# บทที่ 2

## อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

### 2.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

2.1.1.อุปกรณ์

- ตู้ปลอดเชื้อแบบ Horizontal laminar flow รุ่น H1 หจก.แลบ เซอร์วิส ,Thailand
- เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G- 10 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc., U.S.A.
- เครื่องเขย่ารุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co .Inc., U.S.A
- เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที หจก.เชค ซายน์ เอน.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge BECKMAN model J2-21 , U.S.A.)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น T-42k ของบริษัท Kontron instruments ,Taiwan
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, Inc. ,U.S.A.
- เครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (Ring tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss , Germany
- เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybernetics , Singapore
- เครื่องวิเคราะห์สาร HPLC รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu , Japan
  คอลัมน์ Reverse phase Lichrocart-C18 endcapped
  ของบริษัท E.Merck ,Darmstadt , Germany
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb , U.S.A.
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV – visible spectrophotometer) รุ่น UV-160 A ของบริษัท Shimadzu , Japan
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy , U.S.A.
- แผ่น TLC ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

2.1.2 เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories,U.S.A.
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (malt extract) ของบริษัท Difco Laboratories,U.S.A.
- แบคโต - เปปโตน (Bacto - peptone ) ของบริษัท Difco Laboratories,U.S.A.-
- อาหารเหลวNB (Nutrient broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- กลูโคส ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- น้ำมันปาล์ม ของบริษัท มรกตอินดัสตรี้ส์ จำกัด
- น้ำตาลทราย ของบริษัทมิตรผล จำกัด
- น้ำมันดิบ (crude oil) จากห้องทดลองของ Prof.Imanaka, Japan
- คลอโรฟอร์ม ของบริษัท BDH laboratory supplies , England
- เมทานอล ของบริษัท BDH laboratory supplies , England
- เอทานอล ของบริษัท BDH laboratory supplies , England
- อะซิโตไนไตรท์ HPLC grade ของบริษัท Lab-scan ,Thailand
- ไอโอดีนชนิดเกล็ด ของบริษัท Univar , Australia
- แอมโมเนียมไนเตรท ($NH_4NO_3$) ของบริษัท J.T.Baker , U.S.A.
- แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- แอมโมเนียมซัลเฟต$(NH_4)_2SO_4$ ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany
- อีดีทีเอ (EDTA) ของบริษัท Sigma chemical. , ST .Louis. ,U.S.A.
-โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ของบริษัท BDH laboratory supplies England
- เซอร์แฟกติน (surfactin) จาก *Bacillus subtilis* ของบริษัท Sigma chemical. ST .Louis. ,U.S.A.

2.2 การติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

2.2.1 การวัดค่าแรงตึงผิว

นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออก โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 $^{o}$ซ ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6 , Kruss, Germany) รูป Tensiometer และวิธีการใช้เครื่องแสดงในภาคผนวก ค

2.2.2 การหาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (CMC)

(Sheppard และ Mulligan, 1987)

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 30 %v/v วัดค่าแรงตึงผิวแต่ละความเข้มข้น ตามวิธีข้อ 2.2.1 นำผลไปวาดกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวกับระดับความเข้มข้น หาจุดวิกฤตของการเกิดไมเซลล์โดยวิธีของ Sheppard และ Mulligan (1987) แสดงในภาคผนวก จ หมายเลข 1

2.2.3 การวัดการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)

( Morikawa และคณะ, 1993)

