บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และ วิธีดำเนินการทดลอง

2. 1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองและเคมีภัณฑ์

2. 1. 1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องวัดแรงตึงผิว (tensiometer) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss, Germany.

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

เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-33 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., USA.

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

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

เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-Top Centrifuge) รุ่น H-103 N series ของบริษัท Kokusan, Japan.

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

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (uv-visible spectrophotometer) รุ่น UV-160 A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องระเหยแห้ง (lyophilizer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd.., Japan.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

กระดาษกรอง (Millipore membrane) รุ่น GS ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation, USA.

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

ตู้ลามินาโฟล์ว (laminar flow) รุ่น W-760 ของบริษัท Olympus, Japan.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560 E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA.

เครื่องบดวัตถุดิบ (hammer mill) รุ่น SKI ของบริษัท Retsch GMBH, West Germany.

เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldatherm) ของบริษัท Gerhardt, Germany.

2. 1. 2 <u>เคมีภัณฑ์</u>

เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) จากรา *Trichoderma reesei* ของบริษัท Novo Industries, Denmark.

เอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดส (β -Glucosidase) จากรา *Aspergillus niger* ของบริษัท Sigma chemical., ST. Louis., USA.

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

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

กลูโคส (glucose) ของบริษัท E. Merk, Darmstadt, Germany.

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

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของบริษัท E. Merk, Darmstadt, Germany.

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ของบริษัท E. Merk, Darmstadt, Germany.

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ของบริษัท E. Merk, Darmstadt, Germany.

อีดีทีเอ (EDTA) ของบริษัท Sigma chemical., ST. Louis., USA.

อะซิโตรไนไทร์ (Acetonitrile) ของบริษัท E. Merk, Darmstadt, Germany.

ไตรฟลูโอโรอะซิติกแอซิด (Trifluoroacetic acid) ของบริษัท Sigma chemical., ST. Louis., USA.

โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรท (Sodium Potassium Tartrate) ของบริษัท Fluka AG. Buchs, Switzerland.

เซอแฟกติน (Surfactin) จาก *Bacillus subtilis* ของบริษัท Sigma chemical., ST. Louis., USA.

2. 2 จุลินทรีย์

1. *Bacillus licheniformis* F2.2 แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักดอง จากตลาดอัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม ทำการแยกโดย ผศ. จิราภรณ์ ธนียวัน

2. *Torulopsis glabrata* ATCC 15126

3. *Saccharomyces cerevisiae*

4. จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มอื่นๆ จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้แก่

กลุ่มยีสต์ : *Torulopsis glabrata*
Saccharomyces cerevisiae
Candida albicans
Hansenula anomala
Pichia kluyveri

กลุ่มแบคทีเรีย : *Pseudomonas aeruginosa*
Bacillus licheniformis F2.2
Bacillus subtilis 3/38
Escherichia coli
Micrococcus luteus

กลุ่มรา : *Aspergillus niger*

Fusarium sp.

Penicillium sp.

Cladosporium sp.

2. 3 <u>การศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2. 2</u>

2. 3. 1 การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิว

โดยการป้าย *Bacillus licheniformis* F2 .2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์เอการ์ (nutrient agar ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำแต่ละโคโลนีมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการนำไปป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แอลบี (LB agar ภาคผนวก ก. หมายเลข 8) ที่มีน้ำมันดิบ (crude oil) 20 ไมโครลิตร แผ่ปกคลุมผิวหน้าของอาหารอย่างสม่ำเสมอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี

2. 3. 2 การทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบกลุ่มต่างๆของ *Bacillus licheniformis* F2.2

โดยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2. 2 ที่ผ่านการทดสอบจากข้อ 2.3.1 ในอาหารเหลววายอีพีดี (YEPD medium) (ภาคผนวก ก. หมายเลข 5) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปทำปราศจากเชื้อโดยการฉีดผ่านกระดาษกรอง (Millipore filter membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

การเตรียมเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ ทำได้โดยคัดเลือกตัวแทนของจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา กลุ่มละ 4-5 สายพันธุ์ เลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้อาหารเหลวนิวเตรียนท์บรอท (nutrient broth ภาคผนวก ก. หมายเลข 6) จุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อวายเอ็ม (YM medium ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ปริมาตร 50 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มราใช้อาหารแข็งพีดีเอ (PDA medium ภาคผนวก ก. หมายเลข 4) จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยการนับด้วย Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไม้พันสำลีจุ่มน้ำกลั่นที่มีเซลล์จุลินทรีย์เจือจางอยู่มา swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) ใช้ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 10 มม. เจาะลงบนวุ้นเพาะเชื้อ จำนวน 3 หลุมต่อ 1 จานเพาะเชื้อ โดยให้แต่ละหลุมห่างกันพอสมควร หยอด 100 ไมโครลิตรของน้ำเลี้ยงเซลล์ *Bacillus licheniformis* F2.2 ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น หาค่าเฉลี่ยแล้วเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

