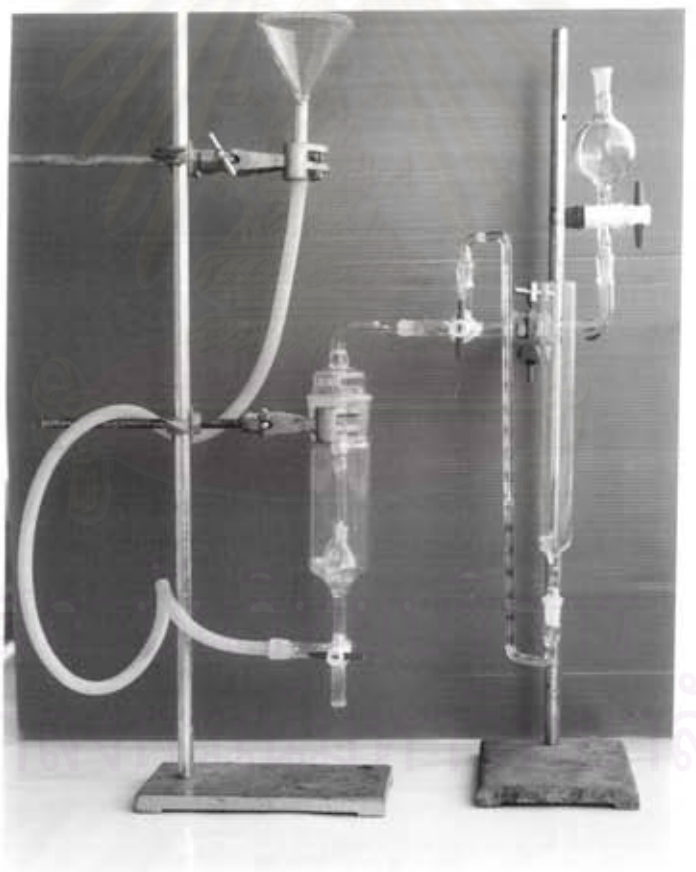
บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองและเคมีภัณฑ์