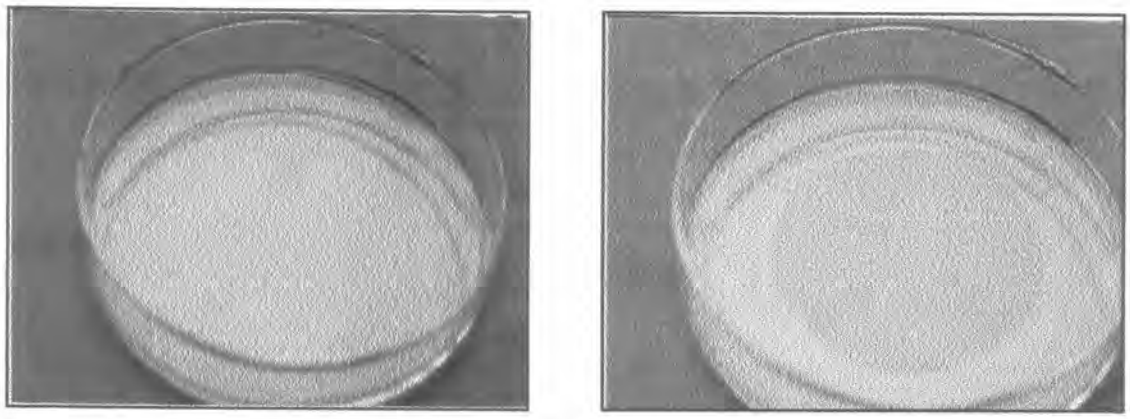
ตวงน้ำ 40 มล. ลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ซม. ที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างของบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟมีค่าเท่ากับ 1 ซม.) หยดน้ำมันดิบ(crude oil) 15 µl ให้ปกคลุมบนผิวน้ำ หยดตัวอย่าง 10 µl อ่านความกว้างของบริเวณใสและคำนวณหาพื้นที่ ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมันแสดงในรูปที่ 18

พื้นที่ของบริเวณใส $= \pi r^2$

เมื่อ r = รัศมีความกว้างของบริเวณใส (cm)

กำหนด 1 ตารางเซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1 หน่วย

วิธีการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันนี้ จะใช้ได้กับสารที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 10 µg หรือ 10 nmol ขึ้นไป ดังนั้น ถ้าสารตัวอย่างมีความเข้มข้นมาก ให้เจือจางจนสามารถวัดค่าได้ และคูณกลับด้วยความเจือจาง (dilution factor) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการกระจายตัวของน้ำมันกับความเจือจางแสดงในภาคผนวก ฉ



A ก่อนหยดตัวอย่าง B หลังหยดตัวอย่าง

รูปที่ 18 ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมันจากวิธีทำในข้อ 2.2.3

2.2.4 การวัดการเพิ่มจำนวนของเชื้อ

ก.การวัดค่าดูดกลืนแสง โดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ถ้าน้ำเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นมาก ให้เจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น ก่อนวัดค่าดูดกลืนแสง

ข. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมา 40 มล.มาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง แล้วนำเซลล์เปียกไปอบที่ 60 $^{0}$ซ ทิ้งไว้ข้ามคืน นำไปชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ด้วยเครื่องชั่งละเอียด จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.2.5 การวัดค่าพีเอช โดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าพีเอช ด้วยเครื่องวัดพีเอชเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช หลังจากเลี้ยงเชื้อที่ภาวะต่างๆ

2.3 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

2.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum)

ทำโดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากหลอดอาหารเอียงอายุ 24 ชม. ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) ปริมาตร 50 มล. บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 $^{o}$ซ ) เป็นเวลาประมาณ 15 ชม. จนได้ความหนาแน่นของเชื้อที่ต้องการ โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ($OD_{600}$) ได้อยู่ในช่วง 3 – 4 จึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ ปริมาตร 4 %v/v ในการศึกษาการคัดเลือกชนิดของอาหาร องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.3.2 ภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมตามข้อ 2.3.1 ปริมาตร 4 %v/v ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ต้องการศึกษา ปริมาตร 50 มล.ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 $^{o}$ซ) เป็นเวลา 24 ชม.หรือตามเวลาที่ต้องการศึกษา

2.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.4.1 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้

ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน น้ำทะเล และ อาหาร จนได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร NBและอาหาร YMที่บรรจุในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาทดสอบว่าสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้หรือไม่ โดยป้ายเชื้อที่มีอายุ 24 ชม. บนอาหาร NA ที่ปกคลุมด้วยน้ำมันดิบ 20 ไมโครลิตร บนจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ±2 $^{o}$ซ) เป็นเวลา 1 – 7 วัน ถ้าสังเกตเห็นบริเวณใสไม่มีน้ำมันดิบบนผิวหน้าของอาหารรอบๆ โคโลนี แสดงว่าโคโลนีนั้นสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ (Morikawa และคณะ, 1993)

