

การทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
ของแบคทีเรียเอนโดไฟติกจากเสาวรส
Determination of ability for biosurfactant production
from endophytic bacteria of passion fruit



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2561 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of ability for biosurfactant production
from endophytic bacteria of passion fruit



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ **ACADEMIC YEAR 2018** ถูกให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส Determination of ability for biosurfactant production from endophytic bacteria of passion fruit
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐยาน์ เหลืองงาม รหัสนักศึกษา 58050882 นางสาวธนพร ธาระวัย รหัสนักศึกษา 58050892 นางสาวไฝฝืน คุปตพงศ์ รหัสนักศึกษา 58050933
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ เช่น น้ำมัน ตัวทำละลายอินทรีย์และโลหะหนัก นั้นส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อใช้ในการบำบัดหรือฟื้นฟู โดยหนึ่งในนั้นคือการบำบัดหรือฟื้นฟูทางชีวภาพ โดยมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาช่วยในการบำบัดหรือฟื้นฟูการปนเปื้อนของสารดังกล่าวข้างต้น การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส์ ซึ่งทำการทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง การทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันและทดสอบการเกิดอิมัลชัน จากการทดสอบพบว่าไอโซเลทที่สามารถย่อยเม็ดแดงได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท จากนั้นนำไอโซเลทที่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท N1.1 Y10.1 3BD1 3BD2 3AC1 3BC2 และ 1BC1 มาทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน ทดสอบการเกิดอิมัลชัน และทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยไขมัน แป้งและโปรตีน ผลการทดสอบพบว่าไอโซเลท Y10.1 สามารถทำให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันดีที่สุดเมื่อทดสอบกับน้ำมันปาล์มและน้ำมันหมู ไอโซเลท N1.1 สามารถทำให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันดีที่สุดเมื่อทดสอบกับน้ำมันถั่วเหลืองและไอโซเลท 1BC1 สามารถทำให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันดีที่สุดเมื่อทดสอบกับน้ำมันเครื่อง ผลการทดสอบการเกิดอิมัลชัน พบว่าไอโซเลท 3BC2 ให้ค่าดัชนีอิมัลชันสูงที่สุดเมื่อทดสอบกับเฮกเซน ส่วนไอโซเลท 3AC1 ให้ค่าดัชนีอิมัลชันสูงที่สุดเมื่อทดสอบกับคลอโรฟอร์ม ส่วนการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยไขมัน แป้ง และโปรตีน พบว่าไอโซเลท 3BD2 นั้นสามารถย่อยได้ทั้งไขมัน แป้ง และโปรตีน ไอโซเลท 3BC2 N1.1 และ 3AC1 สามารถย่อยได้ทั้งแป้งและโปรตีน

ในขณะที่ไอโซเลท Y1.1 3BD1 และ Y10.1 สามารถย่อยได้เพียงไขมัน โปรตีน และแป้ง ตามลำดับ จากการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำเลี้ยงของไอโซเลท Y1.1 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 N เอทานอล และอะซิโตน พบว่าการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 N ให้ค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันสูงสุด

คำสำคัญ : สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เสาวรส ดัชนีอิมัลชัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Determination of ability for biosurfactant production from endophytic bacteria of passion fruit		
Students	Miss Natthaya	Luengngam	Student ID 58050882
	Miss Thanaporn	Tharawai	Student ID 50850892
	Miss Faifun	Kuptapong	Student ID 58050933
Degree	Bachelor of Science in (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut’s Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2018		
Advisor	Dr.Karn Wongsariya		

Abstract

The contamination of waste such as oil, organic solvents, and heavy metals in the environment is one of the major concerning environmental problems. Because it affects not only to human but also to all living thing in the environment. Therefore, the new technologies for waste treatment has been developed and required. The bioremediation technology is one of the promising technologies for waste treatment. This research aims to study the ability for biosurfactant production of endophytic bacteria isolated from passion fruit. The biosurfactant producing ability was detected by red blood cell digestion test, oil displacement test, and emulsion test. There were 10 isolates could digest red blood cell. After that the isolates N1.1, Y1.1, Y10.1, 3BD1, 3BD2, 3AC1, 3BC2, and 1BC1 were selected for oil displacement and emulsion tests. The results of oil displacement test showed that isolate Y10.1 exhibited the strongest activity with palm oil and animal oil. While, the isolate N1.1 and 1BC1 show the highest activity with soybean oil and motor oil, respectively. For emulsion test, the isolate 3BC2 and 3AC1 produced the highest emulsion index after tested with hexane and chloroform, respectively. The acidic precipitation was the best method for separating crude biosurfactant from culture broth which was produced by isolate Y1.1.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
Keywords : Biosurfactant, Emulsion index, Passion fruit
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยคณะผู้จัดทำต้องขอขอบคุณ อ.ดร.กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยให้คำปรึกษา ชี้ข้อบกพร่อง และให้คำแนะนำในการแก้ไข ให้กำลังใจและสนับสนุนอุปกรณ์สำหรับการทดลอง

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ งบประมาณ และสถานที่ในการศึกษาทดลอง และบุคลากรของภาควิชาชีววิทยาที่คอยให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อน พี่ น้อง รวมไปถึงบุคคลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทดลอง ในครั้งนี้ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนกลุ่มของข้าพเจ้าจนโครงการพิเศษนี้เสร็จสิ้นลุล่วงไปด้วยดี



ณัฐธยาน์ เหลืองงาม
ธนพร ธาระวัย
ไผ่ผืน คุปตพงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant).....	3
2.2 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจำแนกตามองค์ประกอบทางเคมี	3
2.3 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	8
2.4 การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	9
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	12
3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ	12
3.2 วิธีการทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	19
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	19
4.2 การย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar.....	22
4.3 การย่อยไขมัน แป้ง และโปรตีน.....	22
4.4 ค่าการกระจายในน้ำมัน	23
4.5 ดัชนีการเกิดอิมัลชัน	24
4.6 ดัชนีการเกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 27
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.1 สรุปผลการวิจัย	27
5.2 ข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	36
ภาคผนวก ก	37
ภาคผนวก ข	40
ภาคผนวก ค	42



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหาร TSA.....	19
4.2 แสดงผลการทดสอบการย่อยไขมัน แป้ง โปรตีนของเชื้อ.....	22
4.3 แสดงค่าการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อในน้ำมันทั้ง 4 ชนิด.....	23
4.4 แสดงค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์มที่ 24 ชั่วโมง.....	24
4.5 แสดงค่าการเกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับ คลอโรฟอร์มที่ 24 ชั่วโมง	26



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูป	หน้า
2.1 โครงสร้างแบบแอมฟิพาทิก	3
2.2 โครงสร้างทางเคมีของไกลโคลิปิด	4
2.3 โครงสร้างทางเคมีของแรมโนลิปิด	4
2.4 โครงสร้างทางเคมีของทรีฮาโลลิปิด	5
2.5 โครงสร้างทางเคมีของโซโฟโรลิปิด	5
2.6 โครงสร้างทางเคมีของเซอแฟกทิน	6
2.7 โครงสร้างทางเคมีของไลโคไนซิน ดี	6
2.8 โครงสร้างทางเคมีของฟอสโฟลิปิด	7
2.9 โครงสร้างทางเคมีของอิมัลชัน	8
2.10 การเกิดวงใสในการแทนที่น้ำมันของน้ำเลี้ยงเชื้อ	10
2.11 การเกิดอิมัลชัน	10
2.12 การเกิดอิมัลชันกับคลอโรฟอร์มของน้ำเลี้ยงเชื้อ	11
ตารางภาคผนวก	
ค.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	42
ค.2 แสดงการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ	49
ค.3 แสดงการย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar ของเชื้อ	54
ค.4 แสดงการทดสอบการย่อยไขมันของเชื้อ	57
ค.5 แสดงการทดสอบการย่อยแป้งของเชื้อ	58
ค.6 แสดงการทดสอบการย่อยโปรตีนของเชื้อ	59
ค.7 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อในน้ำมันปาล์ม	60
ค.8 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อในน้ำมันถั่วเหลือง	63
ค.9 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อในน้ำมันหมู	66
ค.10 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงเชื้อในน้ำมันเครื่อง	69
ค.11 แสดงการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม	72
ค.12 แสดงการเกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ ใช้กรดไฮโดรคลอริกกับคลอโรฟอร์ม	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การขยงนี้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่ใช้เอทานอลกับคลอโรฟอร์ม
 ไม่ว่าการนี้แต่เพียงผู้เดียว ยักยอกที่มิใช่หน้าที่ของและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณี 75

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูป

หน้า

ค.14 แสดงการเกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ที่ใช้อะซิโตนกับคลอโรฟอร์ม 75



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
TSA	Tryptone Soya Agar
TSB	Tryptone Soya Broth



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารลดแรงตึงผิว มีโครงสร้างส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) โดยประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิววัดได้จากค่า Critical micelle concentration (CMC) ซึ่งหมายถึง ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ (micelle) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยหลักที่ส่งผลเกี่ยวข้องกับสารลดแรงตึงผิวนอกเหนือจากค่า CMC เช่น อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลาย (จิราภรณ์ ธนียวัน และคณะ., 2551) สารลดแรงตึงผิวมีบทบาทที่สำคัญต่อมนุษย์ โดยเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เครื่องสำอาง ครีมกันแดด และยา ตัวอย่างสารที่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ เช่น sodium lauryl sulfate (SLS) ที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์สบูะเหลวและแชมพู ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อดวงตาและผิวหนัง (Bondi et al., 2015) นอกจากนี้เมื่อมีการปนเปื้อนของ linear alkylbenzenesulfonate (LAS) ที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ผงซักฟอกในแหล่งน้ำจะส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ โดยจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตับและไตของสัตว์น้ำ (Varsha et al., 2013; Zhu et al., 2014) เพื่อลดผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จึงมีการใช้สารทดแทนสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและศึกษาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส
- 2) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรสโดยศึกษาลักษณะโคโลนี สี ขนาด ขอบ ของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง รวมถึงการติดสีแกรม และการเรียงตัวของไต้กล่องจุลทรรศน์ รวมถึงการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยไขมัน แป้ง และโปรตีน จากนั้นทำการทดสอบความสามารถการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยศึกษา

เอกสารที่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง การเกิดอิมัลชัน และการกระจายตัวของน้ำมัน น้ำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรสที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาทดสอบวิธีการคัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากน้ำเลี้ยงโดยการตกตะกอนด้วยกรด เอทานอล และอะซิโตน รวมถึงวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบถึงความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส
- 2) ทราบถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active molecule) ผลิตจากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipathic structure) ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ด้วยโครงสร้างเหล่านี้ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพต่างกัน และสามารถเพิ่มการละลายและการย่อยสลายทางชีวภาพของสารที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ไฮโดรคาร์บอน (Ul Hassan Shah et al., 2016; ณัฐชาริ, 2559)

รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างแบบแอมฟิพาติก (amphipathic structure)

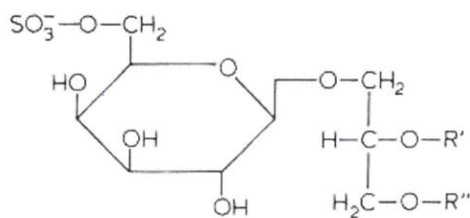
(ที่มา : Zhao and Lappalainen, 2012)

2.2 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant) จำแนกตามโครงสร้างทางเคมี

2.2.1 ไกลโคลิปิด (Glycolipids)

เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับไขมัน พบในแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas* sp. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดที่เป็นไกลโคลิปิดและเป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย ได้แก่ rhamnolipids trehalolipids และ sophorolipids ซึ่งสามารถจำแนกได้ตามแหล่งที่มาและคุณสมบัติดังนี้ (Vijayakumar and Saravanan, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

