteria, 14 strains could reduce surface tension of HM broth lower than 30 mN/m using oily-byproducts as substrate. Emulsification index and oil displacement values were varied which resulted from different chemical structure of the produced biosurfactant. *Brevibacterium casei* NK8 was the effective biosurfactant-producing bacteria that provide CMD values up to 18.5 times. The production of biosurfactant from *Brevibacterium casei* NK8 with pretreated defatted rice bran under alkaline condition proved to be a useful application of alkaliphilic bacteria. This benefit plays an important role in the assessment of the economic feasibility of agricultural/agro-industrial wastes as substrates for biosurfactant production. In addition, the optimization of media compositions and culturing conditions should be studied in future research.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to Nanthorn Paorach, for her assistance during the isolation of biosurfactant-producing alkaliphilic bacteria. The research was funded by Naresuan University Research Fund (R2562C003).

6. References

Bramhachari, P. V., Kishor, P. B., Ramadevi, R., Kumar, R., Rao, B. R., & Dubey, S. K. (2007). Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VBOS3. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 44–51.

Bujanovic, B.M., Goundalkar, M.J., & Amidon, T.E. (2012). Increasing the value of a biorefinery based on hot-water extraction: lignin products. Tappi Journal, 11, 19–26.

Chen, W.C. Juangb, R.S., & Weic, Y.H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. Biochemical Engineering Journal, 103, 158-169.

Gutnick, D.L., & Bach, H. 2017. Biosurfactants. Elsevier: Reference Module in Life Sciences.

Hassan, S.S., Williams, G.A., & Jaiswal, A.K. (2018). Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. Trends in Biotechnology, 1-4.

Horikoshi, K. (1996). Alkaliphiles-from an industrial point of view. FEMS Microbiology Reviews, 18, 259-270.

Jain, R.M., Mody, K., Joshi, N., Mishra, A., & Jha, B. (2013). Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant productionand its application in bioremediation. International Journal of Biological Macromolecules, 62, 52–58.

Jain, R.M., Mody, K., Mishra, A., & Jha, B. (2012). Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. Carbohydrate Polymers, 87, 2320-2326

Jojima, T., Omumasaba, C.A., Inui, M., & Yukawa, H. (2010). Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 471-480.

Khondee, N., Tathong, S., Pinyakong, O., Müller, R., Soonglerdsongpha, S., Ruangchainikom, C., Tongcumpou, C., & Luepromchai, E. (2015). Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY19 and their recovery by foam fractionation. Biochemical Engineering Journal, 93, 47-54.

Koppram, R., Tomás-Pejó, E., Xiros, C., & Olsson, L. (2014). Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. Trends in Biotechnology, 32, 46-53.

Lee, J.E., Seo, E.J., Kweon, D.H., Park, K.M., & Jin, Y.S. (2009). Fermentation of rice bran and DRB for butanol production using *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19, 482-490.

Paudel, S.R., Banjara, S.P., Choi, O.K., Park, K.Y., Kim, Y.M., & Lee, J.W. (2017). Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: current state and challenges. Bioresource Technology, 245, 1194–1205.

Satyanarayana, S., Raghukumar, T., & Shivaji, S. (2005). Extremophilic microbes: diversity and perspectives. Current Science, 89, 78-90.