2.4.2 การคัดเลือกเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ เลี้ยงบนอาหารเอียงจนมีอายุ 24 ชม. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวของ NB และ YM (ตามชนิดของอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อข้างต้น) ปริมาตร 50 มล.ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 $^{o}$ซ เป็นเวลา 24 ชม. ติดตามประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวตามข้อ 2.2.1 เปรียบเทียบกันแต่ละเชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มี

เปอร์เซ็นต์การลดลงมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ไปคัดเลือกอีกครั้ง โดยนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร YM ที่มี 3 %w/v ของโซเดียมคลอไรด์ ติดตามประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการวัดค่าแรงตึงผิวตามวิธีในข้อ 2.2.1 และวัดค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3 คัดเลือกเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

2.5 การจำแนกสกุลของเชื้อที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงจากข้อ 2.4 มาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง (cultural characteristic) ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) และสมบัติของกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือสมบัติทางชีวเคมี (metabolic or biochemical characteristic) อ้างอิงตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9 (Holt และคณะ, 1999) และตามวิธีของ Persson และ Molin (1987) โดยศึกษาเทียบกับ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 357 และใช้ key ตามหนังสือ Laboratory Exercises in microbiology (Wistreich และ Lechtman, 1988)

2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NB จนอายุครบ 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี

2.5.2 ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) บันทึกลักษณะโคโลนี รูปร่างของแบคทีเรียและการย้อมติดสีแกรม

2.5.3 การทดสอบสมบัติของกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือสมบัติทางชีวเคมี

1. การเตรียมเชื้อเพื่อนำไปทดสอบ ใช้เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ใส่เชื้อลงบนอาหารชนิดต่างๆ และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (ภาคผนวก ข) ดังต่อไปนี้

- การเจริญบนอาหาร MacConkey agar
- การเจริญบนอาหาร Triple sugar iron agar (TSI)
- กิจกรรมเอนไซม์แคตาเลส (Catalase activity)
- ทดสอบออกซิเดส (Oxidase test)
- การใช้ซิเตรท (Citrate utilization)
- การย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction)
- การย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)
- การรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction)
- การออกซิไดซ์และการหมัก (Oxidation - Fermentation)

- การหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation)

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °ซ) เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบผลการทดสอบแต่ละการทดสอบดังรายละเอียดในภาคผนวก ข

2.5.4 ทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility) โดยการ stab เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว (semi-solid media) จนถึงก้นหลอด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(30±2 °ซ) เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลอง ตามภาคผนวก ข

2.6 การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.6.1 การผลิตและการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.4 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร (defined medium ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) ที่มีกลูโคสเข้มข้น 2 %w/vเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมไนเตรท ($NH_4NO_3$)เข้มข้น 0.4 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่า pH 6.8 -7.0 เลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °ซ) เป็นเวลา 48 ชม. นำน้ำเลี้ยงเชื้อไป ปั่นแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °ซ ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปสกัดแยกสารลดแรงตึงผิว โดยนำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนโดยการปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6.0 โมลาร์ จนมีค่า pH 2.0 ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °ซ ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที รวมตะกอนและล้างด้วยน้ำกลั่น พีเอช 2.0 จึงนำมาละลายในโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ ($NaHCO_3$, pH 8.6) จากนั้นนำสารมาสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและเอทานอล อัตราส่วน 2 : 1 (Zhang และ Miller, 1992) โดยใช้กรวยแยก ทำการสกัดแยก 3 ครั้ง นำส่วนล่างของสารละลายมาระเหยด้วยเครื่อง evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °ซ (B"U"CHI Rotavapor R-3000, Switzerland) ขูดสารที่ติดอยู่ในขวดแก้วก้นกลม เพื่อนำมาทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3 และ เก็บสารในขวดฝาเกลียวขนาดเล็กที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC HPLC และ HPLC-MS เพื่อหามวลโมเลกุลต่อไป และเรียกสารที่สกัดได้นี้ว่า สารบริสุทธิ์บางส่วน