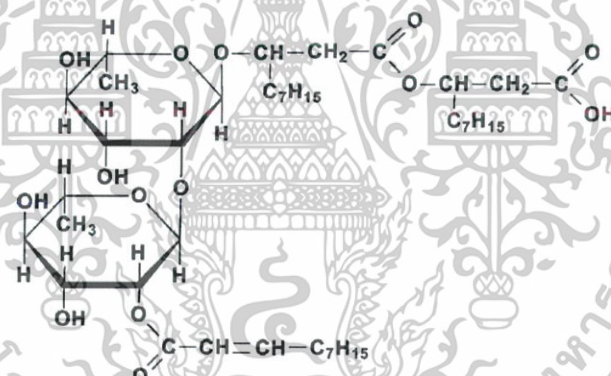


รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไกลโคลิปิด (glycolipid)

(ที่มา : Arpita Roy, 2014)

2.2.1.1 rhamnolipids

เป็นสารประกอบประเภทแอมฟิฟิลิก (amphiphilic) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น และเป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (Rakadwad et al., 2019) พบได้บ่อยในแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas* sp. และ *Rhodococcus* sp. rhamnolipids จัดเป็นไกลโคลิปิดชนิดหนึ่ง โดยมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย rhamnolipids 1-2 โมเลกุลต่อกับ hydroxydecanoic acid 2 โมเลกุล (Vijayakumar and Saravanan, 2015)



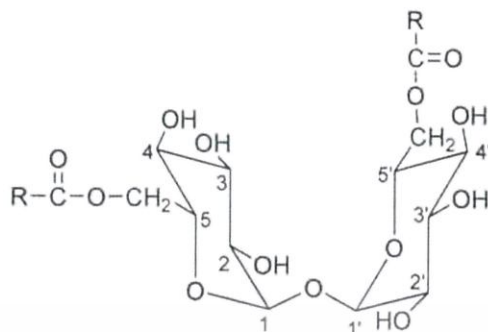
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ rhamnolipids ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

(ที่มา : Petrikov et al., 2013)

2.2.1.2 trehalolipids

มักพบในแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีตที่เรีย เช่น *Mycobacterium*, *Nocardia* และ *Corynebacterium* โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาล trehalose จับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และ 6' ของกรดไขมัน hydroxylate ในตำแหน่ง α และ β trehalolipid ชนิดแรกที่มีการศึกษา คือ trehalose dimycolate (TDM) หรือ 'Cord Factor' ที่พบในผนังเซลล์ของ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญของการติดเชื้อจากเชื้อชนิดนี้ ตัวอย่างของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

trehalolipids ที่สร้างจากแบคทีเรีย ได้แก่ α, α' -D-trehalose, non-reducing disaccharide (Cortés-Sánchez et al., 2012; Kuyunika et al., 2015)

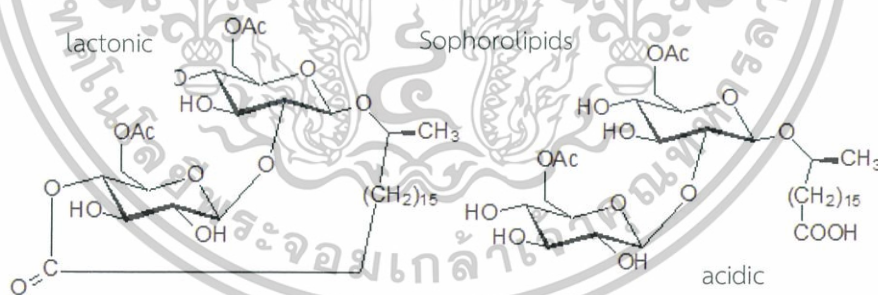


รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ trehalose-6,6'-dimycolates หรือ 'Cord Factor'

(ที่มา : Schroeder et al., 2002)

2.2.1.3 sophorolipids

จัดเป็น secondary metabolites และเป็นไกลโคลิปิดที่สร้างโดยยีสต์ เช่น *Starmerella bombicola* และ non-pathogenic *Candida* บางชนิด โครงสร้างโมเลกุล ประกอบด้วย disaccharide sophorose ที่เป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ต่อกับ hydroxyl fatty acid ที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β -glycosidic linkage sophorolipids มักถูกสังเคราะห์ออกมาในรูปแบบโครงสร้างผลสมระหว่าง acidic และ lactonic ซึ่งมีโครงสร้างที่ต่างกัน (Judhav et al., 2019)



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ lactonic sophorolipid และโครงสร้างของ acidic

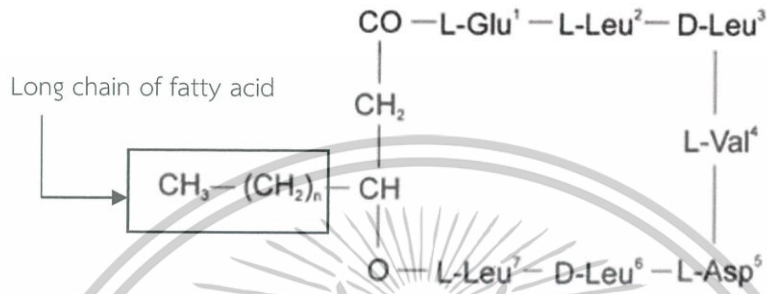
sophorolipid (ที่มา : W. Christie, 2019)

2.2.2 Lipopeptides และ Lipoprotein ประกอบด้วยไขมันต่อกันเป็นสายยาว แบ่งตามคุณสมบัติและโครงสร้างได้ดังนี้

2.2.2.1 Surfactin

เป็น lipopeptides ที่มีการเรียงตัวเป็นวงกลม (cyclic lipopeptides) มีเอกลักษณ์เป็นเอกลักษณ์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ตัว (heptapeptides) ที่จับกันเป็นวง เชื่อมกับกรดไขมันสายยาว 3 สาย (ไขมันสายยาว 3 สาย) ออกฟังก์ชันเพิ่มเติมและต้องอย่างถึงเจ้าของเอกลักษณ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

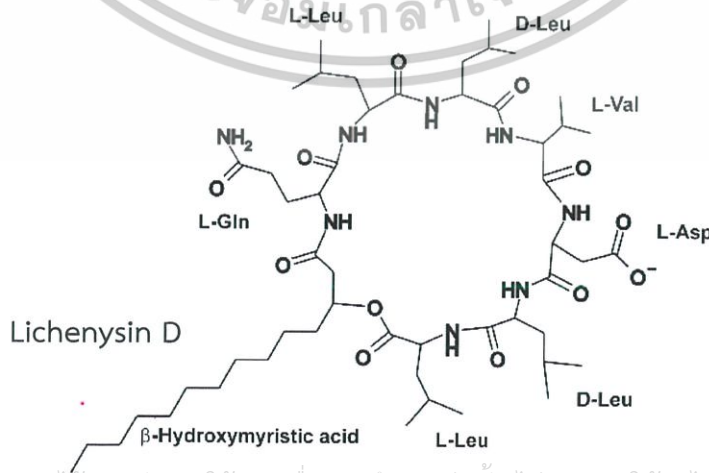
ไขมันสายยาว (β -hydroxy fatty acid) ที่มีความยาว 12-16 คาร์บอนอะตอมด้วยพันธะ lactone linkage surfactin มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าก่อโรค เช่น *Salmonella typhimurium* และ *Proteus mirabilis* ฤทธิ์ต้านไวรัส เช่น herpes simplex virus (HSV) และมีความเสถียรภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง pH ที่กว้าง และสภาวะที่มีเกลือสูง สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มักผลิตได้จากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. เช่น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus pumilus* (Seydlová and Svobodová, 2008; Wu et al., 2019)



รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างพื้นฐานทางเคมีของ surfactin (ที่มา : Seydlová and Svobodová, 2008)

2.2.2.2 Lichenysin

Lichenysin เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด lipopeptide โครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ชนิดต่อกันเป็นวง มีประจุลบ (anionic) มีประสิทธิภาพมาก พบใน *Bacillus licheniformis* ซึ่งสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ lichenysin ได้ 4 ชนิด ได้แก่ lichenysin A lichenysin B lichenysin C และ lichenysin D โดยทั้ง 4 ชนิดมีโครงสร้างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ผลิต สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดนี้มีความเสถียรภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง pH ที่กว้าง และสภาวะที่มีเกลือสูงคล้ายกับ Surfactin (Nerurkar, 2010; Vijayakumar and Saravanan, 2015)

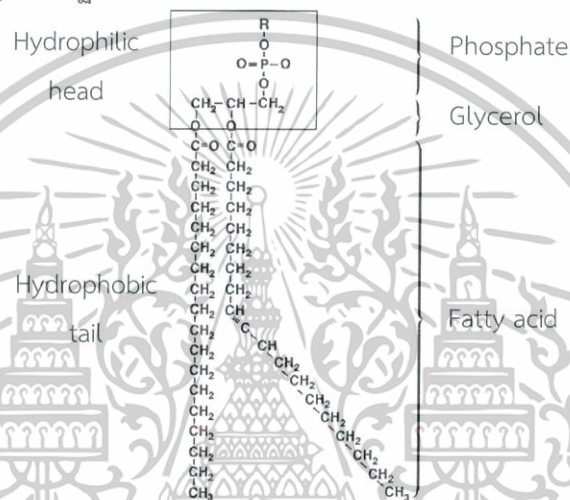


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรรมใดๆ รูปที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของ lichenysin D ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* นำมาใช้

(ที่มา : Coronel et al., 2017)

2.2.2.3 Fatty acids, phospholipids และ neutral lipids

กรดไขมัน (fatty acid) และไขมัน (neutral lipid) สามารถพบได้ในจุลินทรีย์ทุกชนิด โดยจะผลิตและหลั่งออกนอกเซลล์ เช่น ไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งกรดไขมัน ไขมัน และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดฟอสโฟลิพิดนั้นพบในแบคทีเรีย เช่น *Corynebacterium lepus* จะพบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด fatty acids ใน *Acinetobacter sp.* จะพบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด phospholipids และใน *Corynebacterium insidibasseosum* จะพบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด neutral lipid (ณัฐชาร, 2559)



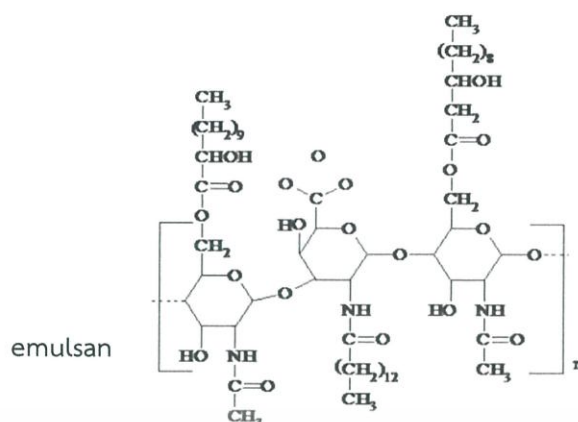
รูปที่ 2.8 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของ phospholipid

(ที่มา : Zahrabi et al., 2016)

2.2.2.4 Polymeric biosurfactants

จัดเป็นสารไบโอโพลีเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูงซึ่งมีความหนืดสูง สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ได้แก่ emulsan liposan alasan lipomanan อีมีลซาน (emulsan) ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Acinetobacter calcoaceticus* เป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันของสารประเภทไฮโดรคาร์บอนในน้ำ ลิโปซาน (liposan) ผลิตได้จากยีสต์ *Candida lipolytica* เป็นสารที่ทำให้เกิดอิมัลชันที่สามารถละลายน้ำได้ อะลาซาน (alasan) ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Acinetobacter radioresistens* ซึ่งสามารถละลายน้ำได้และสามารถย่อยสลายสารประเภท polyaromatic hydrocarbon ได้ และ lipomanan สามารถพบได้ใน *Candida tropicalis* (Mukherjee and Das, 2010; Vijayakumar and Saravanan, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ emulsan

(ที่มา : Fracchia et al., 2012)