2. 4 <u>การปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร</u> (สุภาพร, 2536)

นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดที่ผ่านการอบแห้งจนสนิทดี ที่ 80 องศาเซลเซียส มาทำการบดร่อน และคัดขนาด 50 เมช (mesh) และทำการปรับสภาพก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส ด้วยวิธีการดังนี้ ชานอ้อย และ ฟางข้าว ปรับสภาพด้วย 1% NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รำข้าว ผ่านการปรับสภาพด้วย 1% NaOH ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ล้างวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยน้ำประปา จนกระทั่งน้ำที่ผ่านวัสดุออกมา มีความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 7.0 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จึงนำวัสดุที่ผ่านการปรับสภาพมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป

2. 5 การเตรียมไฮโดรไลเสทของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการย่อย 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของ ชานอ้อย ฟางข้าว และ รำข้าว ที่ผ่านการปรับสภาพตามวิธีในข้อ 2.4 ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 150 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มล. ความเข้มข้นของเซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส ที่ 40 และ 60 หน่วย ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบ ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง lyophilizer หรือ freeze dryer แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสท (คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) ตามวิธีการในข้อ 2.8 เก็บสารละลายน้ำตาลที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2. 6 การเตรียมไฮโดรไลเสทของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (Detroy et al., 1981)

เตรียมโดยใช้กรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล ปริมาตร 600 มล. เติมลงในแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการศึกษาปริมาณ 200 กรัม นำไปอบไอน้ำภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จึงนำมาเติมน้ำกลั่น 1200 มล. ผสมให้เข้ากันและกรองด้วยผ้าขาวบาง เอาส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 นอร์มอล จากนั้นกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปหาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl และแบ่งบางส่วนไปหา น้ำหนักแห้ง เพื่อเทียบเป็นน้ำหนักต่อปริมาตร

2. 7 <u>การหาปริมาณไนโตรเจน (nitrogen content) ด้วยวิธี Kjeldahl</u> (Stayermark, 1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ปริมาตร 1-3 มล. ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มล. เติมซอลท์มิกเจอร์ (salt mixture) 7 กรัม (ซึ่งประกอบด้วยไดโปแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) และ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5 H_2O$) ในอัตราส่วน 19 : 1) ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 15 มล. ลงไป จากนั้นนำไปย่อยบนเตาหลุม (digester) ในตู้ควัน จนได้สารละลายใส นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อน จึงค่อยๆ เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มล. และ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 37% (น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ลงไป จากนั้นนำไปกลั่นบนเตากลั่น โดยดักจับแอมโมเนีย (NH_3) ที่เกิดขึ้นด้วยกรดบอริค (H_3BO_3) เข้มข้น 4% (น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2) ผสมอยู่ 3 หยด กลั่นจนสารละลายบอริค มีปริมาตร 200 มล. จึงนำสารละลายที่ได้มาไตเตรต กับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) มาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว และคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์ไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{A \times B \times 1.4}{C}$$

A = ปริมาตรกรด HCl (มล.)

B = ความเข้มข้นของกรด HCl (M)

C = ปริมาตรสารตัวอย่าง (มล.)

2. 8 <u>การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNSA</u> (Bernfeld , 1955)

ผสม 1.0 มล. ของสารละลายที่จะวิเคราะห์ กับ 1.0 มล . ของสารละลาย DNSA (ภาคผนวก ข. หมายเลข 1) เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลานาน 10 นาที ทำให้เย็นลงทันที เติมน้ำปลอดไอออน 10 มล. ลงไป แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาค่าของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยอาศัย กราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น จากน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0 ถึง 200 ไมโครกรัม ต่อ มล.

2. 9 <u>การวัดค่าแรงตึงผิว</u> (surface tension)

หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2.2 ปั่นแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4^{0} ซ ส่วนใสที่ได้นำมาทำการวัดค่าแรงตึงผิวโดยวิธี DeNuoy ring method ด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิว (ring tensoimeter) รุ่น K6 ของบริษัท Kruss Hamburg, Germany

2. 10 <u>การทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมัน (oil displacement) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2</u>

นำจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ที่บรรจุน้ำ 40 มิลลิลิตร มาหยดน้ำมันดิบปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงบริเวณผิวหน้าของน้ำ จากนั้นจึงหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบริเวณผิวหน้าน้ำมันดิบ สังเกตวงกลมของการกระจายตัวของน้ำมันดิบ วัดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลาง เพื่อนำไปคำนวณพื้นที่การกระจายตัวของน้ำมัน กำหนด 1 ตาราง เซนติเมตรของการกระจายตัวของน้ำมันดิบเท่ากับ 1 หน่วย ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมัน แสดงดังรูปที่ 21

พ.ท.การกระจายตัวของน้ำมัน = πr^{2}

r = รัศมีการกระจายตัวของน้ำมันดิบ

รูปที่ 21 แสดงลักษณะการกระจายน้ำมันของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

2. 11 <u>การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขวดแก้วทรงกรวย</u>

ทำโดยเขี่ยเชื้อ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2.2 จากหลอดอาหารเอียงที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิชนิด rotary shaker ด้วยอัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนได้ความหนาแน่นของเชื้อ ที่ต้องการโดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จะได้เท่ากับ 0.7 จึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) ในการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ 4% ของหัวเชื้อใส่ลงในสูตรอาหาร ที่ต้องการศึกษา ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. 12 <u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ และติดตามความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ของ *Bacillus licheniformis* F2.2</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2. 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัด ค่าแรงตึงผิว ของส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่อง Tensiometer ตามวิธีการในข้อ 2. 9

2. 13 <u>การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F 2.2 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u>

2. 13. 1 การศึกษาความเป็นกรดค่าง (pH) เริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่กำหนดสูตร (defined medium) ในขวดเขย่า

เพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F 2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium) ตามภาคผนวก ก หมายเลข 9 โดยผันแปรความเป็นกรดค่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า 4.0-9.0 ด้วยการเติมกรด หรือด่าง (โดยผันแปรค่าทีละ 0.5) และทำการศึกษาควบคุม ความเป็นกรดค่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ด้วยบัฟเฟอร์ตั้งแต่ 6.5-9.0 (โดยผันแปรค่าทีละ 0.5) โดยที่ค่าความเป็นกรดค่าง 6.5-8.0 ใช้ 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวควบคุม ที่ค่าความเป็นกรดค่าง 8.5-9.0 ใช้ 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ เป็นตัวควบคุม บ่มเขย่าตามวิธีการในข้อ 2. 10 ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัด ค่าแรงตึงผิว ของส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่อง Tensiometer ตามวิธีการในข้อ 2. 9

2. 13. 2 การศึกษาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F 2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium) ที่ค่าความเป็นกรดค่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม แปรความเข้มข้นของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งแต่ 25-200 มิลลิโมลาร์ บ่มเขย่าตามวิธีการในข้อ 2. 11 ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัด ค่าแรงตึงผิว ของส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่อง Tensiometer ตามวิธีการในข้อ 2. 9

2. 13. 3 การศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F 2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium) บ่มเขย่าตามวิธีการในข้อ 2. 11 โดยแปรระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 1-3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาวัดค่าแรงตึงผิวตามวิธีการในข้อ 2. 9

2. 13. 4 การศึกษาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* F2 .2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร ที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือแร่ที่เหมาะสม และทำการควบคุมค่าความเป็นกรดค่างเท่ากับ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แปรอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 20-45 องศาเซลเซียส บ่มเขย่าตามวิธีการในข้อ 2. 11 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาวัดค่าแรงตึงผิว ตามวิธีการในข้อ 2. 9

2. 13. 5 การศึกษาการให้อากาศต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus licheniformis* F2 .2

ทำการศึกษาหาปริมาณการให้อากาศที่เหมาะสม โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2 .2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือแร่ที่เหมาะสม โดยการแปรผันความเร็วรอบในการเขย่า ตั้งแต่ 100, 150, 200, 250, 300 รอบ/นาที บ่มเขย่าตามวิธีการในข้อ 2. 11 แล้วจึงนำมาวัดค่าแรงตึงผิว ตามวิธีการในข้อ 2. 9

2. 14 <u>การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการ ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2 .2</u>

2. 14. 1 การศึกษาผลของกลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) กลีเซอรอล (glycerol) และ แป้ง (soluble starch) ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2 .2 ตามวิธีการในข้อ 2.11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium) ตามภาคผนวก ก. หมายเลข 9 แต่แปรชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล และ แป้ง ความเข้มข้น 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บตัวอย่างติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่อง Tensiometer

2. 14. 2 การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อทดแทนการใช้กลูโคส

เลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2 .2 ตามวิธีการในข้อ 2 .11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium) ตามภาคผนวก ก. หมายเลข 9 ที่ไม่เติมกลูโคส แต่ทดแทน และ แปรชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อย รำข้าว ฟางข้าว ชานอ้อย ด้วยเอนไซม์ จากข้อ 2.5 เปรียบเทียบกับการใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสทเท่ากับ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ จากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

2. 14. 3 การหาปริมาณที่เหมาะสมของไฮโดรไลเสทจากฟางข้าว ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2 .2 ในสูตรอาหารตามภาคผนวก ก. หมายเลข 9 แต่ใช้ ไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสท ในช่วง 0.5-2.5 % เก็บตัวอย่าง นำมาวัดค่าแรงตึงผิว

2. 14. 4 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2 .2

เลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2 .2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium) ตามภาคผนวก ก. หมายเลข 9 ยกเว้นมี 2 % ไฮโดรไลเสท ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สาร (organic nitrogen) ที่นำมาศึกษาได้แก่ กากถั่วเหลืองที่ย่อยแล้ว (soybean hydrolysate, SBH) กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยแล้ว ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์สาร (inorganic nitrogen) ที่นำมาศึกษา ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (NH_4SO_4) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) โดยใช้ปริมาณเท่ากันคือ 0.4 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 2.11 เป็นเวลา 1-3 วัน จึงนำมาวัดค่าแรงตึงผิว

2. 14. 5 การหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2 .2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร (defined medium) ตามภาคผนวก ก. หมายเลข 9 ยกเว้นมี 2 % ไฮโดรไลเสท ของฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นแปรปริมาณของ NH_4NO_3 ตั้งแต่ 0.05-1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 2. 11 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาวัดค่าแรงตึงผิว

2. 14. 6 การศึกษา ชนิดและปริมาณของเกลือแร่ ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เลี้ยง *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2 .2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกำหนดสูตร ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม จากนั้นแปรเกลือแร่ เช่น เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 . 7H_2O$) ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 . 7H_2O$) และ แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . H_2O$) เพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 2 . 11 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่อง Tensiometer ตามวิธีการในข้อ 2. 9

2. 15 สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* F2 .2

2.15. 1 ศึกษาความสามารถในการเกิดอีมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

บรรจุน้ำมันก๊าด ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ปั่นผสม (vortex) เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของอีมัลชั่นที่เกิดขึ้น

2. 15. 2 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2 .2 ในภาวะที่เหมาะสมมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย 1 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และ 1 โมลาร์ ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยทำการแปรผัน ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 นำไปบ่มที่ 4^{0} ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดค่าแรงตึงผิว

2. 15. 3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2 .2 ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง, 0 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-100 วัน โดยทำการวัดค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายน้ำมัน ทุกๆ 10 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำการวัดค่าแรงตึงผิว

2. 15. 4 ศึกษาผลของเปอร์เซนต์เกลือ (% NaCl) ต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2 .2 มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ แปรผันเปอร์เซนต์เกลือ (% NaCl) ตั้งแต่ 0, 5, 10, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 30 แล้วจึงทำการวัดค่าแรงตึงผิว

2. 15. 5 ศึกษาจุดวิกฤตของการเจือจางไมเซลล์ (critical micelle dilution, (CMD))

การศึกษาจุดวิกฤตของการเจือจางไมเซลล์ ทำได้โดยนำส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม มาทำการเจือจาง 0-600 เท่า ทำการวัดค่าแรงตึงผิว

2. 16 <u>การตรวจสอบ HPLC profile ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 ด้วยวิธี HPLC</u>

หลังจากเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ F2.2 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ตามต้องการแล้ว นำมาแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4^0 ซ แยกส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วย 6 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก จนมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5 ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4^0 ซ จากนั้นแยกเก็บตะกอนโดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4^0 ซ ละลายตะกอนที่ได้ใน 1 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8. 0 ปริมาตร 1 มล. นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^0 ซ ข้ามคืน โดยเขย่าเป็นครั้งคราว จนกว่าตะกอนจะละลายหมด นำสารละลายที่ได้จากการตกตะกอน 1 มล. มาผ่านคอลัมน์ Toyopak ODS-S เก็บส่วนที่ได้นำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu LC-3A) โดยใช้ Reverse phase Lichrocart-C_{18} endcapped คอลัมน์ขนาด 250 x 4 มม. ID. ของบริษัท E .Merk, Darmstadt, Germany มีลิเนียร์เกรเดียนท์ 0-100 % ของ 10 % และ 90 % อะซิโตไนไทร์ใน 0. 1 % ของกรดไตรฟลูออโรอะซิติก เป็นตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้องตรวจผลโดย UV detector ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ เซอร์แฟกติน มาตรฐาน และแต่ละ peak ได้มีการนำมาทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน (Oil displacement test) ตามวิธีการในข้อ 2.10