2.6.2 การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Thin - layer chromatography (TLC)

ในการทดลองใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 (บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany ขนาด 20 x 20 ซม.หนา 0.2 มม.)เป็นเฟสคงที่ โดยมีสารละลายคลอโรฟอร์ม ต่อ เมทานอล ต่อ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 65 : 25 : 4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีสารเซอร์แฟกตินของบริษัท Sigma chemical. ST. Louis. ,U.S.A.เป็นสารลดแรงตึงผิวมาตรฐาน นำสารบริสุทธิ์บางส่วนและเซอร์แฟกติน เข้มข้น 1 mg/ml จุดบนแผ่น TLC ปริมาตร 20 µl แล้วนำไปใส่ในภาชนะปิดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ 120 ml ทิ้งไว้ประมาณ 1 - 2 ชม.จนเฟสเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางประมาณ 16 ซม.. จากนั้นนำแผ่น TLC มาผึ่งให้เฟสเคลื่อนที่ระเหยจนแห้ง จึงนำมาตรวจผล โดยนำไปอบด้วยไอของไอโอดีนในกล่องพลาสติกปิดสนิท ทิ้งไว้ประมาณ 15 -20 นาที เปิดฝากล่องแล้วทำเครื่องหมายบริเวณที่เป็นสีน้ำตาลเข้ม ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้ไอของไอโอดีนระเหยหมด และขูดซิลิกาเจล 60 บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ เพื่อนำมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ด้วยสารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ และทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3

2.6.3 การเตรียมสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Thin Layer chromatography (TLC) (Preparative TLC)

วิธีการทดลองจะคล้ายกับการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในข้อ 2.6.2 แต่จะใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 ที่มีความหนา 2 มม. ใช้สารที่สกัดได้เข้มข้น 10 -20 มก./มล. ปริมาตร 1 มล. จุดเป็นเส้นตรงบนแผ่น TLC โดยสารบริสุทธิ์บางส่วน 1 ตัวอย่างจะใช้แผ่น TLC 1 แผ่น สกัดแยกสารลดแรงตึงผิวออกจากซิลิเจล 60 ด้วยสารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ แล้วนำไประเหยแห้งโดยเครื่อง evaporator ระเหยแห้งภายใต้ภาวะสุญญากาศ ทดสอบการกระจายตัวน้ำมัน ตามวิธีข้อ 2.2.3 เก็บสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้นี้ ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC และ HPLC-MS เพื่อหามวลโมเลกุลต่อไป

2.6.4 การวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ โดยวิธี HPLC และ HPLC-MS

นำสารที่ทำบริสุทธิ์โดยวิธี TLC จากข้อ 2.6.1ละลายในสารละลาย10%อะซิโตไนไตรท์ หรือ 100 % อะซิโตไนไตรท์ 500 µl เขย่าจนสารตัวอย่างละลายหมด นำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC เครื่อง HPLC (Shimadzu LC-3A) ใช้คอลัมน์ Reverse phase Lichrocart-$C_{18}$ endcapped ขนาด 250 x 4 มม.ของบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany ลิเนียร์เกรเดียนท์ 0 - 100 %ของตัวทำละลาย B ใน A โดยตัวพา A คือ 10 %อะซิโตไนไตรท์+0.1 %กรดไตรฟลูโอโรอะซิตริก(TFA) และ ตัวพา B คือ 90 % อะซิโตไนไตรท์+0.1 %กรดไตรฟลูโอโรอะซิตริก(TFA)

เป็นตัวพา มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจผลโดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร เก็บลำดับส่วนที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 0.5 มาระเหยตัวพาออกจนแห้ง นำไปทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3 จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการทดสอบการกระจายน้ำมันโดยเครื่อง HPLC-MS เพื่อหามวลโมเลกุล

2.7 การเลือกชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

-ชนิดของอาหารเหลวที่ใช้ในการคัดเลือก ได้แก่

1. อาหาร NP และ NB+3%NaCl (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.3)
2. อาหาร LB และ LB+3%NaCl (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.4)
3. อาหารเหลวกำหนดสูตร (defined medium : DM) และ DM+3%NaCl (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5)
4. อาหารYM และ YM+3%NaCl (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.1)

บรรจุ 50 มล. ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล.