2.3 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.3.1 ด้านอุตสาหกรรม

ปัจจุบันมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด glycolipid rhamnolipid และ sophorolipid ไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น ในอุตสาหกรรมยา ใช้ succinoyl-trehalose lipid ที่ผลิตได้จาก *Rhodococcus erythropolis* เป็นส่วนผสมในยาด้านไวรัส HSV และ influenza virus ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้สาร bioemulsifier ที่ผลิตจาก *Candida utilis* เป็นส่วนผสมในน้ำสลัด เป็นต้น และยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ (Uchida et al., 1989a, b; Shepherd et al., 1995; Akbari et al., 2018)

2.3.2 ด้านการบำบัดดินที่ปนเปื้อน

ด้วยความที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างที่หลากหลาย ทำให้มีการนำมาใช้งานได้หลากหลาย เช่น มีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด rhamnolipid ที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* ในการกำจัดฟิเรนทรีน (phenanthrene) ที่ปนเปื้อนในดินเนื่องจากฟิเรนทรีนมีผลต่อการเจริญของรากและยอดพืช เช่น พืชตระกูลถั่ว (ชนิดขี้เหล็ก สมตระกูล และคณะ, 2555) และลดการปนเปื้อนของโลหะหนักในดินที่มีการปนเปื้อน โลหะหนักที่พบได้บ่อยในดินที่ปนเปื้อน ได้แก่ ตะกั่ว (Pb)ปรอท (Hg) อาร์เซนิกหรือสารหนู (As) แคดเมียม (Cd) โครเมียม (Cr) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) และ นิกเกิล (Ni) (Tan et al., 1994; Banat, Makkar, & Cameotra, 2000; Akbari et al., 2018) และมีการประยุกต์ใช้ sophorolipid ในการกำจัดสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น น้ำมัน จากดิน (Oberbremer et al., 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเป็นเจ้าของโดยผู้ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา

ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เช่น แชมพู ครีมนวดผม ยาสีฟัน สบู่ ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว เช่น ครีม มอยส์เจอร์ไรเซอร์ คลีนซิ่ง และเครื่องสำอางสำหรับผิวหน้าและผิวกายต่างๆ มีการใช้ sphorolipid ที่ผลิตจาก *Candida bombicola* และ *C. apicola* เป็นส่วนผสมในสารเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนัง (Yamane, 1987; Bhattacharya et al., 2017) ในอุตสาหกรรมยา มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพหลายชนิดในทางการแพทย์ เช่น การใช้ surfactin ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถย่อยเม็ดเลือดได้ในการใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดและการใช้ Iturin ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นส่วนผสมในสารต้านเชื้อรา เป็นต้น (Mukherjee and Das, 2010)

2.3.4 ด้านปิโตรเลียม

ปัจจุบันมีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพแทนการใช้สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์จากสารเคมีในด้านปิโตรเลียม เช่น การกำจัดสารตกค้างน้ำมันจากถังเก็บโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด glycolipid ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด emulsan ช่วยลดความหนืดของน้ำมันดิบในท่อส่งน้ำมันดิบ (Finnerty and Singer, 1985; Hayes et al., 1986)

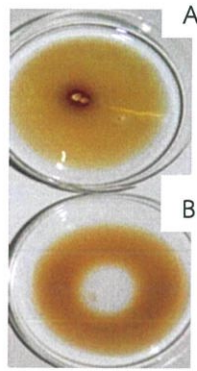
2.4 การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.4.1 ความสามารถในการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement test)

เป็นการทดสอบความสามารถในการกระจายตัวของน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นำมาทดสอบ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเปลี่ยนมุมสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน ทำให้เกิดแรงดันและแรงดันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดการกระจายของน้ำมัน (Violeta et al., 2011)

การทดสอบนี้ทำได้โดยนำน้ำเลี้ยง (supernatant) หยดลงบนน้ำมันทดสอบที่อยู่บนน้ำ ถ้าเชื่อมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเกิดวงใสของการกระจายตัวของน้ำมันและขนาดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อสร้าง การทดสอบนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อย เหมาะกับการทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกรณีที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณน้อย (Walter et al., 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 แสดงการเกิดวงใสของการแทนที่น้ำมัน

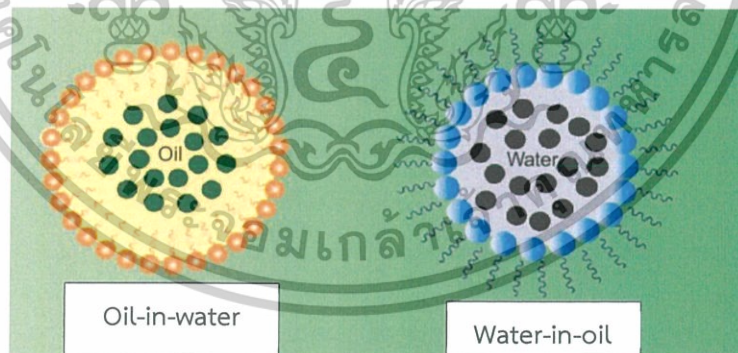
(A) ไม่เกิดการกระจายของน้ำมัน

(B) เกิดวงใสของการกระจายตัวของน้ำมัน

(ที่มา : Deepika et al.,2016)

2.4.2 ดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsification index)

การเกิดอิมัลชัน (emulsion) เป็นการกระจายตัว (dispersion) ของของเหลวชนิดหนึ่งในของเหลวอีกชนิด ซึ่งของเหลว 2 ชนิดจะไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น น้ำกับน้ำมัน การเกิดอิมัลชันสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ oil-in-water (O/W) และ water-in-oil (W/O) การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นตัวกลางที่ทำให้เกิดอิมัลชันหรืออิมัลซิฟายเออร์ (emulsifier) จะทำให้แรงตึงผิวระหว่างของเหลวทั้งสองลดลงและทำให้เกิดการกระจายตัวจนรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (สุภักชนม์, 2555; Yamashita et al., 2017)

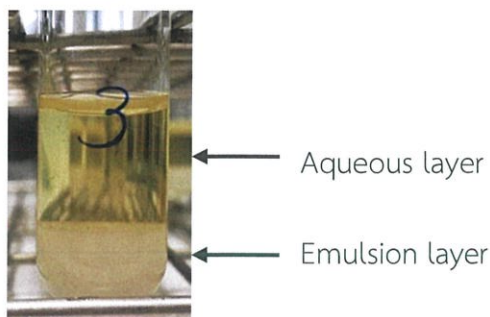


รูปที่ 2.11 แสดงการเกิดอิมัลชัน โดยที่ (a) แสดงการเกิดอิมัลชันแบบ oil-in-water และ (b) แสดงการเกิดอิมัลชันแบบ water-in-oil

(ที่มา : Ramos et al., 2018)

การทดสอบทำได้โดยปิเปตน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปั่นเหวี่ยงตะกอนเชื้อออกแล้ว และสารทดสอบที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนลงในหลอดทดลองในอัตราส่วน 1:1 เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 แสดงการเกิดอิมัลชันเป็นผลมาจากกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับตัวทำละลายอินทรีย์ Chloroform

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่จะผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. โดยมีการศึกษาโดย Yuliani และคณะ (2018) ซึ่งศึกษาสารลดแรงตึงผิวจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* C19 พบว่าเชื้อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่ม lipopeptides ที่มีความคงตัวสูงในช่วง pH ที่กว้าง และคงตัวในสภาวะที่มีความเป็นเกลือสูง จากการศึกษายังพบอีกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด lipopeptides มีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ซึ่งได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* Typhi, *Listeria monocytogenes* และ *Candida albican* ได้นอกจากนี้ในการศึกษาของ Sharma และคณะ (2018) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด lipopeptides ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* BR15 ยังมีศักยภาพในการดูดซับน้ำมันในการทดลองการดูดซับน้ำมันด้วย sand pack column และยังสามารถย่อยสลายน้ำมันเครื่องได้ และในการศึกษาของ Sun และคณะ (2019) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อสร้างเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภท glycolipids ที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* มีศักยภาพในการย่อยสลาย polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ที่มีมวลโมเลกุลสูงที่ปนเปื้อนในบ่อน้ำเสียได้เมื่อเติม *Pseudomonas aeruginosa* S5 ลงไป ปัจจุบันการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นยังผลิตได้จำกัดเนื่องจากต้องใช้ต้นทุนสูงซึ่งต่างจากสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่ต้นทุนต่ำ และจุลินทรีย์ที่จะนำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นต้องมีการพัฒนาอีกมาก ในขณะเดียวกันของเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตรนั้นถือเป็นสารตั้งต้นที่ได้รับความสนใจในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพราะสามารถลดปัญหาการจัดการของเสียจากอุตสาหกรรมได้ (Suppasil Maneerat, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งแรงดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy ES-315 และ Hirayama HVE50
2. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator)
3. ตู้ปลอดเชื้อ (Air flow Laminar)
4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
5. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Nikon, E200)
6. เครื่องซังสารแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง
7. เครื่องซังสารแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง
8. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter)
9. กระดาษวัด pH (pH paper)
10. เครื่องเขย่า (Shaker)
11. ไมโครปิเปต ขนาด 20 100 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
12. ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip) ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
13. จานเพาะเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 92 มิลลิเมตร
14. จานเพาะเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 56 มิลลิเมตร
15. หลอดเซนติฟิว (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
16. หลอดไมโครเซนติฟิว (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
17. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
18. จุกสำลี
19. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
20. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
21. ไมโครเวฟ (Microwave)
22. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ หลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตร พร้อมฝาครอบ ครอบ
ดวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร ปีกเกอร์ขนาด 100 250 500 มิลลิลิตร ขวด
ฝาเกลียว (Duran) ขนาด 250 มิลลิลิตร แผ่นสไลด์ ซ้อนตักสาร และ ปิเปตแก้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเชิงอื่นเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นประโยชน์หรือเห็นว่าการคัดลอก
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 15 และ 10 มิลลิลิตร ขวดปรับปริมาตร 100 และ 500 มิลลิลิตร ขวดลด
ความดัน (Filtering flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

23. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) ลูกยาง และตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol
Burner) กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.2 สารเคมี

1. เอทิลแอลกอฮอล์ 70% (v/v) และ 95% (v/v)
2. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล (HCl 2 N)
3. สารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)
4. สารละลายแกรมไอโอดีนความเข้มข้น 95 % (Gram iodine)
5. สารละลายซาฟรานินโอ (Safranin o)
6. อิมเมอรัชันออย (Immersion oil)
7. ไตรบิวทีริน (Tributyrin)
8. สตาร์ท (Starch)
9. ผงนมขาดมันเนย (Skim milk)
10. เฮกเซน (Hexane)
11. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
12. อะซิโตน (Acetone)
13. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (NaOH 1 M)
14. น้ำมันปาล์ม
15. น้ำมันถั่วเหลือง
16. น้ำมันหมู
17. น้ำมันเครื่อง
18. สารละลาย Tween ความเข้มข้น 1 %

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptone Soya Broth (TSB)
2. Sheep Blood Agar
3. Bacteriological Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาจากเสาวรสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากนั้นนำเชื้อไปบ่มในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็เชื้อเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวซึ่งแสดงว่าเชื้อบริสุทธิ์แล้วจะนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อทำการทดสอบต่อไป

3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.2.2.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงตรวจดูลักษณะของโคโลนี สี ความหนูน ความโปร่งแสง ลักษณะขอบ ขนาด ลักษณะผิวของโคโลนี การสร้างสารสี ลักษณะใต้โคโลนี

3.2.2.2 การย้อมสีแกรม

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop) นำเชื้อ 1 โคโลนีมาผสมกับน้ำกลั่น 1 ที่อยู่บนกระจกสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว และเกลี่ย (smear) เชื้อให้เป็นฟิล์มบางๆ ทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์ หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดสารละลายแกรมไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง หยดแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % (v/v) เพื่อล้างสี แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลายซาฟรานินโอ ทิ้งไว้ 30 วินาทีล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง และนำไปตรวจสอบการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกลักษณะการเรียงตัวและการติดสี