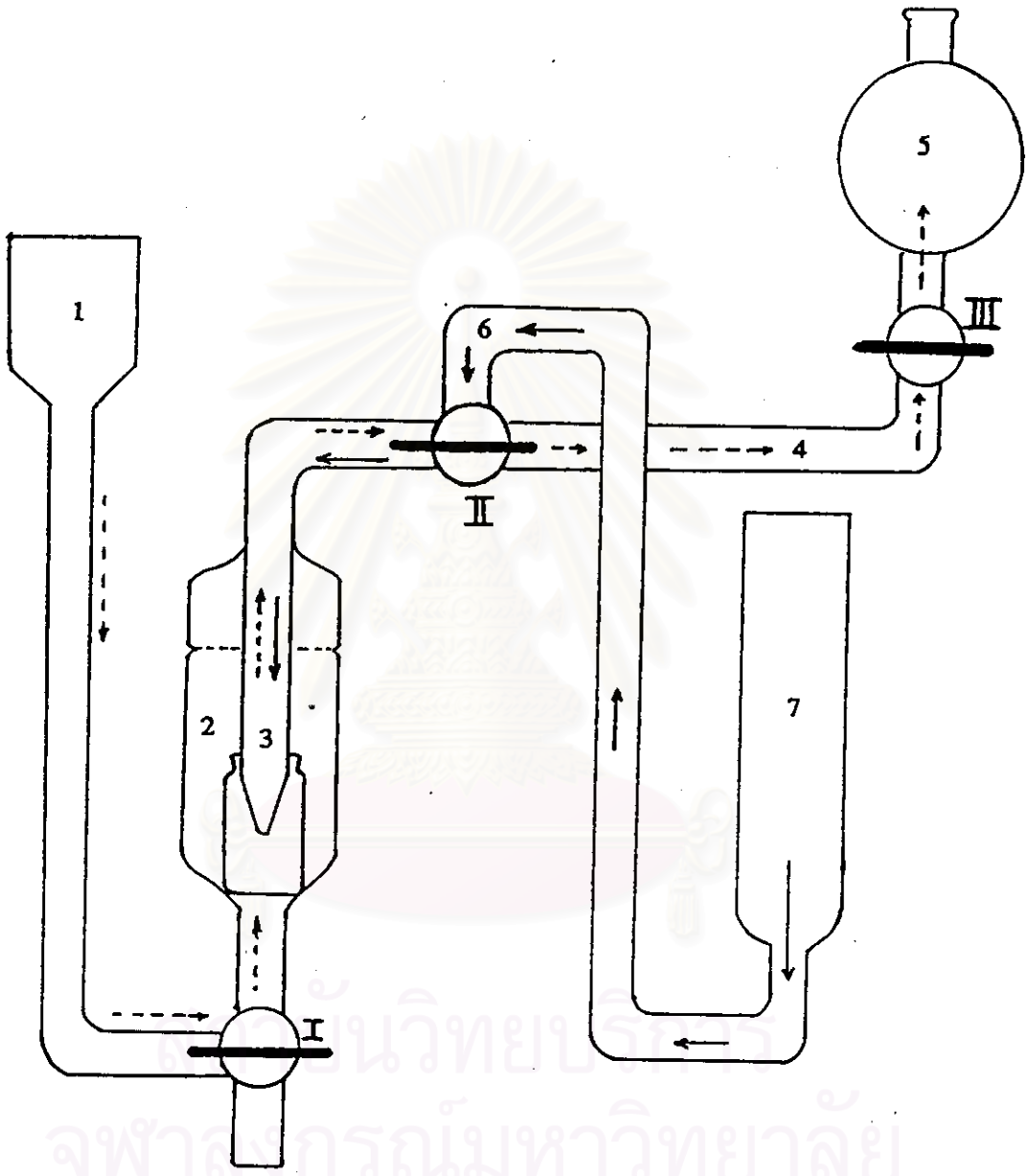
2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิว

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าแรงตึงผิวตลอดการทดลองนี้ เป็นอุปกรณ์ที่ได้ทำการสร้างขึ้นโดยใช้แก้วเป็นวัสดุตามแบบที่อธิบายในเอกสารอ้างอิง (Tasakorn ,1977) ลักษณะของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัย

รูปที่ 2.2 ไดอะแกรมของเครื่องวัดแรงดึงผิวที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

⟵····· แสดงทิศทางการแทนที่อากาศภายในเครื่องมือด้วยน้ำกลั่น

⟵—— ทิศทางการไหลของตัวอย่างในการวัดค่าแรงดึงผิว

เครื่องวัดแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้ ใช้วัดค่าแรงตึงผิวของของเหลวด้วยวิธีการที่เรียกว่า drop-volumne method เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวัดค่าแรงตึงผิวของของเหลว(surface tention) และค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวประจัน (interfacial tention) การวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นนี้ได้ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25± 2^0ซ ตลอดการวิจัย