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมตามวิธีข้อ 2.3.1 ลงในอาหารแต่ละชนิด เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm2^{\circ}$ซ) ภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชม. และนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปตรวจวัดการเจริญตามวิธีข้อ 2.2.4 ก และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตามวิธีข้อ 2.3.1

2.8 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ในการศึกษาองค์ประกอบของอาหาร เพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2.1 นั้น สามารถแปรชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่คัดเลือกได้ แต่ควรศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารที่คัดเลือกจากข้อ 2.7 ก่อน เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2.8.1 ศึกษาการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้

ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้ตามวิธีข้อ 2.7เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm2^{\circ}$ซ) ภาวะขวดเขย่าด้วยอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชม.โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชมในช่วงเวลา 24 ชม.แรกและทุก 6 ชม.ในเวลาต่อมา ติดตามวัดการเจริญตามวิธีข้อ 2.2.4 ก และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิวตามวิธีข้อ 2.2.1 พร้อมทั้งวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

2.8.2 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.4 ในอาหารเหลวที่คัดเลือกได้ตามวิธีข้อ 2.7 ซึ่งได้แก่ อาหารเหลวกำหนดสูตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.3.1 และเลี้ยงเชื้อในภาวะตามวิธีข้อ 2.3.2 เป็นเวลา 24 ชม.แต่แปรแหล่งคาร์บอนต่างๆดังนี้ กลูโคส ซูโครส (น้ำตาลทรายมิตรผล) และน้ำมันปาล์ม ความเข้มข้น 2 % w/v เมื่อได้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้วจึงแปรปริมาณเป็น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 %w/v ติดตามการเจริญตามวิธีในข้อ 2.2.4 ข และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงผิว โดยวัดค่าแรงตึงผิวตามวิธีข้อ 2.2.1 , หาค่า $CMC^{-1}$ ตามวิธีข้อ 2.2.2 , และวัดค่าการกระจายของน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3 พร้อมทั้งค่า พีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

2.8.3 การหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ตามวิธีข้อ 2.4 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร โดยมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากวิธีข้อ 2.8.2 เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.3.1 และเลี้ยงเชื้อในภาวะตามวิธีข้อ 2.3.2 เป็นเวลา 24 ชม.แปรชนิดแหล่งไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท ($NH_4NO_3$,0.4 %w/v) โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$, 0.85 %w/v) ,แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$, 0.535 %w/v) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$, 0.661 % w/v) โดยเปรียบเทียบปริมาณธาตุไนโตรเจนให้มีปริมาณเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรท ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร (คำนวณจากปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท 0.4 %w/v) เมื่อได้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้วจึงแปรปริมาณเป็น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 % w/v ติดตามวัดการเจริญตามวิธีข้อ 2.2.4 ข และประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 2.2.1 หาค่า $CMC^{-1}$ ตามวิธีข้อ 2.2.2 และวัดค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3 พร้อมทั้งวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

2.8.4 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้จากวิธีข้อ 2.4 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5 ) ที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมตามวิธีข้อ 2.8.2 และ2.8.3 แต่แปรแหล่งเกลือแร่ ได้แก่ เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$), แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) และซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) โดยเว้นการเติมเกลือแร่แต่ละชนิดครั้งละหนึ่งชนิดเปรียบเทียบกับอาหารที่มีเกลือแร่ครบทั้ง 3 ชนิด เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.3.1และเลี้ยงเชื้อในภาวะตามวิธีข้อ 2.3.2 เป็นเวลา 24 ชม. ติดตามการเจริญตามวิธีข้อ 2.2.4 ข และประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.2.1 , หาค่า

$CMC^{-1}$ ตามวิธีข้อ 2.2.2 และวัดค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3 พร้อมทั้งวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

2.9 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเชื้อที่คัดเลือกได้

2.9.1 หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิต โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ตามวิธีข้อ 2.4 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ปรับปรุงสูตรแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) ในภาวะตามวิธีข้อ 2.3.2 เป็นเวลา 72 ชม. โดยเตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.3.1 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชม.ในช่วงเวลา 24 ชม.แรก และทุก 6 ชม.ในเวลาต่อมา จนครบ 72 ชม.

2.9.2 หาอายุและปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม เตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายเชื้อจากอาหารเอียงอายุ 24 ชม.ลงในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ปรับปรุงสูตรแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) แต่แปรอายุของเชื้อเป็นระยะก่อนถึงช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด (early log phase อายุ 6 ชม.) ระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด(mid log phase อายุ 15 ชม.) และระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญคงที่ (stationary phase อายุ 30 ชม.) พร้อมทั้งแปรผันปริมาตรของหัวเชื้อแต่ละระยะคิดเป็น 1 4 และ 8 %v/v ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 2.3.2 เป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.9.1

2.9.3 หาค่าพีเอชของอาหารเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยการเตรียมอาหารที่มีบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอชต่างๆ โดยควบคุมค่าพีเอช 4.0 และ 5.0 ด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 และ 7.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์และ พีเอช 8.0 และ 9.0 ด้วย ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการควบคุมพีเอช เตรียมหัวเชื้อที่เหมาะสมตามวิธีข้อ 2.9.2 เลี้ยงเชื้อในภาวะตามวิธีข้อ 2.3.2

2.9.4 ศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว(ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) ภาวะที่เหมาะสม เป็นเวลา 72 ชม. โดยเตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.8.1 และพีเอชของอาหารเริ่มต้นตามวิธีข้อ 2.8.2 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชม.ในช่วงเวลา 24 ชม.แรก และ ทุก 6 ชม.ในเวลาต่อมา จนครบ 72 ชม.

ติดตามวัดการเจริญโดยการชั่งน้ำหนักแห้งตามวิธีข้อ 2.2.4 ข และประสิทธิภาพการผลิตสารลดแรงตึงชีวภาพ โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะต่างๆ วัดค่าแรงตึงผิวตามวิธีข้อ 2.2.1 , และวัดค่าการกระจายน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3 พร้อมทั้งวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

2.10 สมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยเชื้อที่คัดเลือกได้

นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนน้ำใสไปศึกษาสมบัติต่างๆต่อไปนี้

2.10.1 ศึกษาผลของพีเอชต่อความเสถียร

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ มาปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ โดยแปรผันค่าพีเอช ตั้งแต่ 2 4 6 8 10 และ 12 นำไปบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 12 ชม.และนำมาวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่เตรียมได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปรับพีเอชเท่าเดิม 100 เท่า ตามวิธีข้อ 2.2.1

2.10.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียร

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °ซ ทำการติดตามผลโดยวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้เจือจางด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm2$ °ซ) ทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 5 ชม.

2.10.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ต่อความเสถียร

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ มาเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยแปรผันความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, และ 30 %w/v ตั้งทิ้งไว้ 12 ชม.วัดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่เตรียมได้เจือจาง100 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่าเดิม เพื่อรักษาความเข้มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ตามวิธีข้อ 2.2.1

2.10.4 ศึกษาวัดค่าดรรชนีการเกิดอิมัลชัน(Emulsion Index)

(Patel และ Desai, 1993)