3.2.3 การทดสอบทางชีวเคมี

3.2.3.1 การทดสอบการย่อยไขมัน

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวมาทำการ simple streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ผสม tributyrin ความเข้มข้น 1 % ลงไป หลังจากนั้นนำเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณไฮรอปโคโลนีของเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ (ดวง

พร คันธโชติ, 2537)ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.2 การทดสอบการย่อยแป้ง

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวมาทำการ simple streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ผสม starch ความเข้มข้น 0.2 % ลงไป หลังจากนั้นนำเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายแอมโมเนียมไอโอดีนลง ตรวจสอบบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อและการเกิดสี ถ้าเกิดบริเวณใสและไม่เกิดสีม่วงแสดงว่าเชื้อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

3.2.3.3 การทดสอบการย่อยโปรตีน

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวมาทำการ simple streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ผสม smik milk ความเข้มข้น 20 % ลงไป หลังจากนั้นนำเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่าเชื้อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์เคซีนเนสได้ (ดวงพร คันธโชติ, 2537)

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของแบคทีเรีย

3.2.4.1 การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวมาทำการ simple streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ผสมเลือดแกะลงไป และนำเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยเม็ดเลือดได้ (Khoulood M. Barakat et al., 2017)

3.2.4.2 ค่าการกระจายตัวในน้ำมัน (Oil displacement)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวมาลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ขวดละ 1-2 ลูก จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่า 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากครบ 72 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วยใสและตะกอนเซลล์ หลังจากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการทดสอบต่อไป (Rajni Sharma et al., 2018)

ทำความสะอาดจานเลี้ยงเชื้อขนาด 56 มิลลิเมตรด้วยเมทานอล เพื่อกำจัด

เอ็กสาร์ทที่ติดอยู่บนจาน และทิ้งไว้ให้แห้ง โดยในการทดสอบนี้มีการใช้น้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วไม่ผ่านการผัดใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลือง น้ำมันหมู และน้ำมันเครื่อง หลังจากนั้นปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 8 มิลลิลิตรลงจานเลี้ยงเชื้อ และปิเปตน้ำมันที่ใช้ทดสอบลงจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นจานละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นหยดน้ำเลี้ยงของเชื้อทดสอบลงไปในน้ำมันจานละ 100 ไมโครลิตร ทำชุดควบคุมเชิงลบโดยเปลี่ยนจากน้ำเลี้ยงของเชื้อทดสอบเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำกลั่น ส่วนชุดควบคุมเชิงบวกทำโดยเปลี่ยนจากน้ำเลี้ยงเชื้อทดสอบเป็นสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 1% (Tween ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ที่รวมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.98 มิลลิลิตร) จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนใสที่เกิดขึ้นบนน้ำมันแต่ละชนิด (S K Satpute et al., 2008)

3.2.4.3 การวัดดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion index)

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวมาลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ขวดละ 1-2 ลูบ จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่า 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากครบ 72 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วยใสและตะกอนเซลล์ หลังจากนั้นนำส่วนน้ำเลี้ยงไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการทดสอบต่อไป (Rajni Sharma et al., 2018)

ล้างหลอดทดลองด้วยเมทานอล เพื่อกำจัดคราบไขมัน และทิ้งไว้ให้แห้ง ปิเปตน้ำเลี้ยงของเชื้อทดสอบปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นปิเปตเฮกเซน ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ทำเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนจากเฮกเซนเป็นคลอโรฟอร์ม ทำชุดควบคุมเชิงลบโดยเปลี่ยนจากน้ำเลี้ยงของเชื้อทดสอบเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำกลั่น ส่วนชุดควบคุมเชิงบวกทำโดยเปลี่ยนจากน้ำเลี้ยงเชื้อทดสอบเป็นสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 1% (Tween ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ที่รวมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.98 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นนำหลอดทดลองมาเขย่าเบาๆ ด้วยมือจนกระทั่งรวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง วัดความสูงของการเกิดอิมัลชันและคำนวณผล (Khoulood M. Barakat et al., 2017)

$$\text{Emulsion index} = \frac{\text{ความสูงของการเกิดอิมัลชัน}}{\text{ความสูงทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.5 การคัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.5.1 การตกตะกอนด้วยกรด

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวมาลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ขวดละ 1-2 ลูบ จากนั้น

นำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่า 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากครบ 72 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วยใสและตะกอนเซลล์ หลังจากนั้น นำส่วนน้ำเลี้ยงไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการทดสอบต่อไป (Rajni Sharma et al., 2018)

นำน้ำเลี้ยงที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนแล้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มาทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มัล ให้มีค่าความเป็นกรดที่ 2.0 จากนั้นนำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบ 24 ชั่วโมงแล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการตกตะกอนแล้วมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บตะกอนไว้ทำการทดสอบการเกิดอิมัลชันต่อไป (Ul Hassan Shaha et al., 2016)

3.2.5.2 การตกตะกอนด้วยเอทานอล

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดียวมาลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ขวดละ 1-2 หลู จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่า 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากครบ 72 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วยใสและตะกอนเซลล์ หลังจากนั้น นำส่วนน้ำเลี้ยงไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการทดสอบต่อไป (Rajni Sharma et al., 2018)

นำน้ำเลี้ยงที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนแล้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอล ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ นำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ผ่านการตกตะกอนแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บตะกอนไว้ทำการทดสอบการเกิดอิมัลชันต่อไป (Xing-Zhong Yuan et al., 2014)

3.2.5.3 การตกตะกอนด้วยอะซิโตน

เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ด้วยวิธี cross streak plate ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดียวมาลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ขวดละ 1-2 หลู จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเขย่า 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากครบ 72 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วยใสและตะกอนเซลล์ หลังจากนั้น

นำส่วนน้ำเลี้ยงไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการทดสอบต่อไป (Rajni Sharma et al., 2018) อีกรหัสอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำน้ำเลี้ยงที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนแล้วปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับอะซิโตนที่แช่เย็น ปริมาตร 75 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ผ่านการตกตะกอนแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไว้ทำการทดสอบการเกิดอิมัลชันต่อไป (Vikas Pruthi et al., 1995)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้ง 18 ไอโซเลทซึ่งประกอบด้วยการศึกษาลักษณะโคโลนี สี ความหนูน ความโปร่งใส ขอบโคโลนี ขนาดของโคโลนี ผิวโคโลนี การติดสีแกรม และการเรียงตัวใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแสดงตารางที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 18 ไอโซเลทเป็นแกรมบวก (ตารางภาคผนวก ค.1) และพบเชื้อ 8 ไอโซเลท ได้แก่ 3BD1 3BC3 3AC1 3BD2 L6.1 L5.1 N1.1 และ Y1.1 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งมีรูปร่างกลม สีขาว หนูน ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก การเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์คือรูปร่างกลมเป็นคู่ เชื้อ 3 ไอโซเลท ได้แก่ 5AC3 2BC2 และ 3BD2 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งมีรูปร่างกลม สีขาวขุ่น หนูน ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก การเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นรูปร่างท่อน เชื้อ 3 ไอโซเลท ได้แก่ 5AC2 2BC1 และ 5AC1 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งมีรูปร่างกลม สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่ การเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นรูปท่อน เชื้อ 3 ไอโซเลท ได้แก่ Y14.1 Y5.1 และ Y10.1 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งมีรูปร่างกลม สีขาว ขอบหยัก ไม่นูน ตรงกลางใส ขนาดเล็ก การเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นท่อน ส่วนอีก 1 ไอโซเลท คือ 1BC1 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งมีรูปร่างกลม สีขาวขุ่น ขอบหยัก ทึบแสง ขนาดเล็ก มันวาว การเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นรูปท่อน (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ไอโซเลท	แกรม	รูปร่างและการเรียงตัว	ลักษณะโคโลนี
3BD1	+	กลมเป็นคู่	กลม สีขาวขุ่น หนูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก
3BC3	+	กลมเป็นคู่	กลม สีขาวขุ่น หนูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก
3AC1	+	กลมเป็นคู่	กลม สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์(ต่อ)

ไอโซเลท	แกรม	รูปร่างและการเรียงตัว	ลักษณะโคโลนี
1BC1	+	ท่อน	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบหยัก ทึบแสง มันวาว ขนาดเล็ก
5AC3	+	ท่อน	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ โปรง แสง มันวาว ขนาดเล็ก
2BC2	+	ท่อน	กลม สีขาวขุ่น นูน ขอบเรียบ โปรง แสง มันวาว ขนาดเล็ก
5AC2	+	ท่อน	กลม สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ มัน วาว ขนาดใหญ่
5AC1	+	ท่อน	กลม สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ มัน วาว ขนาดใหญ่
3BD2	+	ท่อน	กลม สีขาวขุ่น นูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก
3BC2	+	กลมเป็นคู่	กลม สีขาวขุ่น นูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก
2BC1	+	ท่อน	กลม สีขาวขุ่น นูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดใหญ่
Y14.1	+	ท่อน	กลม สีขาว นูน ทึบแสง ขอบหยัก ไม่ มันวาว ขนาดเล็ก
L6.1	+	กลมเป็นคู่	กลม สีขาวขุ่น นูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก
L5.1	+	กลมเป็นคู่	กลม สีขาวขุ่น นูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์(ต่อ)

ไอโซเลท	แกรม	รูปร่างและการเรียงตัว	ลักษณะโคโลนี
N1.1	+	กลมเป็นคู่	กลม สีขาวขุ่น นูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก
Y1.1	+	กลมเป็นคู่	กลม สีขาวขุ่น นูน ทึบแสง ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก
Y5.1	+	ท่อน	กลม สีขาว นูน โปร่งแสง ขอบหยัก ไม่ มันวาว ขนาดเล็ก
Y10.1	+	ท่อน	กลม สีขาว ไม่นูน โปร่งแสง ขอบหยัก ไม่มันวาว ขนาดเล็ก

การเจริญของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารแข็ง เป็นสิ่งที่แสดงลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เช่น รูปร่าง สี และขนาด โดยลักษณะเหล่านี้เป็นวิธีการพื้นฐานสำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (G. Mamou et al., 2016) ซึ่งการเจริญของแบคทีเรียนั้นเกิดจากปัจจัย 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน โดยที่ปัจจัยภายนอกนั้น ได้แก่ ค่าความชื้นสัมพัทธ์ ออกซิเจน และอุณหภูมิ ส่วนปัจจัยภายใน ได้แก่ สารอาหาร ค่า water activity ค่าความเป็นกรด-ด่าง และสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร เป็นต้น

การติดสีแกรมของแบคทีเรียที่แตกต่างกันนั้นเกิดจากผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียมีองค์ประกอบคือ peptidoglycan ซึ่งเป็น polymer ของน้ำตาลที่เชื่อมกันด้วยสายของ peptide แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีความหนาของชั้น peptidoglycan ที่แตกต่างกันออกไปทำให้เราสามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียออกได้เป็น (1) กลุ่มที่มีชั้นของ peptidoglycan ที่หนา เมื่อย้อมสีเชื้อด้วย Gram stain จะติดสีม่วง (gram-positive bacteria) และ (2) กลุ่มที่มีชั้นของ peptidoglycan ที่บาง แต่มีชั้นของ bilayer phospholipid ที่หนากว่า กลุ่มนี้เมื่อย้อมสี Gram จะติดสีแดง (gram-negative bacteria) จากการย้อมสีแกรมพบว่าแบคทีเรียที่นำมาทดสอบนั้นติดสีแกรมบวก เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก มีความสามารถในการที่จะรับสารพวก p-rosaniline dye เช่น crystal violet (CV) และหลังจากการตรึงสี crystal violet ด้วย mordanting agent ได้แก่ gram iodine (I) จะเกิดเป็นสารประกอบ complex ที่เรียกว่า crystal violet iodine complex (CVI complex) ให้ติดกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หลังการล้างสี (decolorization)

ด้วย decolorizer agent เช่น alcohol หรือ acetone teichoic acid cross-links จะช่วยให้แบคทีเรียแกรมบวกสามารถที่จะทนต่อ decolorizer อีกทั้งยังทำให้ pore size ใน peptidoglycan

