บทที่ 4
วิธีการทดลอง

4.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

4.1.1 อุปกรณ์

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) บริษัท ISSCO , U.S.A. รุ่น VS-124

เครื่องปั่นเหวี่ยง บริษัท Kubota Corporation, J รุ่น Kubota 5100 apan

เครื่องผสมสาร(vortex mixer) บริษัท Scientific Industries, Inc., U.S.A.รุ่น G-560E

เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer) บริษัท Kruss, Germany รุ่น K6

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท Spectronic Instruments, U.S.A. รุ่น Spectronic 20 Genesys

หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo,Japan รุ่น HL24ADY

ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Hot Air Oven) บริษัท Memmert, Germany รุ่น ULM 500

ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 10 ลิตร รุ่น Biostat ®ED บริษัท B Braun Biotech Internation, Germany.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter) รุ่น MP220 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland.

4.1.2 เคมีภัณฑ์

น้ำมันปาล์มดิบ บริษัทชุมพรอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มจำกัด, ประเทศไทย

น้ำมันดิบ (crude oil) ห้องทดลอง Prof.Imanaka, Japan

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany[1]

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany[1]

โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) บริษัท J.T.Baker, U.S.A. [1]

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany[1]

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท J.T.Baker, U.S.A. [1]

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท J.T.Baker, U.S.A. [1]

โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) บริษัท BDH laboratory supplies, England[1]

โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4.2H_2O$) บริษัท BDH laboratory supplies, England[1]

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A. [1]
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท BDH laboratory supplies, England [1]
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) บริษัท BDH laboratory supplies, England[1]
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท BDH laboratory supplies, England[1]
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A. [1]
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) บริษัท J.T.Baker, U.S.A. [1]
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany [1]
โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany[1]
กรดซัลฟลูริก (H_2SO_4) บริษัท BDH laboratory supplies, England[1]
กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) บริษัท BDH laboratory supplies, England[1]
กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany [1]
อีดีทีเอ (EDTA) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A. [1]
แคลเซียม-แพนโททีเนต (Calcium-Pantothenate) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A. [1]
ไบโอติน (Biotin) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A. [1]
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (*p*-aminobenzoic acid) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A. [1]
ไพริดอกซีน-ไฮโดคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A. [1]
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A. [1]
ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl) บริษัท Sigma chemical., ST Louis, U.S.A. [1]

หมายเหตุ [1] สารเคมีมีความบริสุทธิ์ในระดับ ห้องปฏิบัติการ

4.2 เชื้อจุลินทรีย์

ในการทดลองใช้จุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ที่ได้จากการคัดแยกในงานวิจัยของ อารีย์ (2542)ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 วิธีการทดลอง

4.3.1การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.3.1.1การเตรียมหัวเชื้อ (ณรงค์,2543)

จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas* sp.A41 ในหลอดอาหารเอียงที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเอียง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บเป็นหัวเชื้อสำหรับใช้ในการทดลอง เมื่อต้องการทดลอง ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารเอียงดังกล่าวลงในหลอดอาหารเอียงอีกครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ออกจากอาหารเอียงด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ควบคุมความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ที่ได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้อยู่ในช่วง 0.7-0.8 จากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารกำหนดสูตร (ตามภาคผนวก ก.) ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4.3.1.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ(ณรงค์,2543)

- การเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่เขย่า

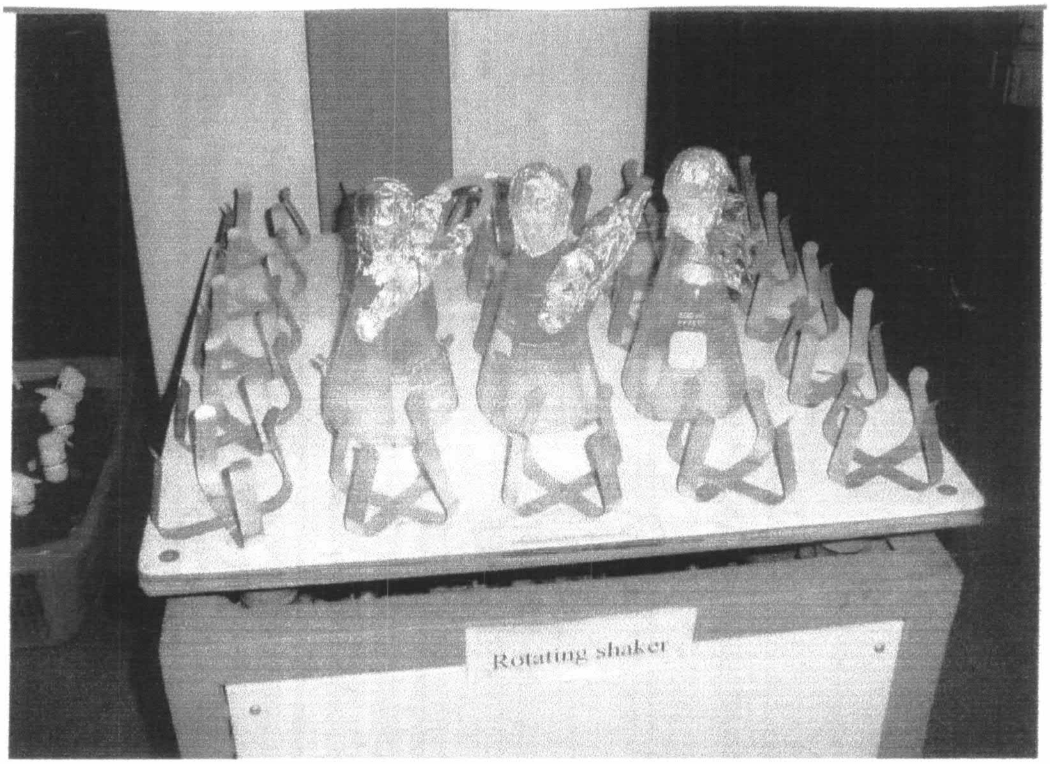
ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.3.1.1 ปริมาณ 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารกำหนดสูตร (ตามภาคผนวก ก.)โดยให้แหล่งคาร์บอน คือ น้ำมันปาล์มดิบ ในปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 4.1) ทำการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน เป็น 5, 50, 100, 150 และ 200 ทำการเก็บตัวอย่างตามเวลาเพื่อนำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าแรงตึงผิว ปริมาณน้ำมันปาล์ม และปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ

- การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

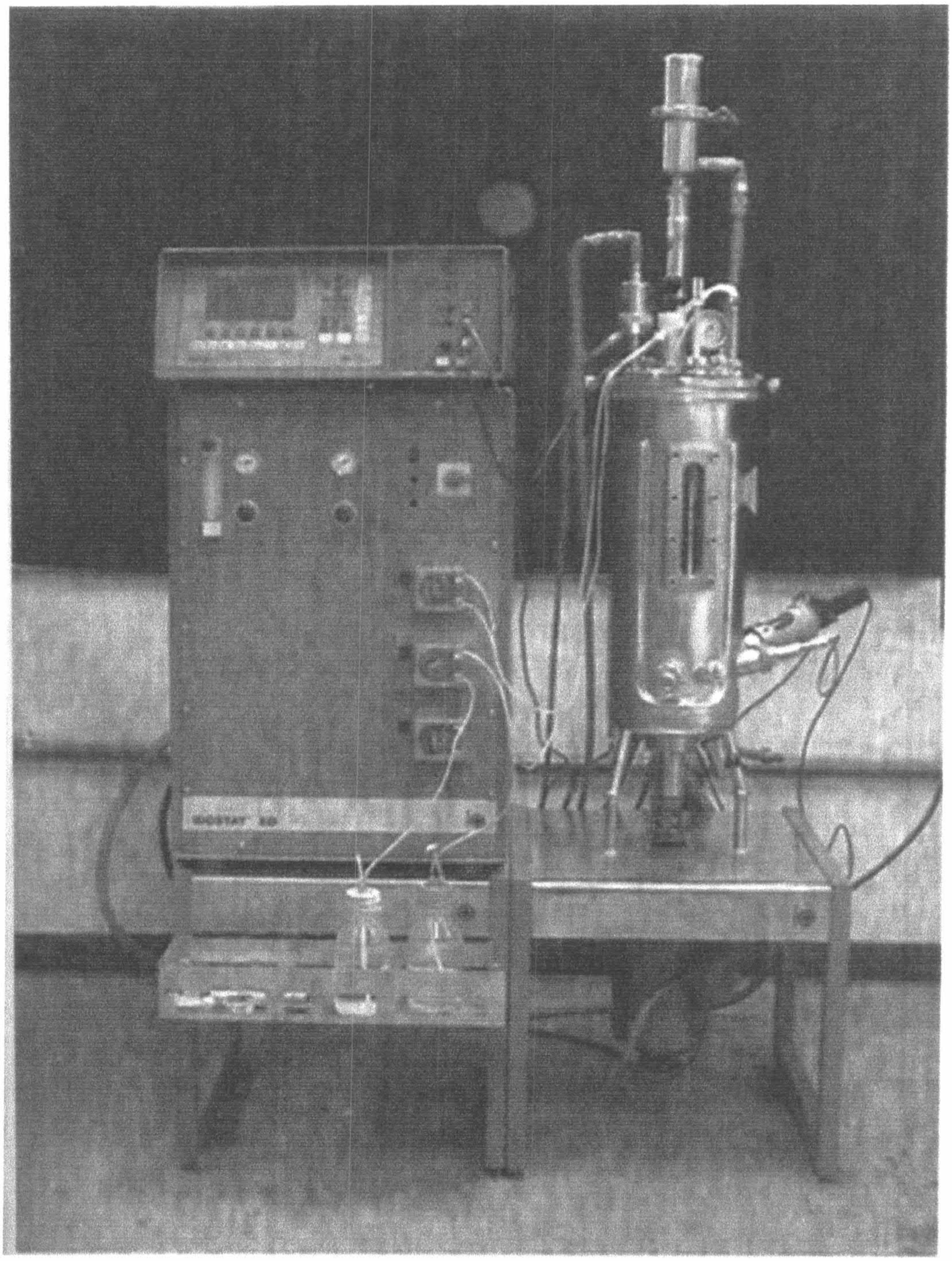
ในการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (รูปที่ 4.2) โดยการถ่ายเชื้อตั้งต้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว 5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างที่ 7.5 และควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ความเร็วรอบใบพัดกวน 600 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างตามเวลาเพื่อนำมาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆสำหรับนำไปใช้ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องต่อไป คือ ปริมาณเซลล์ ค่าแรงตึงผิว ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบ และปริมาณไนโตรเจน

- การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงในถังหมักนั้น ทำโดยการถ่ายเชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.3.1.1 ปริมาณ 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว 4 ลิตร เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างที่ 7.5 ค่าการละลายของอากาศควบคุมที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว จากนั้นทำการป้อนอาหารเข้าไปโดยให้อัตราการป้อนเป็น แบบทวีคูณวิธีการคำนวณดังภาคผนวก.ค จนกระทั่งอาหารเหลวในถังมีปริมาตร 10 ลิตร จึงหยุดการป้อน ทำการเก็บตัวอย่างตามเวลา แล้วนำมาทดสอบน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าแรงตึงผิว ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบ และปริมาณไนโตรเจน



รูปที่ 4.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เขย่า



รูปที่ 4.2 ถังหมักขนาด 10 ลิตร

4.3.2 การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

4.3.2.1 การหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (ณรงค์,2543)