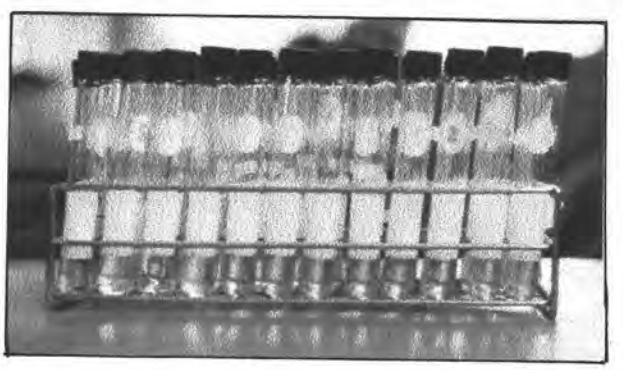
บรรจุสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆเช่น เฮกซาเดกเคน (hexadecane) ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) ไอโซออกเทน (iso-octane) น้ำมันก๊าด (kerosene) น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) เบนซีน (benzene) ไซลีน (xylene) และ ทอลูอีน (toluene) เป็นต้น ปริมาตร 6 มล.ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาดกลางที่มีขนาดเท่ากัน เติมส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 4 มล. ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง(vortex mixer) เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของอิมัลชันที่เกิดขึ้นบนส่วนบนของสารละลาย ซึ่งมีลักษณะเป็นครีมสีขาว (ดังแสดงในรูปที่ 19) วัดความสูงของอิมัลชันที่ได้นำมาคำนวณหาค่าอิมัลชันอินเด็กซ์ ที่ 24 ชม. ($E_{24}$) โดยนำความสูงของอิมัลชันหารด้วยความสูงของของเหลวทั้งหมด(ส่วนน้ำใสรวมกับอิมัลชัน) แล้วคูณด้วย 100

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

$h_E$ = ความสูงของอิมัลชัน

$h_S$ = ความสูงของของเหลวทั้งหมด

รูปที่ 19 ลักษณะการเกิดอิมัลชัน



2.11 สมบัติบางประการของสารบริสุทธิ์บางส่วน

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำมาตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์จนได้พีเอช 2.0 รวมตะกอนมาละลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ สกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มต่อเอทานอล อัตราส่วน 2 : 1 จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator ภายใต้ภาวะสุญญากาศ ตามวิธีข้อ 2.6.1 เนื่องจากสารบริสุทธิ์บางส่วน มีปริมาณน้อย แต่สารมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อเป็นส่วนน้ำใส ดังนั้นจึงละลายสารด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (0.1M $NaHCO_3$) จนมีความเข้มข้น 20 mg/l แล้วจึงนำไปศึกษาสมบัติเบื้องต้นต่อไป

2.11.1 ศึกษาความเสถียรของสารต่อ พีเอช ตามวิธีข้อ 2.10.1 อุณหภูมิ 100 $^{o}$ซ ตามวิธีข้อ 2.10.2 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ตามวิธีข้อ 2.10.3 และหาค่าอิมัลชันอินเด็กซ์ ($E_{24}$)ตามวิธีในข้อ 2.10.4

2.11.2 ศึกษาสมบัติของสารที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนเทียบการสารลดแรงตึงผิวทางเคมี

นำสารลดแรงตึงผิวที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนตามวิธีข้อ 2.6.1 และสารลดแรงตึงผิวทางเคมี ได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate , SDS) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุลบ (anionic surfactant) ไทรทอน เอ็กซ์ –100 (Triton X-100) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุ(nonionic surfactant) และ ซีทิลไพริดิเนียม คลอไรด์ (Cetylpyridinium chloride, CPC) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุบวก มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นต่างๆ ติดตามประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวัดค่าแรงตึงผิวตามวิธีข้อ 2.2.1 แต่ละความเข้มข้น เพื่อหาค่า CMC ตามวิธีของ Duvnjak, Cooper, และKosaric (1982) แสดงในภาคผนวก จ หมายเลข 2 และวัดการกระจายน้ำมันตามวิธีข้อ 2.2.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดแรงตึงผิว ค่า CMC และค่าการกระจายตัวของน้ำมันระหว่างสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้กับสารลดแรงตึงผิวทางเคมี