วิธีการวัดเริ่มต้นด้วยการเติมน้ำกลั่นลงในส่วนที่ 1 ของเครื่องมือแล้วปล่อยน้ำเข้าสู่ระบบด้วยการเปิดวาลที่ I ปล่อยให้น้ำกลั่นไหลเข้าไปในทุกส่วนของเครื่องมืออย่างช้าๆ โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศ ยกเว้นส่วนที่ 6 และ 7 โดยบิดวาลที่ II ให้น้ำกลั่นไหลผ่านไปยังส่วนที่ 5 ได้แต่ไม่สามารถไหลเข้าไปในส่วนที่ 6 และ 7 ได้ จากนั้นแทนที่น้ำกลั่นในระบบด้วยสารตัวอย่างโดยเติมสารตัวอย่างลงในส่วนที่ 5 และปล่อยน้ำกลั่นทิ้งทางปลายหลอดของส่วนที่ 3 เมื่อสารตัวอย่างเข้าแทนที่น้ำกลั่นในระบบได้อย่างสมบูรณ์แล้วจึงบิดวาลที่ II ปล่อยสารตัวอย่างจากส่วนที่ 5 เข้าสู่ส่วนที่ 6 และ 7 ของเครื่องมือ อย่างช้าๆ โดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศจนถึงระดับที่เหมาะสมซึ่งได้ทำการทดสอบไว้ก่อนแล้ว จึงบิดวาลที่ II อีกครั้งหนึ่ง โดยเป็นการเปิดทางให้สารตัวอย่างไหลจากส่วนที่ 7 ผ่านส่วนที่ 6 ไปยังปลายหลอดของส่วนที่ 3 ของเครื่องมือ เมื่อสารตัวอย่างไหลออกจากปลายหลอดหมายเลข 3 ด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 1 หยดต่อ 1 นาทีแล้ว ให้ทำการเก็บสารตัวอย่าง 10 หยด นำมาหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักต่อหยดจากนั้นนำน้ำหนักที่ได้ไปคำนวนหาค่าแรงตึงผิวของสารตัวอย่าง

วิธีการคำนวน

$$\text{ค่าแรงตึงผิว (S.T.)} = \frac{F}{S} = \frac{m \times g}{S}$$

เมื่อ F คือแรงที่ทำให้น้ำหยดลงมา = m x g

m = มวลต่อหยดของของเหลว หน่วยเป็นกรัม

g = แรงดึงดูดของโลก = 981 ซม./วินาที ^{2}

ค่า S คือเส้นรอบวงของปลายหลอดหยดที่ของเหลวหยดลงมา = 0.525 เซนติเมตร

$$\therefore \text{ค่าแรงตึงผิว (S.T.)} = \frac{m\,(981)}{0.525}$$

และมีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ไดน์ (dyne)

2.1.2 อุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA

เครื่อง (shaker) รุ่น G-35 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น R-88 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA

เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/Vis spectrophotometer) รุ่น PR-1 ของบริษัท Shimadzu., Japan

กระดาษกรอง (Millipore membrane) รุ่น GS ppre size 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation, USA

เครื่องปั๊ม(multistatic pump) รุ่น 2-6200, 2-2601 ของบริษัท Buchler Instruments, USA

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerator centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA

ตู้ลามินาไฟล์ว (lamina flow) รุ่น W-760 ของบริษัท Olympus, Japan

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH-CO1-764604 ของบริษัท Olympus, Japan

กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ของบริษัท Becco, Germany

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Cooperation, Japan

ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freeze) อุณหภูมิ -20°C รุ่น FO 535 ของบริษัท Sanyo Electric Co.,Ltd, Japan

2.1.2 เคมีภัณฑ์

แบคโต-เปปโตน (Bacto-Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

กลูโคส (glucose) ของบริษัท E.Merck, Germany

แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2 SO_4$ ของบริษัท E. Merck, Germany

แอมโมเนียมไนเตรท ($NH_4 NO_3$) ของบริษัท E. Merck, Germany

แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4 Cl$) ของบริษัท E. Merck, Germany

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท E. Merck, Germany

อาหารเหลวนิวเตรียนท์ (nutrient broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

เอทานอล (ethanol) ของบริษัท E. Merck, Germany

เมทานอล (methanol) ของบริษัท E. Merck, Germany

อีดีทีเอ (EDTA) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merk, Germany

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

2.2 จุลินทรีย์

1. *Bacillus subtilis* 3/38 แยกได้จากเต้าเจี้ยว ในตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี โดย ผศ. จิราภรณ์ ธนียวัน และคณะ ,2533

2. *Torulopsis glabrata* ATCC 15126

3. *Saccharomyces cerevisiae*

4. จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มอื่นๆ จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้แก่

กลุ่มยีสต์ : *Tolulopsis glabrata*

Saccharomycopsis lipoly

Hansenula anmala

Candida lipolytica

Pichia kluyveri

กลุ่มแบคทีเรีย : *Micrococcus luteus*

Pseudomonas aeruginosa

Bacillus subtilis 3/38

Escherichia coli

กลุ่มรา : *Aspergillus niger*

Penicilluim sp.