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรและปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเซลล์เปียกใส่กระทงอลูมิเนียมฟลอยแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักเซลล์คงที่ โดยชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ด้วยเครื่องชั่งละเอียดซึ่งผลการทดลองเป็นข้อมูลจากการหาน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างซึ่งทำเพียงครั้งเดียว คำนวณหาปริมาณเซลล์ในหน่วยกรัมต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อน (Coefficient of variation = $\frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$) ของวิธีการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง มีค่า 9.3 เปอร์เซ็นต์

4.3.2.2 การวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

- การวัดค่าแรงตึงผิว (ณรงค์,2543)

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปวัดค่าแรงตึงผิวที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring tensiometer K6, Kruss, Germany) โดยในแต่ละตัวอย่างจะทำการวัดทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยวิธีการวัดแสดงดัง ภาคผนวก ง โดยมีค่าค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อน 5.03 เปอร์เซ็นต์

- การสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ณรงค์,2543)

นำน้ำหมักตัวอย่างปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำน้ำหมักส่วนใสมาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้เป็น 2 ซึ่งโปรตีนอื่นๆที่ปนมาจะตกตะกอนแยกชั้นออกมา ซึ่งควรตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกอีกที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสมาสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มและเอทานอล อัตราส่วน 2ต่อ1 (Sim และคณะ ,1997) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้กรวยแยก ทำการสกัดแยก 3 ครั้ง แล้วนำส่วนล่างมาระเหยด้วยเครื่องระเหยจนแห้งภายใต้สภาวะสูญญากาศ โดยควบคุมอุณหภูมิเครื่องระเหยที่ 40 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

- การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

(Effectiveness test) (พรสุข, 2544)

นำน้ำมันที่ทราบปริมาณแน่นอน (ประมาณ 5 กรัม) เทลงในน้ำทะเล ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ที่อยู่ในกรวยแยก จากนั้นหยดสารละลายของสารลดแรงตึงผิวปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงไปโดยใช้หลอดฉีดยา จากนั้น ปิดจุกกรวยแยกตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 2 นาที แล้วเปิดจุก ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นไขก็อกเปิดสารละลายส่วนล่าง(น้ำมันที่ปนในน้ำ)ออกมา 50 มิลลิลิตร นำมาสกัดน้ำมันออกด้วยคลอโรฟอร์ม 50 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตรด้วยคลอโรฟอร์ม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์ การกระจายตัว (\%Effectiveness)} = \frac{\text{มวลของน้ำมันที่กระจายตัวในน้ำ}}{\text{มวลน้ำมันที่ใช้ทดสอบ}} \times 100$$

ค่าสัมประสิทธิ์ความคลาดเคลื่อนของการทดสอบ 3 ครั้ง 1.44 เปอร์เซ็นต์

4.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารตั้งต้น

4.3.3.1 การวัดปริมาณน้ำมันปาล์มดิบ(วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ,2545)

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ด่าง ให้ต่ำกว่า 2 โดย กรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ มาสกัดน้ำมันออกโดยการเติมเฮกเซนปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำส่วนของเฮกเซนเทลงในภาชนะที่ทราบน้ำหนักแน่นอน โดยเทผ่านกระดาษกรองที่มีโซเดียมซัลเฟตอยู่เพื่อกำจัดน้ำที่อาจหลงเหลืออยู่ จากนั้นนำไประเหยเฮกเซนบนอ่างอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในเดสิกเกเตอร์ 30 นาที และชั่งน้ำหนักภาชนะที่เพิ่มขึ้น ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือปริมาณน้ำมันที่สกัดได้

4.3.3.2 การวัดปริมาณไนโตรเจน (วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ,2545)

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม สารละลายออกซิไดซ์(สารละลายโซเดียมซิเตรทและโซเดียมไฮดรอกไซด์) 0.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกด้วยพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร แล้วนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)