มีขนาดลดลงจึงทำให้แบคทีเรียแกรมบวกยังคงรักษา CVI complex ไว้จึงยอมแถมแล้วติดสีม่วง (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค)

4.2 การทดสอบการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้น

การศึกษาการย่อยเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรีย 18 ไอโซเลท สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มของเชื้อที่มีการย่อยเม็ดเลือดแดง 10 ไอโซเลท ประกอบไปด้วยเชื้อ 3BD1 3BC2 Y1.1 Y5.1 Y14.1 Y10.1 3AC1 1BC1 3BD2 และ N1.1 กลุ่มของเชื้อที่ไม่เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง 8 ไอโซเลท ประกอบด้วย 3BC3 5AC3 2BC2 5AC2 2AC1 5AC1 L6.1 และ L5.1

การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงนั้นสามารถบ่งชี้ได้ถึง 2 ปัจจัย นั่นก็คือ เชื้อที่ย่อยเม็ดเลือดแดงแล้วเกิดบริเวณใส่นั้น แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ การสร้างเอนไซม์ฮีโมไลซินของเชื้อออกมาย่อยเม็ดเลือดแดงก็จะก่อให้เกิดบริเวณใสเช่นกัน โดยการสร้างเอนไซม์ฮีโมไลซินของเชื่อนั้นก่อให้เกิดผลบวกคลวงสำหรับการทดสอบนี้ จึงต้องทำการทดสอบความสามารถการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าเชื้อสามารถสร้างแรงตึงผิวชีวภาพได้ (ภรณ์ทิรา และคณะ, 2017; S. Vijayakumar et al., 2015)

4.3 การย่อยไขมัน แป้ง และโปรตีน

นำเชื้อที่ให้ผลบวกจากการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดทั้ง 8 ไอโซเลทมาทดสอบการย่อยไขมัน โปรตีน และแป้ง พบว่าเชื้อ 3BD2 นั้นสามารถย่อยได้ทั้งไขมัน แป้ง และโปรตีน ส่วนเชื้อที่สามารถย่อยได้ทั้งแป้ง และโปรตีนนั้นคือ 3BC2 N1.1 3AC1 นอกจากนี้เชื้อที่ย่อยไขมันเพียงอย่างเดียว คือ Y1.1 เชื้อที่ย่อยโปรตีนอย่างเดียว คือ 3BD1 และเชื้อที่สามารถย่อยแป้งเพียงอย่างเดียว นั้น คือ Y10.1 ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบการย่อยไขมัน แป้ง โปรตีนของเชื้อ

ไอโซเลท	ไขมัน	โปรตีน	แป้ง
3BC2	-	+	+
Y10.1	-	-	+
1BC1	-	-	-
3BD2	+	+	+
N1.1	-	+	+
3AC1	-	+	+
3BD1	-	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบการย่อยไขมัน แบ่ง โปรตีนของเชื้อ (ต่อ)

ไอโซเลท	ไขมัน	โปรตีน	แป้ง
Y1.1	+	-	-

จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียพบว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส อะไมเลส และเคซีเนสได้ ซึ่งเอนไซม์ที่สอดคล้องกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือเอนไซม์ไลเปส โดยเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อย Tributyrin agar ทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีนั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ โดยมีรายงานว่าเชื้อที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสมาย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้นั้นจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านการบำบัดน้ำเสียได้ (อลงกฎ แซมสีม่วง และคณะ., 2011)

4.4 การกระจายของน้ำมัน (Oil displacement)

จากการศึกษาค่าการกระจายของน้ำมันเมื่อทดสอบกับน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อ 8 ไอโซเลทในน้ำมัน 4 ชนิดคือน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหมู และน้ำมันเครื่อง พบว่าน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดวงใสในน้ำมันปาล์มได้แก่ เชื้อ Y10.1 N1.1 และ Y1.1 ซึ่งมีความกว้างของวงใสคือ 0.67 0.40 และ 0.33 เซนติเมตร ตามลำดับ ในน้ำมันถั่วเหลือง ได้แก่ เชื้อ N1.1 3AC1 3BD2 และ 1BC1 มีความกว้างของวงใสคือ 0.63 0.43 0.33 และ 0.33 เซนติเมตร ตามลำดับ ในน้ำมันหมู ได้แก่ เชื้อ Y10.1 Y1.1 3BD2 และ 1BC1 มีความกว้างของวงใสคือ 0.77 0.63 0.53 และ 0.53 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนน้ำมันเครื่องนั้น ได้แก่ เชื้อ 1BC1 Y10.1 และ N1.1 มีความกว้างวงใสคือ 1.50 1.40 และ 1.17 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพการกระจายตัวของน้ำมันทั้ง 4 ชนิดจากน้ำเลี้ยงจากเชื้อ

ไอโซเลท	ความกว้างวงใส ในน้ำมันปาล์ม (cm)	ความกว้างวงใส ในน้ำมันถั่ว เหลือง(cm)	ความกว้างวงใส ในน้ำมันหมู (cm)	ความกว้างวงใส ในน้ำมันเครื่อง (cm)
N1.1	0.40	0.63	0.50	1.17
Y1.1	0.33	0.30	0.63	0.67
Y10.1	0.67	0.30	0.77	1.40
3BD1	0.00	0.00	0.20	0.87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพการกระจายตัวของน้ำมันทั้ง 4 ชนิดจากน้ำเลี้ยงจากเชื้อ (ต่อ)

ไอโซเลท	ความกว้างวงใส ในน้ำมันปาล์ม (cm)	ความกว้างวงใส ในน้ำมันถั่ว เหลือง(cm)	ความกว้างวงใส ในน้ำมันหมู (cm)	ความกว้างวงใส ในน้ำมันเครื่อง (cm)
3BD2	0.30	0.33	0.53	0.80
3AC1	0.30	0.43	0.33	0.83
3BC2	0.00	0.23	0.33	0.63
1BC1	0.27	0.33	0.53	1.50
น้ำกลั่น	0.00	0.00	0.40	0.23
อาหาร	0.40	0.00	0.57	0.50
อาหารผสม Tween 20 ความเข้มข้น 1%	1.20	3.23	2.07	2.00

การกระจายตัวของน้ำมันที่เกิดจากการหยดน้ำเลี้ยงของเชื้อทดสอบแล้วก่อให้เกิดวงใสที่เห็นแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจะเข้าไปแทนที่น้ำมันทำให้เกิดวงใสขึ้น โดยที่ความกว้างของวงใสนั้นจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เชื้อสร้างออกมา กล่าวคือถ้าความกว้างของวงใสมากจะแสดงว่าเชื้อมีความเข้มข้นมากเช่นกัน (Akintokun et al., 2017)

4.5 ดัชนีการเกิดอิมัลชัน (Emulsion index)

จากการศึกษาความสามารถในการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์มพบว่าเชื้อที่เกิดอิมัลชันทั้งเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม ได้แก่ เชื้อ N1.1 Y1.1 3AC1 และ 3BC2 เชื้อที่เกิดอิมัลชันกับเฮกเซนอย่างเดียว ได้แก่ เชื้อ Y10.1 และเชื้อที่เกิดอิมัลชันกับคลอโรฟอร์มอย่างเดียว ได้แก่ เชื้อ 1BC1 ส่วนเชื้อที่ไม่เกิดอิมัลชันทั้งเฮกเซนและคลอโรฟอร์มคือเชื้อ 3BD1 3BD2 ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์มที่ 24 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ดัชนีการเกิดอิมัลชันของเฮกเซน	ดัชนีการเกิดอิมัลชันของ คลอโรฟอร์ม
N1.1	51.78	16.78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์มที่ 24 ชั่วโมง (ต่อ)

ไอโซเลท	ดัชนีการเกิดอิมัลชันของเฮกเซน	ดัชนีการเกิดอิมัลชันของคลอโรฟอร์ม
Y1.1	43.37	56.66
Y10.1	45.57	0.00
3BD1	0.00	0.00
3BD2	0.00	0.00
3AC1	53.15	61.35
3BC2	54.89	58.79
1BC1	0.00	61.00
น้ำกลั่น	0.00	0.00
อาหาร	0.00	0.00
อาหารผสม Tween 20 ความเข้มข้น 1 %	51.14	26.08

การเกิดอิมัลชันนั้นจะเกิดจากการที่มีแรงดึงระหว่างผิวมากระทำต่อระบบ ก่อให้เกิดผิวสัมผัสร่วมระหว่างวัฏภาค เช่น การกวน เพื่อให้อนุภาคขนาดใหญ่เสียรูปและแตกออกเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กลงทำให้มีการกระจายตัวที่ดีในส่วนของน้ำ ถ้ามีการกวนด้วยแรงที่เหมาะสมจะทำให้การเกิดอิมัลชันมีความคงตัว โดยการใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมก็มีผลต่อการเกิด และความคงตัวของอิมัลชันเช่นกัน นอกจากนี้อุณหภูมิในระหว่างขั้นตอนการทดสอบก็มีผลต่อการเกิดอิมัลชัน (นิศรา สะเจริญ, 2554)

จากการทดสอบการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซน และ คลอโรฟอร์ม ที่เป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว และไม่ละลายน้ำ เพราะสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยที่เฮกเซนจะเป็นตัวแทนของสารในกลุ่มที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ เมื่อทดสอบการเกิดอิมัลชันกับน้ำเลี้ยงเชื้อจะพบว่าเฮกเซนจะอยู่บนน้ำเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่คลอโรฟอร์มจะเป็นตัวแทนของสารในกลุ่มที่มีความหนาแน่นมากกว่า เมื่อทำการทดสอบการเกิดอิมัลชันจะพบว่าคลอโรฟอร์มอยู่ส่วนล่างของน้ำเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อเอ๊กซสปันเป็นเอ๊กซสปันที่สงวนไว้สำหรับการใช้เช่นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สมควรนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า Y10.1 นั้นเกิดอิมัลชันกับเฮกเซนเท่านั้น และเชื้อ 1BC1 นั้นเกิดอิมัลชันกับคลอโรฟอร์มเท่านั้น อาจไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นผลมาจากอุณหภูมิในขั้นตอนการทดสอบ แหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานสำหรับการเกิดอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวภาพที่เชื้อสร้างกับตัวทำละลายที่นำมาทดสอบ (Kanokrat Saisa-ard et al., 2014; ญัฐซาร์ รวมญาติ, 2559; S K Satpute et al., 2008)

4.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการศึกษาการเปรียบเทียบการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ Y1.1 ทั้ง 3 วิธีได้แก่ การใช้กรดไฮโดรคลอริก เอทานอล และอะซิโตน เมื่อได้สารสกัดหยาบจะนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น และนำมาทดสอบกับคลอโรฟอร์ม พบว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกนั้นมีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง คือ 59 ส่วนเอทานอลมีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง คือ 14.67 และอะซิโตน มีการเกิดอิมัลชันที่ 24 ชั่วโมง คือ 0

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y1.1 กับคลอโรฟอร์มที่ 24 ชั่วโมง

สารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	ดัชนีการเกิดอิมัลชันของคลอโรฟอร์ม
กรดไฮโดรคลอริก	59
เอทานอล	14.67
อะซิโตน	0
น้ำกลั่น	0

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก จะทำให้ได้สารสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่ม Glycolipid และเชื้อ Y1.1 นั้นมีการติดสีแกรมบวก และมีการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลมคู่ ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อที่มีการเรียงตัวแบบกลมคู่นั้นมีการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่ม Glycolipid เช่น dyo (Ul Hassan Shah et al., 2016; Santos DK et al., 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาความสามารถในการสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส ผลจากการทดลองพบว่าจากเชื้อ 18 ไอโซเลทมีเชื้อ 8 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ซึ่งได้แก่เชื้อ N1.1 Y1.1 Y10.1 3BD1 3BD2 3AC1 3BC2 และ 1BC1 โดยพบว่าเชื้อที่สามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้โดดเด่นที่สุด คือ เชื้อ Y1.1 ซึ่งมีค่าการกระจายตัวของน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหมู และน้ำมันเครื่องเป็น 0.33 0.30 0.63 และ 0.67 เซนติเมตรตามลำดับ ส่วนการเกิดอิมัลชันกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์มมีค่าเป็น 43.37 และ 56.66 ตามลำดับโดยเชื้อ Y1.1 นั้นมีลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งเป็นรูปร่างกลม สีขาว นูน ขอบเรียบ มันวาวขนาดเล็ก และการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างกลมเป็นคู่ เมื่อนำเชื้อ Y1.1 มาสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เชื้อผลิตได้ พบว่าวิธีที่ดีที่สุดในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาถึงวิธีการทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความบริสุทธิ์เพื่อนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นไปศึกษาโครงสร้างให้แน่นอนว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นจัดอยู่ในกลุ่มใด และวิเคราะห์ให้ทราบถึงสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดังกล่าวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ขนิษฐา สมตระกูล, ดวงอนงค์ ผลาผล และ วราภรณ์ ฉวยฉาย. ความเป็นพิษของแอนทราซินและพีแนนทรินที่ปนเปื้อนในดินต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าพืชตระกูลถั่วหลังงอก. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) 2555 มกราคม-มิถุนายน; 4(7): 12.
- ณัฐชา รวมนญาติ. คุณสมบัติและการประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดต่างที่ใช้แวกซ์เป็นสารตั้งต้น. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2559.
- จิราภรณ์ ธนียวัน และคณะ. 2551. การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดวงพร คันธโชติ. (2537). อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 48- 52.
- นฤมล มาแทน. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์. 2559. [Online]. Available: <https://essentiaoil.wu.ac.th/wp-content/uploads/2019/02/ปัจจัยที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต.pdf>
- นฤมล มีบุญ และคณะ. คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* AS6 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 11(1) : 67-83 (2562).
- นิศรา ฮะเจริญ. การเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนในการแปรรูปและความคงตัวต่อความเย็นในการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์กะทิสเตอร์ไรส์. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2554.
- พรเพ็ญ วีระวัฒน์กานนท์. การเกิดปฏิกิริยาเคมีในสารละลายไมเซลล์. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 19(2), 2548.
- พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ และคนอื่น ๆ. (2551). การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อผลิตภัณฑ์สุขภาพ: รายงานการวิจัยปีที่ 2 (Production of Biosurfactant from Microorganism for Health Care Products). เชียงใหม่ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า83.
- ภัณฑิรา สิงห์คำ และคณะ. การศึกษาการหลั่งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส เอนไซม์เอสเทอเรส และฮีโมไลซินในเชื้อ *Scedosporium apiospermum*. *J Med Health Sci*. Vol. 24 No. 2 August 2017.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิชาชา ภูจินดา. การใช้ประโยชน์สารลดแรงตึงผิวในการบำบัดน้ำเสีย. วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 2548.

ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค. การติดสีแกรมของแบคทีเรีย. [Online]. Available: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_7_001c.asp?info_id=116

สุภัคชนม์ คล่องดี. ระบบอีมีลชันในอาหารและความคงตัว. วารสารวิชาการ 42 (ตุลาคม 2555): 287-290.

อลงกฎ แซมสีม่วง และคณะ. การศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน. *Journal of Community Development Research* 2011; 4(2)

Akintokun, A.K., Adebajo, S.O., Akinremi, C.A. Potential Biosurfactant-producing Bacteria from Pharmaceutical Wastewater using Simple Screening Methods in South-West, Nigeria. *Applied Environmental Research*. 39 (2): 41-54.

Alejandro de Jesús Cortés-Sánchez, Humberto Hernández-Sánchez and María Eugenia Jaramillo-Flores. 2013. "Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives". *Microbiological Research*. 168; 22-32.

Anuradha S. Nerurkar. 2010. *Structural and Molecular Characteristics of Lichenysin and Its Relationship with Surface Activity*. New York: Springer.

A. Roy. 2014. "Production and characterization of biosurfactant from bacterial isolates". Degree of Bachelor of Engineering, Netaji Subhas Institute of Technology.

Ashis K. Mukherjee and K. Das. *Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview*. In: Ramkrishna Sen, editor. *Biosurfactants*. New York: Springer Science+Business Media, LLC; 2010, p. 80-98.

Bireswar Bhattacharya, Tarun Kanti Ghosh and Nilimanka Das. 2017. "Application of Bio-Surfactants in Cosmetics and Pharmaceutical Industry". *Scholars Academic Journal of Pharmacy*. 6(7): 320-329.

C. A. M. Bondi, J. I. Marks, L. B. Wroblewski, H. S. Raatikainen, S. R. Lenox and K. E. gebhardt. 2015. "Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products”.
Environmental Health Insights. 9: 27-32.

Danyelle Khadydja F. Santos, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Valdemir A. Santos, and Leonie A. Sarubbo. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int J Mol Sci*. 2016 Mar; 17(3): 401.

Ebrahim Zahrabi, Hadi veladi, Iman Mokari Bolhasan and Rashid Hosseinzadeh. “Nano Liposomes in Novel Drug Delivery Systems : a review”. The 4th National Conference on Nanotechnology : from Theory to Application; 2016 Mar 07; Iran.

E.K. Schroeder, O. N. de Souza, D.S. Santos, J.S. Blanchard and L.A. Basso. 2002. “Drugs that Inhibit Mycolic Acid Biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis”. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 3: 197-225.

Finnerty WR and Singer ME. 1985. “Membranes of hydrocarbon utilizing microorganisms”. In: Ghosh BK (ed), *Organization of prokaryotic cell membranes*, Vol 3. CRC Press, Boca Raton, Fla., pp 1-44.

Gideon Mamou, Ganesh Babu Malli Mohan, Alex Rouvinski, Alex Rosenberg and Sigal Ben-Yehuda. 2016. “Early Developmental Program Shapes Colony Morphology in Bacteria”. *Cell Reports*. 14: 1850–1857.

G. Seydlová and J. Svobodová. 2008. “Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications”. *Cent. Eur. J. Med*. 3(2): 123-133.

Gunjan Gautam, Vishwas Mishra, Payal Verma, Ajay Kumar Pandey and Sangeeta Negi. 2014. “A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications”. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 4: 6

Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 Jun;64(6):763-81. Epub 2004 Feb 14.

Hanif Yuliani, Meka Saima Perdani, Imelda Savitri, Meilani Manurung, Muhamad Sahlan, Anondho Wijanarko and Heri Hermansyah, 2018. “Antimicrobial

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโรงเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดได้นำไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19”. *Energy Procedia*. 153: 274-278.

Hayes ME, Nestaas E and Hrebenaar KR. 1986. “Microbial surfactants”. *Chemtech*. 4: 239-243.

H. Zhao and P. Lappalainen. 2012. “A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein–lipid interactions”. *Molecular Biology of the Celltype*. 23: 2823-2830.

I. M. Banat, R. S. Makkar and S. S. Cameotra. 2000. “Potential commercial applications of microbial surfactants”. *Appl Microbiol Biotechnol*. 53: 495-508.

Jagruti V. Jadhava, Amit P. Pratapa and Sandeep B. Kateb. 2019. “Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid”. *Process Biochemistry*. 78: 15-24.

Jonathan R Coronel, Ana M Marqués, Angeles Manresa, Francisco José Gallego Aranda, José Antonio Lozano Teruel and Antonio Ortiz. 2017. “Interaction of the Lipopeptide Biosurfactant Lichenysin with Phosphatidylcholine Model Membranes”. *Langmuir*. 9997-10005.

J. Varsha, M. KD. and P. Govind. 2013. “Effects of Linear Alkyl Benzene Sulfonate on the Liver Tissues of *Puntius ticto* Fish”. *International Journal of Chemical and Life sciences*. 2(1); 1068-1070.

Kanokrat Saisa-ard, Atipan Saimmai and Suppasil Maneerat. 2014. “Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils”. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 36(2): 163-175.

Khouloud M. Barakata, Sahar W.M. Hassan, Osama M. Darwesh. Biosurfactant production by haloalkaliphilic *Bacillus* strains isolated from Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 43 (2017) 205–211.

K. Petrikova, Ya. Delegan, A. Surin, O. Ponamoreva, I. Puntus, A. Filonov and A.

Boronin. 2013. “Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure”. *Process Biochemistry*. 48: 913- 935.

Letizia Fracchia, Massimo Cavallo, Maria Giovanna Martinotti and Ibrahim M. Banat. 2012. *Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications –Present Status and Future Potentials*. Biomedical Science, Engineering and Technology. Dhanjoo N. Ghista: USA.

M. A. Dos Santos Ramos, P. B. Da Silva, L. Spósito, L. G. De Toledo, B. V. Bonifácio, C. F. Rodero, K. C. Dos Santos, M. C. and T. M. Bauab. 2018. “Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review”. *International Journal of Nanomedicine*. 13: 1179-1213.

Mansoor Ul Hassan Shah, Magaret Sivapragasam, Muhammad Moniruzzamana and Suzana Bt Yusup. 2016. “A comparison of recovery methods of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*”. *Procedia Engineering*. 148: 494-500.

Maria S. Kuyukina, Irena B. Ivshina, Tatiana A. Baeva, Olesia A. Kochina, Sergey V. Gein and Valery A. Chereshev. 2015. “Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic *Rhodococcus* actinobacteria with diverse immunomodulatory activities”. *New Biotechnology*. 32: 559-568.

Masaaki Morikawa, Hiromi Daido, Toshifumi Takao, Satoru Murata, Yasustugu Shimonishi and Tadayuki Imanaka. 1993. “A New Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38”. *Journal of Bacteriology*. 175(20): 64559-6466.

M. Y. Khan, Z. A. A Karim, F. Y. Hagos, A. R. A. Aziz and I. M. Tan. 2014. “Current Trends in Water-in-Diesel Emulsion as a Fuel”. *The Scientific World Journal*.

Oberbremer A, Muhller-Hurtig R and Wagner F. 1990. “Effect of addition of microbial surfactant on hydrocarbon degradation in soil population in a stirred reactor”. *Appl Microbiol Biotechnol*. 32: 485-489.

Olteanu Violeta, Siciua Oana, Ciuca Matilda, Carstea Doina Maria, Voaides Catalina, Campeanu Gheorghe and Cornea Calina Petruta. 2011. “Production of biosurfactants and antifungal compounds by new strains of *Bacillus* Spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การขโมย การแจกจ่าย การทำซ้ำ การเผยแพร่ การใช้งานโดยไม่ได้รับอนุญาต หรือการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

isolated from different sources”. *Romanian Biotechnological Letters*. 16: 84-91.

Paula Monteiro de Souza; Pérola de Oliveira e Magalhães. **Application of microbial α -amylase in industry - A review**. *Braz. J. Microbiol.* vol.41 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2010.

Poulami Datta, Pankaj Tiwari and Lalit M. Pandey. 2018. “Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery”. *Bioresource Technology*. 270: 439-448.

Qun Wu, Yan Zhia and Yan Xua. 2019. “Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168”. *Metabolic Engineering*. 82: 87-97.

Rajni Sharma, Jagdish Singh and Neelam Verma. 2018. “Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*”. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 16: 132-139.

Rita de Cássia F. S. Silva, Darne G. Almeida, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Valdemir A. Santos and Leonie Asfora Sarubbo. 2014. “Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills”. *International Journal of Molecular Sciences*. 15: 12523-12542.

Sagar Aryal. 2018. Casein Hydrolysis Test. [Online].

Available: <https://microbenotes.com/casein-hydrolysis-test/>

Shengli Sun, Yuxiao Wang, Tingting Zang, Jingyue Wei, Haizhen Wu, Chaohai Wei, Guanglei Qiu and Fusheng Li. 2019. “A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons”. *Bioresource Technology*. 281: 421-428.

Shepherd R, Rockey J, Shutherland IW and Roller S. 1995. “Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods”. *J Biotechnol*. 40: 207-217.

S. K Satpute, B D Bhawsar, P K Dhakephalkar & B A Chopade. **Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing**
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences* Vol. 37(3), September 2008, pp. 243-250.
- Suppasil Maneerat. 2005. "Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources". *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27(3): 675-683.
- S. Vijayakumar and V. Saravanan. 2015. "Biosurfactants-Types, Sources and Applications". *Journal of Microbiology.* 10(5): 181-192.
- Sweeta Akbari, Nour Hamid Abdurahman, Rosli Mohd Yunus, Fahim Fayaz and Oluwaseun Ruth Alara. 2018. "Biosurfactants----a new frontier for social and environmental safety: a mini review". *Biotechnology Research and Innovation.* 2: 81-90.
- Tan H, Champion JT, Artiola JF, Brusseau ML, Miller RM. 1994. "Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant". *Environ Sci Technol.* 28: 2402-2406.
- Uchida Y, Misava S, Nakahara T and Tabuchi T. 1989b. "Factor affecting the production of succinotrehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 grown on n-alkanes". *Agric Biol Chem.* 53: 765-769.
- Uchida Y, Tsuchiya R, Chino M, Hirano J and Tabuchi T. 1989a. "Extracellular accumulation of mono and di succinyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes". *Agric Biol Chem.* 53: 757-763.
- Vikas Pruthi, Swaranjit Singh Cameotra. Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation. *Biotechnology Techniques.* April 1995, Volume 9, Issue 4, pp 271-276.
- V. Walter, C. Sylstatk, and R. Hausman. 2013. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. Retrieved June 25, 2019, From Madame Curie Bioscience Database
Web site: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6189/>
- William W. Christie. 2019. Rhamnolipids, Sophorolipids and Other Simple Glycolipids. [Online].
Available: <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/rhamno/index.htm>

Xing-Zhong Yuan, Xin Peng, Hua-Jun Huang et al. Precipitation and Recovery of Cellulase using Biosurfactant. *Separation Science and Technology*, Volume 49, 2014 - Issue 14.

Yamane T. 1987. "Enzyme technology for the lipid industry". An engineering overview. *J Am Oil Chem Soc.* 64: 1657-1662.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptone Soya Broth (TSB)

Tryptone	17 g
Soya peptone	3 g
Sodium Chloride	5 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5 g
Dextrose (Glucose)	2.5 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

ชั่ง TSB 30 กรัม ต้มให้ละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วใส่ในขวดน้ำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ในกรณีที่เตรียม TSA ใส่ agar 1.2 %

2. Sheep blood agar 3 %

อาหาร TSB	285 ml
Agar	3 g
เลือดแกะ	15 ml

ชั่งอาหาร TSB 8.55 กรัม และ agar 3.42 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 285 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส แล้วทำการผสมเลือดแกะ 15 มิลลิลิตร

3. Skim milk agar 2 %

ผง skim milk	2 g
--------------	-----

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร TSB	2.7 g
น้ำกลั่น	90 ml
Agar	1.08 g

ชั่งอาหาร TSB 2.7 กรัม และ agar 1.08 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 90 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นชั่งผง skim milk ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที และนำมาผสมกับอาหาร

4. Starch agar 0.2 %

Starch	0.2 g
อาหาร TSB	3.0 g
น้ำกลั่น	100 ml
Agar	1.2 g

ชั่งอาหาร TSB 3.0 กรัม Starch 0.2 กรัม และ agar 1.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Tributyrin agar 1 %

Tributyrin	1 ml
อาหาร TSB	2.97 g
น้ำกลั่น	99 ml
Agar	1.188 g

ชั่งอาหาร TSB 2.97 กรัม Starch และ agar 1.188 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 99 มิลลิลิตร ปิเปต Tributyrin 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 M

ตวงกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 11.65 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 M

ชั่ง NaOH 4 กรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

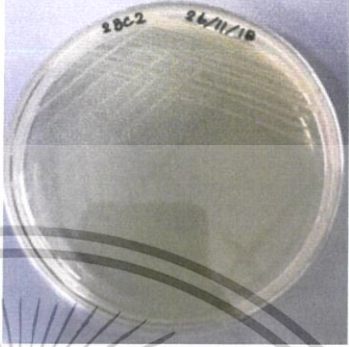

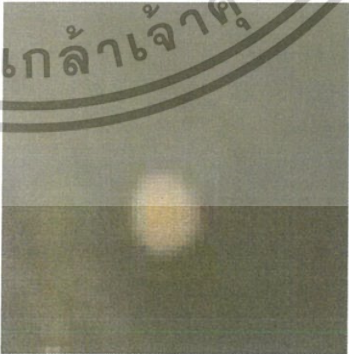
ตารางแสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และคุณสมบัติแบคทีเรียที่
สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะ
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ไอโซเลข	การเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA
3BC3	
3AC1	
1BC1	

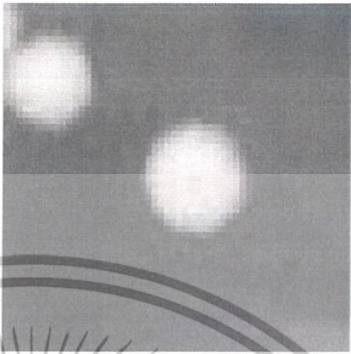



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงลักษณะทางสีฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA
2BC2	
5AC2	
5AC1	

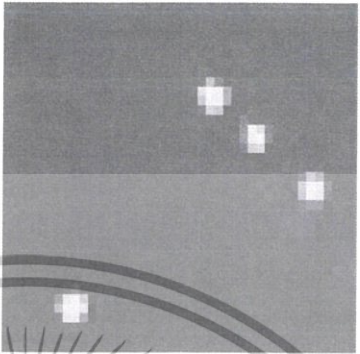


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงลักษณะทางสีฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะ
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA
1BC4	
3BD2	
2BC1	
5AC3	


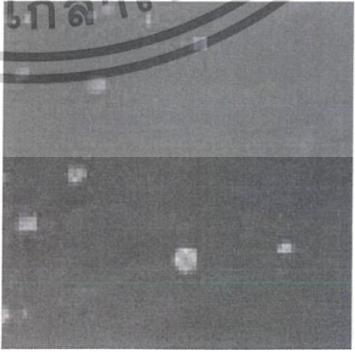
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงลักษณะทางสีฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA
3BD1	
1BC3	
3BC2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงลักษณะทางสัญญาณวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ต่อ)

ไอโซเลต	การเจริญของเชืบนอาหารแข็งเชื้อ TSA
Y1.1	
Y5.1	
Y14.1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงลักษณะทางสีฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของเชืบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA
L6.1	
Y10.1	
L5.1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

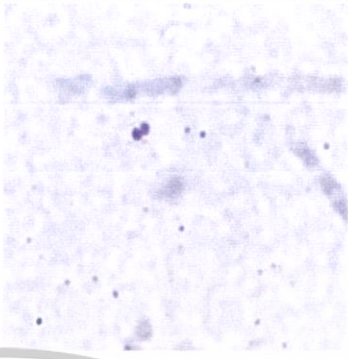

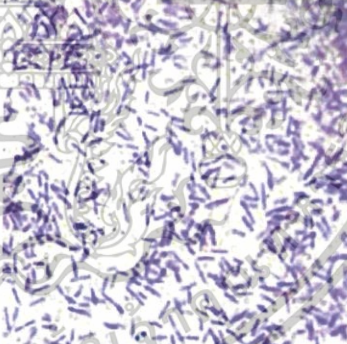
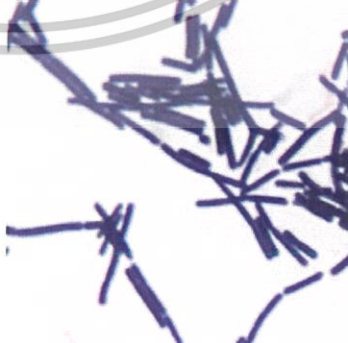
ตารางภาคผนวก ค.1 แสดงลักษณะทางสีฐานวิทยาของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ต่อ)

ไอโซเลท	การเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA
N1.1	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.2 แสดงการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ

ไอโซเลท	การติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ
3BC3	
3AC1	
1BC1	
5AC3	

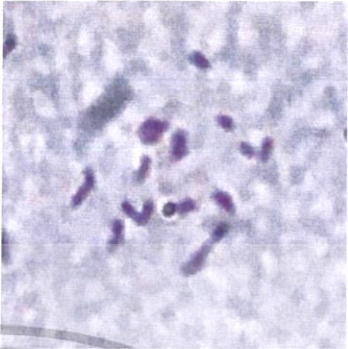


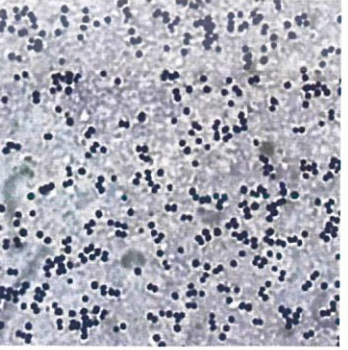
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.2 แสดงการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ (ต่อ)

ไอโซเลท	การติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ
2BC2	
5AC2	
5AC1	
3BD2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.2 แสดงการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ (ต่อ)

ไอโซเลท	การติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ
2BC1	
3BD1	
3BC2	
Y1.1	

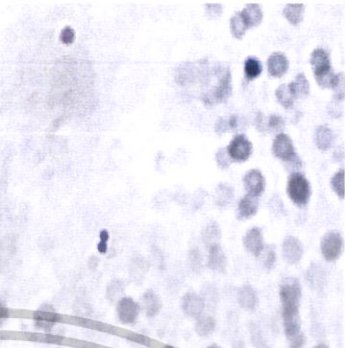

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.2 แสดงการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ (ต่อ)

ไอโซเลท	การติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ
Y5.1	
Y14.1	
L6.1	
Y10.1	


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.2 แสดงการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ (ต่อ)

ไอโซเลท	การติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ
L5.1	
N1.1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงการย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar

ไอโซเลท	การย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar
3BC3	
3AC1	
1BC1	
5AC3	

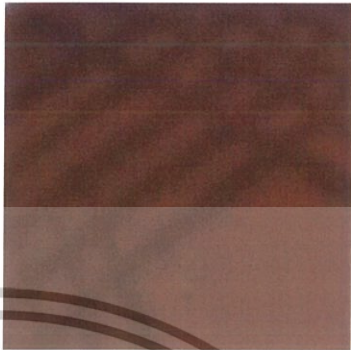


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงการย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar (ต่อ)

ไอโซเลท	การย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar
2BC2	
5AC2	
5AC1	
3BD2	

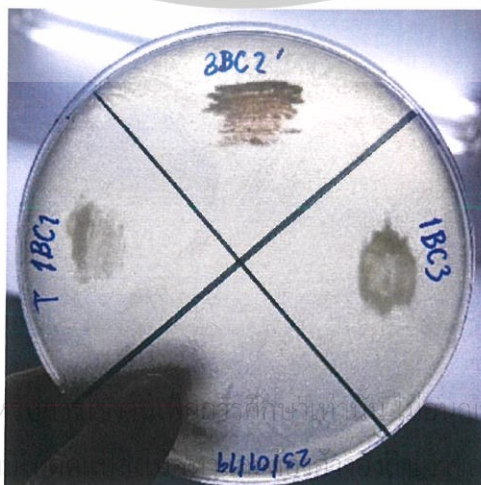
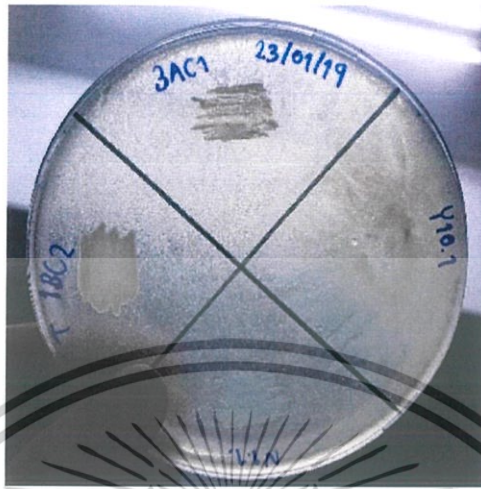
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษารายงาน ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.3 แสดงการย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar (ต่อ)

ไอโซเลต	การย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Blood agar
2BC1	
3BD1	
3BC2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.4 แสดงการทดสอบการย่อยไขมัน

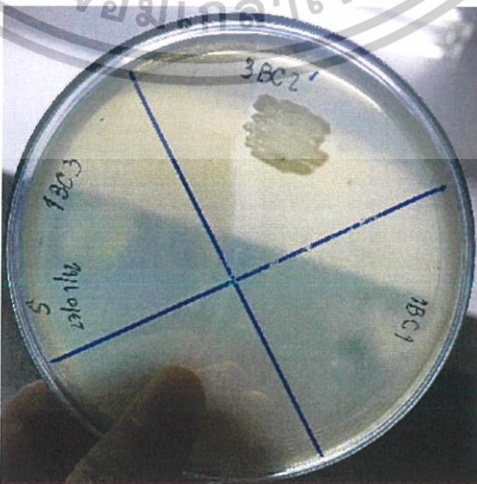
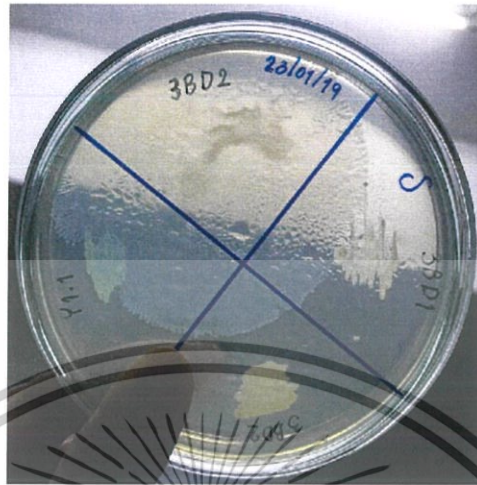


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ
ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้าม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ
ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้าม

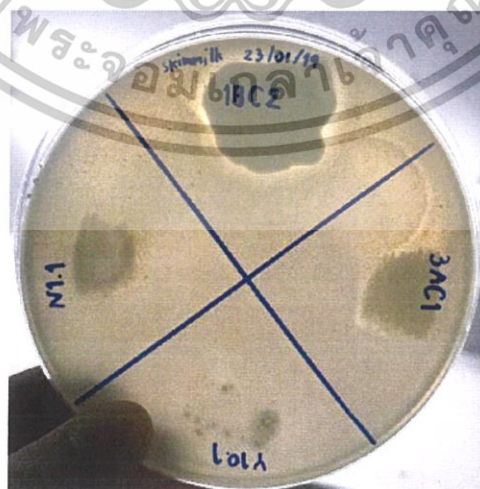
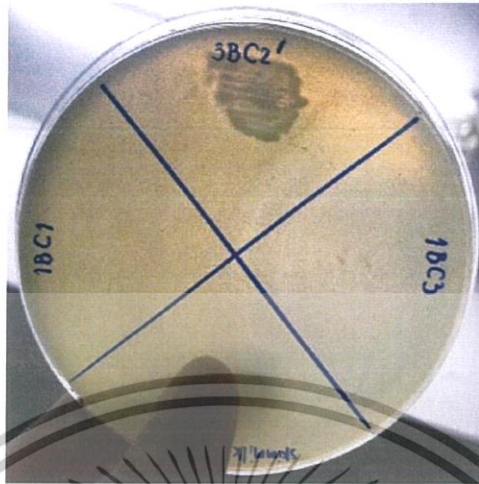
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ
ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้าม

ตารางภาคผนวก ค.5 แสดงภาพการทดสอบการย่อยแป้ง



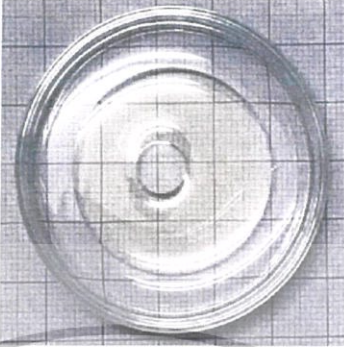


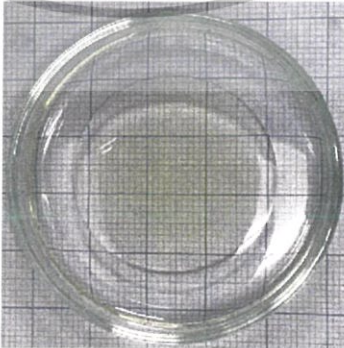
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.6 แสดงภาพการทดสอบการย่อยโปรตีน



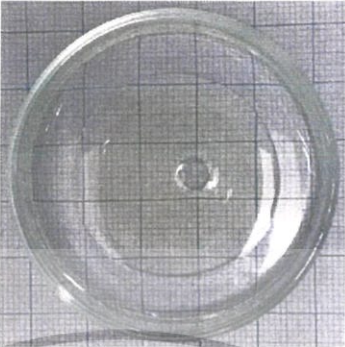


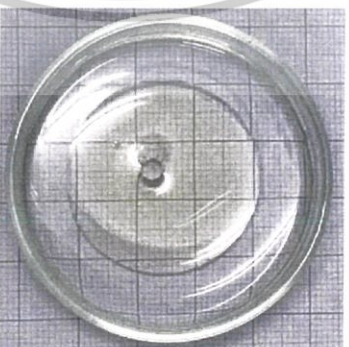
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.7 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันปาล์ม

ไอโซเลข	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันปาล์ม
N1.1	
Y1.1	
Y10.1	
3BD1	


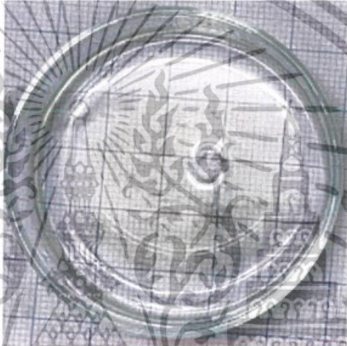

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.7 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันปาล์ม (ต่อ)

ไอโซเลข	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันปาล์ม
3BD2	
3AC1	
3BC2	
1BC1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.7 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันปาล์ม (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันปาล์ม
น้ำกลั่น	
อาหาร	
อาหารผสม Tween 20 ความเข้มข้น 1%	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.8 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันถั่วเหลือง

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันถั่วเหลือง
N1.1	
Y1.1	
Y10.1	
3BD1	

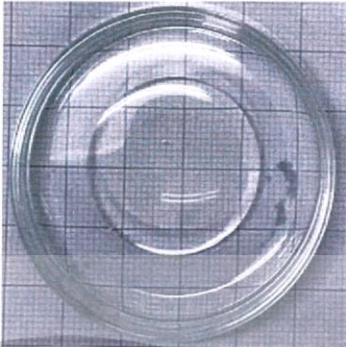

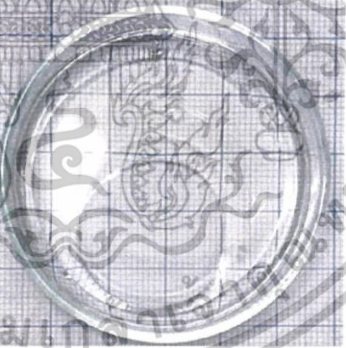
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.8 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันถั่วเหลือง (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันถั่วเหลือง
3BD2	
3AC1	
3BC2	
1BC1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.8 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันถั่วเหลือง (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันถั่วเหลือง
น้ำกลั่น	
อาหาร	
อาหารผสม Tween 20 ความ เข้มข้น 1%	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.9 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันหมู

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันหมู
N1.1	
Y1.1	
Y10.1	
3BD1	

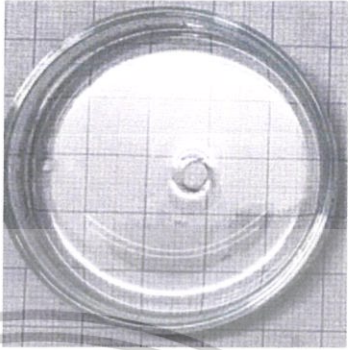


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.9 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันหมู (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันหมู
3BD2	
3AC1	
3BC2	
1BC1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.9 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันหมู (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันหมู
น้ำกลั่น	
อาหาร	
อาหารผสม Tween 20 ความ เข้มข้น 1%	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.10 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันเครื่อง

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันเครื่อง
N1.1	
Y1.1	
Y10.1	
3BD1	

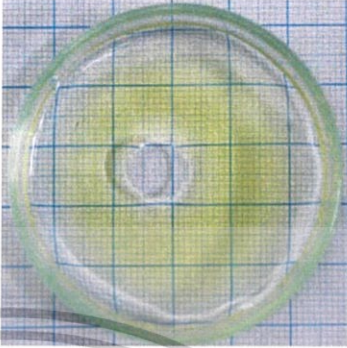


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น หากนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.10 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันเครื่อง (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันเครื่อง
3BD2	
3AC1	
3BC2	
1BC1	

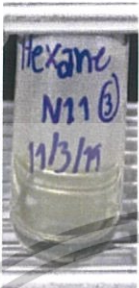
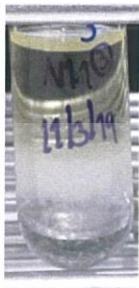


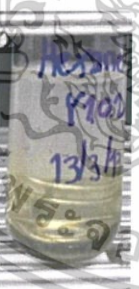

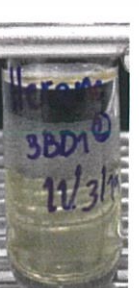

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.10 แสดงการกระจายตัวของน้ำเลี้ยงที่ได้จากเชื้อในน้ำมันเครื่อง (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพการกระจายตัวในน้ำมันเครื่อง
น้ำกลั่น	
อาหาร	
อาหารผสม Tween 20 ความเข้มข้น 1%	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.11 แสดงการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์มที่ 24 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ภาพแสดงการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซน	ภาพการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับคลอโรฟอร์ม
N1.1		
Y1.1		
Y10.1		
3BD1		

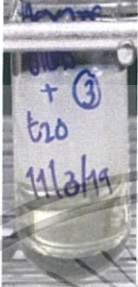
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.11 แสดงการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์มที่ 24 ชั่วโมง (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพแสดงการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซน	ภาพการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับคลอโรฟอร์ม
3BD2		
3AC1		
3BC2		
1BC1		

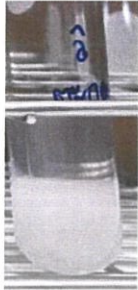
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.11 แสดงการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซนและคลอโรฟอร์มที่ 24 ชั่วโมง (ต่อ)

ไอโซเลท	ภาพแสดงการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับเฮกเซน	ภาพการเกิดอิมัลชันของน้ำเลี้ยงเชื้อกับคลอโรฟอร์ม
อาหารเลี้ยงเชื้อ และ tween20		
อาหารเลี้ยงเชื้อ		
น้ำกลั่น		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.12 แสดงการเกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้กรดไฮโดรคลอริกกับคลอโรฟอร์ม

สารทดสอบ	ภาพการเกิดอิมัลชันกับคลอโรฟอร์ม
สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ละลายในน้ำกลั่น	

ตารางภาคผนวก ค.13 แสดงการเกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้เอทานอลกับคลอโรฟอร์ม

สารทดสอบ	ภาพการเกิดอิมัลชันกับคลอโรฟอร์ม
สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้เอทานอลที่ละลายในน้ำกลั่น	

ตารางภาคผนวก ค.14 แสดงการเกิดอิมัลชันของสารสกัดหยาบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ใช้อะซิโตนกับคลอโรฟอร์ม

สารทดสอบ	ภาพการเกิดอิมัลชันกับคลอโรฟอร์ม
สารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยใช้อะซิโตนที่ละลายในน้ำกลั่น	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญตเห็นใบเซปรีเชียนดำเนินการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้