Fusarium sp.

Cladosporuim sp.

2.3 การศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38

2.3.1 การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิว

ทำโดยการขีด *Bacillus subtilis* 3/38 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์เอการ์ (nutrient agar) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำแต่ละโคโลนีมาทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการนำไปขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแอลบี (LB agar ภาคผนวกหมายเลข 1.8) ที่มีน้ำมันดิบ (crude oil) 20 ไมโครลิตร แผ่ปกคลุมผิวหน้าอย่างสม่ำเสมอนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง ตรวจสอบและคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้บริเวณใส (clear zone) สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3.2 การทดสอบความสามารถในการฆ่าของ *Bacillus subtilis* 3/38 ต่อเชื้อทดสอบกลุ่มต่างๆ

โดยนำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 2.3.1 มาขีดไขว้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแอลบี (ภาคผนวกหมายเลข 1.8) ที่มีเชื้อทดสอบกลุ่มต่างๆ เจริญอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ตรวจและวัดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ

การเตรียมเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ ทำได้โดยคัดเลือกตัวแทนของจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์กลุ่มละ 4-5 สายพันธุ์ เลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรีย โดยใช้อาหารเหลวนิวเตรียนท์บรอท (nutrient broth ภาคผนวกหมายเลข 1.3) จุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อวายเอ็ม (YM medium ภาคผนวกหมายเลข 1.1) ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ปริมาตร 50 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง และกลุ่มราบนอาหารแข็งพีดีเอ (PDA medium ภาคผนวกหมายเลข 1.4) จากนั้น เจือจางให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยการนับด้วย

- อุปกรณ์นับเม็ดเลือด(haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไม้พันสำลีจุ่มน้ำกลั่นที่มีเซลล์จุลินทรีย์เจือจางอยู่มา กวาดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.3 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (lipase activity) ของ *Bacillus subtilis* 3/38

โดยนำ *Bacillus subtilis* 3/38 ขีดไขว้ลงบนอาหารแข็งแอลบี ที่มีส่วนผสมของไตรบิวไทริน (tributyrin) และผงกอลล์ (gall powder) (ภาคผนวกหมายเลข 1.9) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้น

2.4 <u>การทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดย</u> *Bacillus subtilis* 3/38

2.4.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension)

การวัดค่าแรงตึงผิวทำได้โดยใช้เครื่องวัดแรงตึงผิวที่สร้างขึ้น (รูปที่ 2.1) ซึ่งทำการวัดโดยอาศัยหลักที่ว่า เมื่อของเหลวหยดลงมาด้วยอัตราเร็วเท่ากัน น้ำหนักต่อหยดของๆ เหลวจะแปรผันโดยตรงกับค่าแรงตึงผิว โดยที่อุณหภูมิของการวัดคงที่อยู่ที่ 25± 2 องศาเซลเซียส

2.4.2 การวัดหาค่าอีมัลชั่น อินเด็กซ์ (emulsion index , E_{24})

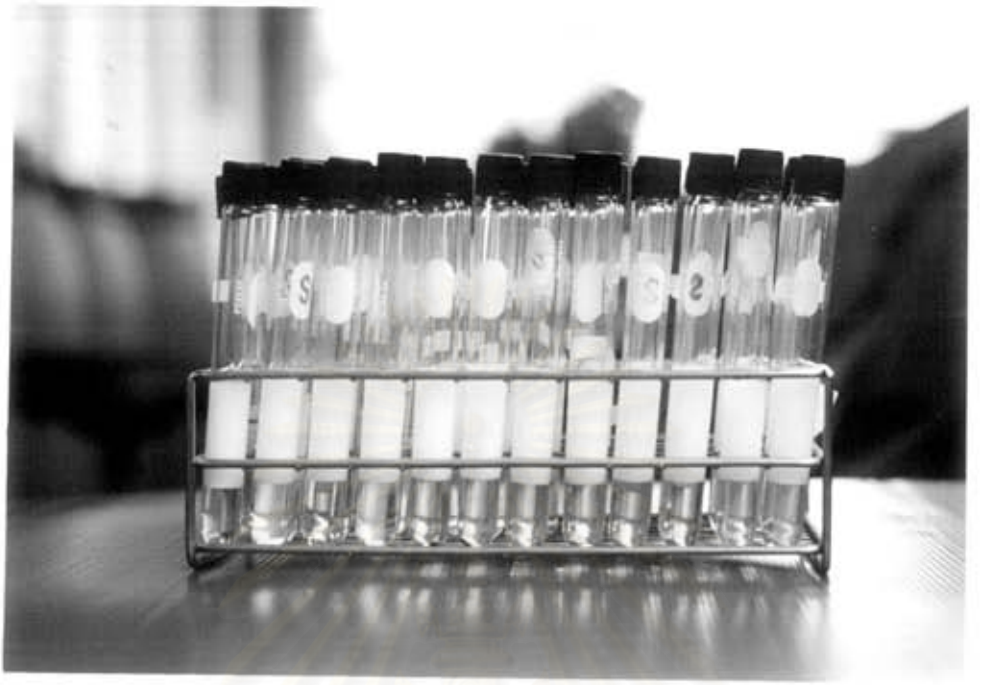
บรรจุน้ำมันก๊าดปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปั่นผสม (vortex) เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง วัดความสูงของอีมัลชั่นที่ได้นำมาคำนวณหาค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) โดยนำความสูงของอีมัลชั่นที่ได้หารด้วยความสูงของของเหลวทั้งหมด(ส่วนใสรวมกับอีมัลชั่น)แล้วคูณด้วย 100 ลักษณะของอีมัลชั่นแสดงดังรูป 2.3

$$\text{ค่า } E_{24} = \frac{h_E}{h_S} \times 100$$

h_E = ความสูงของอีมัลชั่น

h_S = ความสูงของของเหลวทั้งหมด

I 17196311



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะอีมัลชั่นที่เกิดจากการผสมของน้ำเลี้ยงเชื้อกับน้ำมันก๊าด

2.4.3. การทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมัน (oil displacement) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* 3/38

ทำการศึกษาโดย นำจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตรที่บรรจุน้ำ 40 มิลลิลิตรมาหยดน้ำมันดิบปริมาตร 15 ไมโครลิตรลงบริเวณผิวหน้าของน้ำ จากนั้นจึงหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าน้ำมันดิบ สังเกตวงกลมของการกระจายตัวของน้ำมันดิบ วัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลาง เพื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่การกระจายตัวของน้ำมัน 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันเท่ากับ 1 หน่วยลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน แสดงดังรูปที่ 2.4

พ.ท. การกระจายตัวของน้ำมัน $= \pi r^2$

r = รัศมีการกระจายตัวของน้ำมันดิบ

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะการกระจายน้ำมันของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

2.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ และติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus subtilis* 3/38

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร (define medium ภาค**ผนวกหมายเลข 1.10) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร** บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบ/ นาที ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดค่าแรงตึงผิว และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) ของส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขวดแก้วทรงกรวย ทำโดยเตรียมหัวเชื้อ (starter)ของ *Bacillus subtilis* 3/38 โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียงที่มีอายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด

250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนได้ความหนาแน่นของเชื้อที่ต้องการ โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรจะมีค่าเท่ากับ 0.7 จากนั้นปลูก 4% (ปริมาตร/ ปริมาตร) ของหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร

2.6 <u>การหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u>

ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38 ในขวดเขย่า โดยวัดค่าแรงตึงผิวและการเกิดอีมัลชั่นของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เตรียมหัวเชื้อและเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.5 โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร ศึกษาภาวะต่างๆ อันได้แก่

2.6.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดที่กำหนดสูตร ในขวดเขย่า

โดยทำการแปรผันความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 6.5-9 (โดยแปรผันค่าทีละ 0.5) และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยบัฟเฟอร์ โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-8 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวปรับ โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 เพื่อหาความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทำการแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 75, 100 และ 125 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5-9 ใช้ทริส-ไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5 โดยทำการแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 75, 100 และ 125 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

2.6.2 ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการศึกษาหาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในขวดเขย่า ที่มีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงสุด โดยแปรค่าระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร ตั้งแต่ 1-3 วัน บันทึกผลทุก 12 ชั่วโมง

2.6.3 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หาอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ในขวดเขย่าที่ใช้เครื่องเขย่าที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ 20, 25, 30, อุณหภูมิห้อง(30± 2), 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

2.6.4 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ศึกษาการเจริญและ การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่กำหนดสูตร ที่แปรผันแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และแป้ง แหล่งไนโตรเจน เช่น โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และแหล่งแร่ เช่น เหล็กซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) และแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$)

2.6.5 การให้อากาศต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus subtilis* 3/38

หาปริมาณการให้อากาศที่เหมาะสม โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ในขวดเขย่า โดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าตั้งแต่ 100, 150, 200, 250 และ 300 รอบ/นาที

2.7 <u>การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38 ในภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.6</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ในภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 2.6 ติดตามการเจริญของเซลล์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) และค่าการกระจายน้ำมัน

2.8 สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

2.8.1 ความเป็นกรด-ด่าง ต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ในภาวะที่เหมาะสมมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย 1 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และ1 โมลาร์ ของโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 นำไปบ่มที่ 4^{0}ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปวัดค่าแรงตึงผิว และหาค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24})

2.8.2 อุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 0 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-100 วัน โดยทำการวัดค่าแรงตึงผิว และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) ทุกๆ 10 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 ,80 และ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 240 นาที ทำการวัดค่าแรงตึงผิว ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) และวัดการกระจายน้ำมันทุกๆ 30 นาที

2.9 ทดสอบประสิทธิภาพเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นโดยเปรียบเทียบกับเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่นK6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

2.9.1 เปรียบเทียบผลของการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นกับเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS โดยใช้สารละลายโซเดียมไดเดซิลซัลเฟตในน้ำกลั่นเป็นสารละลายมาตรฐาน

วัดค่าแรงตึงผิวสารละลายโซเดียมไดเดซิลซัลเฟตที่ทำการเจือจาง 10^{-1}, $10^{-1.5}$, 10^{-2}, $10^{-2.5}$, 10^{-3}, $10^{-3.5}$, 10^{-4}, $10^{-4.5}$, 10^{-5} โดยใช้เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวทั้งสอง เปรียบเทียบค่าแรงตึงผิวที่วัดได้จากเครื่องทั้งสอง

2.9.2 เปรียบเทียบผลของการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่าง เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นกับเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS โดยใช้ส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเป็นสารตัวอย่างในการวัด

วัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ทำการเจือจาง 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 เท่าในน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวทั้งสอง เปรียบเทียบค่าแรงตึงผิวที่วัดได้จากเครื่องทั้งสอง

2.9.3 การศึกษาจุดวิกฤตของการเจือจางไมเซลล์ (critical micelle dilution , (CMD))

การศึกษาจุดวิกฤตของการเจือจางไมเซลล์ทำได้โดยนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมมาทำการเจือจาง 10 เท่า 100 เท่า 1,000 เท่า 10,000 เท่า แล้ววัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นเปรียบเทียบกับเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย