

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดิน

ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING
BACTERIA FROM SOIL



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF BIOSURFACTANT PRODUCING
BACTERIA FROM SOIL



A SPERICAL 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในสถาบันการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดิน		
ชื่อนักศึกษา	นางสาว กัญยากานต์ วิเศษสิงห์	รหัสนักศึกษา	58050859
	นางสาว จิรภัทร์ กิ่งจงเจริญสุข	รหัสนักศึกษา	58050869
	นาย รัชต เหมจันทร์	รหัสนักศึกษา	58050958
ปริญญาบัตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.กานต์ วงศ์าริยะ		



ปัญหาสิ่งแวดล้อมในปัจจุบันที่เป็นผลมาจากการปนเปื้อนน้ำมันและไขมันในแหล่งน้ำ ส่งผลกระทบต่อการอุปโภคบริโภคของมนุษย์ การดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ และการเจริญเติบโตของพืชน้ำ ในปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน ใช้วิธีการบำบัดทางเคมี ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการบำบัดทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบำบัดน้ำเสีย การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมันเป็นวิธีการบำบัดทางชีวภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ร้อนที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดินบริเวณป่าพรุ จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินทั้งหมด 35 ไอโซเลท จากการทดสอบพบว่าไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท และทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน ทดสอบการเกิดอิมัลชัน ผลการทดสอบพบว่ามี 2 ไอโซเลท ได้แก่ S1(13/2) และ S2(9) ที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ โดยไอโซเลท S1(13/2) ให้ผลการทดสอบการเกิดการกระจายตัวของน้ำมันดีที่สุดเมื่อทดสอบกับน้ำมันเครื่อง และผลการทดสอบการเกิดอิมัลชัน พบว่าไอโซเลท S1(13/2) ให้ค่าดัชนีอิมัลชันสูงที่สุดเมื่อทดสอบกับเฮกเซน จากการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขอสงวนค่าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of biosurfactant producing bacteria from soil		
Students	Miss. Kunyakarn Wisatesing	Student ID 58050859	
	Miss. Jirapat Kingchongcharoensuk	Student ID 58050869	
	Mr. Rachata Hemjun	Student ID 58050958	
Degree	Bachelor of Science (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 oil and fat in public water resource is one of the major concerning environmental problems. Because it affects the existence of human, aquatic animal, and aquatic plant. The chemical treatment is usually used for solving the problems because it easy and no time consuming. However, some by-products from the chemical processes are not eco-friendly. So that the biotechnology for treatment of oil and fat waste in public water resource is one of the interesting options because it safe and eco-friendly. This research aims to study the ability for biosurfactant production from the heat resistant bacteria which were isolated from fresh water swamp forest in Kanjanaburi province. The 35 isolates were obtained from soil sample and 26 isolates could produce lipase activity. The lipase positive isolates were selected to determine the ability for production of biosurfactant by red blood cell digestion test, oil displacement test, and emulsion test. The result show that only 2 isolates (S1(13/2) and S2(9)) out of 26 lipase positive isolates were able to produce biosurfactant. The results of oil displacement test showed that isolate S1(13/2) exhibited the strongest activity with motor oil. For emulsion test, the isolate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

precipitation with 6N HCl was the best method for separating crude biosurfactant from culture broth which was produced by isolate S1(13/2).

Keyword: Biosurfactant, Fresh water swamp forest, Heat resistant bacteria



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ที่นักศึกษาทำการศึกษาค้นคว้าการทดลองครั้งนี้ได้รับการสนับสนุน ให้คำปรึกษาแนวทางและการอนุเคราะห์ด้านวัสดุอุปกรณ์ สถานที่ปฏิบัติงาน โดย ดร.กานต์ วงศาริยะ เป็นที่ปรึกษาโครงการพิเศษครั้งนี้ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ และให้ยืมใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

ขอบคุณเพื่อนๆที่ช่วยให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการและการจองเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ



กันยากานต์ วิเศษสิงห์

จิรภัทร์ กิ่งจงเจริญสุข

รชต เหมจันทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant).....	3
2.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	4
2.2.1 ไกลโคลิพิด (glycolipid).....	4
2.2.2 ไลโปเปปไทด์ (Lipopeptides) และ ไลโปโปรตีน(Lipoprotine).....	5
2.2.3 กรดไขมันและไขมัน (fatty acid and natural lipid).....	5
2.2.4 ฟอสโฟลิพิด (phospolipid).....	6
2.2.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymericbiosurfactant).....	6
2.2.6 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactants).....	7
2.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย.....	7
2.3.1 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolyticactivity).....	7
2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้.....	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension).....	7
2.4.2 การวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันกัน (interfacial tension).....	8
2.4.3 การวัดการเกิดอิมัลชัน (emulsion).....	8
2.4.4 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (micelle).....	9
2.4.5 การหาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement)	9
2.5 การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	10
2.5.1 การตกตะกอนด้วยกรด.....	10
2.5.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์.....	10
2.5.3 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	10
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	14
3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์.....	14
3.2 ขั้นตอนการวิจัย.....	15
3.2.1 การเตรียมตัวอย่างดิน.....	15
3.2.2 การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี spread plate.....	15
3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	16
3.2.4 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย.....	16
3.2.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	16
3.2.4.2 การวัดการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index).....	16
3.2.4.3 การวัดการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)	17
3.2.5 การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak plate	18
3.2.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	18
3.2.7 การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย	18
3.2.7.1 การตกตะกอนด้วยเอทานอล	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7.2 การตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรด..... 19

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.2.8 ศึกษาความคงตัวของอนุภาคของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้	20
3.2.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น	20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	21
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส	21
4.2 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย	22
4.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)....	22
4.2.2 การเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index).....	22
4.2.3 ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement).....	24
4.5 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	28
4.6 การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	29
4.7 ศึกษาความคงตัวของอนุภาคของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้	30
4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	33
5.1 สรุปผลการวิจัย	33
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	41
ภาคผนวก ก.....	42
ภาคผนวก ข.....	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 วิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด	11
4.1 การเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย.....	23
4.2 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (Oil displacement) ในน้ำมันต่างๆ.....	25
4.3 ค่าการเกิดอิมัลชัน (Emulsification Index) ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S1 (13/2)	29
4.4 น้ำหนักตะกอนแห้งที่ตะกอนด้วยเอทานอลและตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรด.....	30



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	3
2.2 ลักษณะการเกิดไมเซลล์.....	4
2.3 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิปิด.....	4
2.4 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไลโปเปปไทด์.....	5
2.5 โครงสร้างของ Spiculisporic acid.....	5
2.6 โครงสร้างของฟอสโฟลิปิด.....	6
2.7 โครงสร้างของอิมัลชัน ซึ่งผลิตจาก <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	6
2.8 การทดสอบการเกิดอิมัลชันระหว่าง n-Hexadecane กับส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> PAO1 และ <i>P. aeruginosa</i> -estA.....	8
2.9 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวในน้ำ.....	9
4.1 ลักษณะการเกิดวงใสและไม่เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ของแบคทีเรียที่ทดสอบการผลิต เอนไซม์ไลเปส.....	21
4.2 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -Hemolysis ของแบคทีเรีย S1(13/2) และ S2(9).....	22
4.3 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำเครื่อง.....	26
4.4 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันหมู.....	27
4.5 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันถั่วเหลือง.....	27
4.6 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันปาล์ม.....	28
4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2).....	32
ข.1 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2).....	45
ข.2 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ของเชื้อแบคทีเรีย S2(9).....	45
ข.3 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของเชื้อแบคทีเรีย Y10.1.....	46
ข.4 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของเชื้อแบคทีเรีย Y1.1.....	46
ข.5 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของเชื้อแบคทีเรีย 3BD2.....	47
ข.6 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของน้ำกลั่น.....	47
ข.7 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของอาหาร TSB.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ข.7 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของอาหาร TSB..... 48
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.8 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ของอาหารรวมกับ Tween 20 (2%).....	48
ข.9 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันในน้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2)	49
ข.10 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันในน้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย S2(9)	49
ข.11 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันในน้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย Y10.1	50
ข.12 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันในน้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย Y1.1	50
ข.13 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันในน้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย 3BD2.....	51
ข.14 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันในน้ำมันเครื่องของอาหารกับ Tween 20(2%).....	51
ข.15 การตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการตกตะกอนด้วยกรด	52
ข.16 ลักษณะตะกอนของเชื้อแบคทีเรียS1(13/2) ที่ตกตะกอนด้วยกรด.....	52
ข.17 ลักษณะตะกอนของเชื้อแบคทีเรียS1(13/2) ที่ตกตะกอนด้วยกรดหลัง Freeze dry.....	52
ข.18 ค่าอิมัลชันของตะกอนหลังจากการตกตะกอนด้วยกรดของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2)	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) คือ สารที่มีลักษณะเป็น amphiphilic molecules ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างหลัก ได้แก่ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic part) ซึ่งเป็นส่วนที่มีขั้ว และอีกส่วนหนึ่งคือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic part) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วและมีคุณสมบัติชอบไขมัน จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวข้างต้น เมื่อสารลดแรงตึงผิวละลายในสารผสมระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว เช่น น้ำกับน้ำมัน หรือน้ำตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของสารลดแรงตึงผิวจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารที่ไม่มีขั้ว เช่น น้ำมัน ในขณะที่ส่วนที่ชอบน้ำจะเข้าปฏิกิริยากับส่วนที่มีขั้ว เช่น น้ำ ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ โดยสารที่ไม่มีขั้วจะอยู่ในโครงสร้างของไมเซลล์ เป็นผลทำให้เกิดการรวมตัวกันระหว่างสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว เรียกการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นว่าการเกิดอิมัลชัน (Desai, 1997) จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นจึงมีการนำสารลดแรงตึงผิวมาใช้เป็น emulsifier ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สบู่ ยาสระผม น้ำยาล้างจาน ผงซักฟอก และเครื่องสำอาง เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารลดแรงตึงผิวบางชนิด เช่น Sodium lauryl sulfate (SLS) ที่เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางสามารถส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค โดยก่อให้เกิดการระคายต่อผิวหนังและก่อให้เกิดอาการแพ้ และนอกจากนี้ยังพบว่าสาร Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) ที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดเสื้อผ้าและผลิตภัณฑ์ล้างจาน สามารถก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและดวงตาได้ (พิมพ์พร สีลาพรพิสิฐ, 2532 ; Yoneyana et al., 1977)

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องยกเลิกหรือลดการใช้สารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ที่ส่งผลกระทบต่อชีวอนามัยของผู้บริโภค ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากดิน เพื่อใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอันนำไปสู่การลดหรือทดแทนการใช้สารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ร้อนที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดิน
- 2) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตการวิจัย

คัดแยกแบคทีเรียที่ร้อนที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดิน ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเบื้องต้นโดยการทดสอบการย่อยไขมัน และทดสอบการย่อย เม็ดเลือดแดง ทดสอบสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากแบคทีเรีย ได้แก่ การเกิดอิมัลชันและค่าการกระจาย ตัวในน้ำมัน เลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพเกิดอิมัลชันและค่าการกระจายตัวในน้ำมันดีที่สุดมา ทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวของเชื้อแบคทีเรีย สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการตกตะกอนแบบปรับพีเอชด้วยกรดและการตกตะกอนด้วยเอทานอลเปรียบเทียบ ด้วยการทดสอบการเกิดอิมัลชัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ร้อนที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและผลิตเอนไซม์ไลเปส
- 2) แบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) หมายถึง สารชีวโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface-active molecule) ซึ่งผลิตจากสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และราบางชนิด สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีโครงสร้างเป็นแบบแอมฟิพาธิค (amphipathic) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (hydrophilic portion) ส่วนใหญ่ได้แก่ โปรตีน และน้ำตาล ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีหมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่อะมิโน และหมู่ฟอสเฟต เป็นต้น สำหรับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic portion) ซึ่งจะเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีทั้งขนาดและโครงสร้างแตกต่างกันออกไปทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปด้วย (Fiechter, 1992)



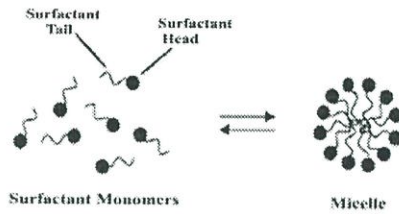
รูปที่ 2.1 ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ที่มา : Frazer, 2000

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนมากจะมีประจุสุทธิเป็นกลางหรือลบ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นลบนั้น อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของหมู่คาร์บอกซิลหรือหมู่ฟอสเฟต เป็นต้น ส่วนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประจุเป็นบวกนั้น อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของหมู่แอมีน

สารลดแรงตึงผิวเมื่ออยู่ในตัวทำละลาย เช่น น้ำ จะเกิดการรวมตัวกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) โดยจะหันเอาส่วนที่ชอบน้ำไว้ด้านนอกและส่วนที่ไม่ชอบน้ำไว้ด้านใน การเกิดโครงสร้างในรูปไมเซลล์ทำให้สารลดแรงตึงผิวละลายน้ำได้และสามารถลดแรงตึงระหว่างชั้น (phase) ของสารที่มีขั้วแตกต่างกันได้ เช่น ระหว่างน้ำมันกับน้ำ อากาศกับน้ำ (Desai and Banat, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ลักษณะการเกิดไมเซลล์

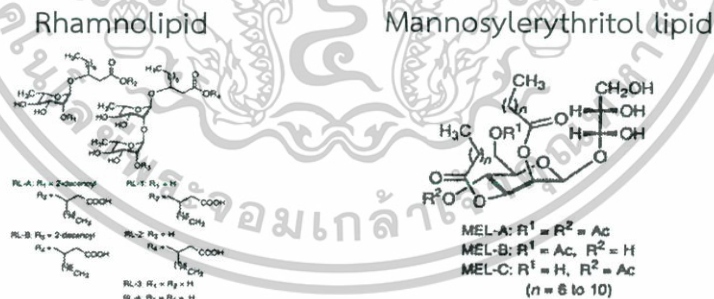
ที่มา : Evans and Wennerstrom, 1999

2.2 ชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ สามารถแบ่งได้ 6 กลุ่ม ตามโครงสร้างทางเคมี ได้แก่

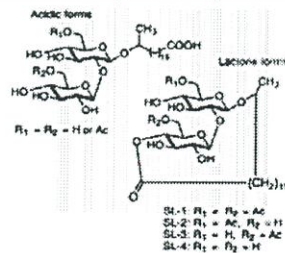
2.2.1 ไกลโคลิพิด (glycolipid)

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกับ aliphatic acids หรือ hydroxyaliphatic acids สารลดแรงตึงผิวกลุ่ม ไกลโคลิพิด ที่พบและรู้จักกันดี ได้แก่ แรมโนลิพิด (rhamnolipid) ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* LBI (Benincasa et al., 2002) ทรีฮาโลสลิพิด (trehalose lipid) ผลิตได้จาก *Rhodococcus* sp. (Ortiz et al., 2008) แมนโนซิลเออร์ไรโทลลิพิด (Mannosylerythritol lipid) ผลิตได้จาก *Pseudozyma aphidis* (Rau et al., 2004) โซโฟโรลิพิด (sophorolipid) ผลิตได้จาก *Candida bombicola* ATCC 22214 (Elshafie et al., 2005) เป็นต้น



Trehalose lipid

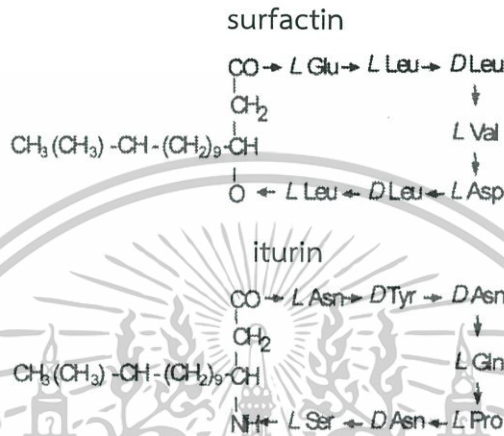
Sophorolipid



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์รูปที่ 2.3 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไกลโคลิพิดใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดทอนจาก Kitamoto et al., 2002 เจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ไลโปเปปไทด์ (lipopeptides) และไลโปโปรตีน (lipoprotein)

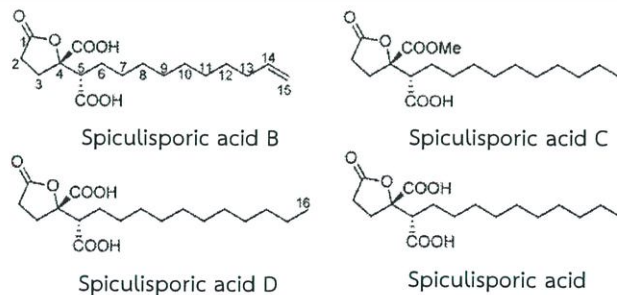
เป็นสารลดแรงตึงผิวที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิด ซึ่งสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้ส่วนมากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น surfactin ซึ่งเป็นไลโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวนผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (Arima et al., 1968) iturin ซึ่งเป็นไลโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* (Yu et al., 2002)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไลโปเปปไทด์
ที่มา : Ahimou et al., 2000

2.2.3 กรดไขมันและไขมัน (fatty acid and natural lipid)

กรดไขมันและไขมันสามารถพบได้ในจุลินทรีย์ทุกชนิด โดยจะผลิตและหลั่งออกนอกเซลล์ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ โมโนกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งสารเหล่านี้จะผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารที่มีส่วนประกอบของไฮโดรคาร์บอน ซึ่งให้เห็นถึงคุณสมบัติการก่ออิมัลชันของสารได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว เช่น Spiculisporic acid ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus candidus* strain HDF2 (Wang et al., 2015)

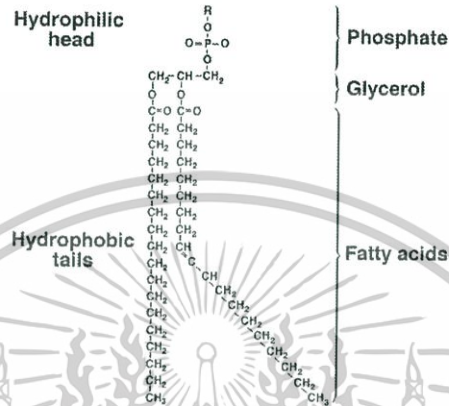


รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ Spiculisporic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยทางวิชาการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ที่มา : Wang et al., 2012

2.2.4 ฟอสโฟลิพิด (phospholipid)

ฟอสโฟลิพิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์จุลินทรีย์ เช่น ฟอสโฟลิพิดของ *Acinetobacter sp.* (Saharan et al., 2011) แต่มีจำนวนน้อยที่ถูกปล่อยออกนอกเซลล์ หรือสามารถวัดสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิว โครงสร้างฟอสโฟลิพิดโดยทั่วไปประกอบด้วยกลีเซอรอล เชื่อมต่อกับกรดไขมัน 2 หมู่ และฟอสเฟต 1 หมู่ด้วยพันธะเอสเทอร์

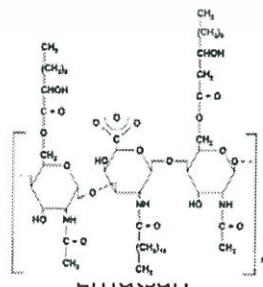


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของฟอสโฟลิพิด

ที่มา : Ebrahim Zahrabi et al., 2016

2.2.5 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นที่รู้จักทั่วไป ได้แก่ อิมัลแซน ซึ่งผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus* (Desai and Banat, 1997) ไลโพนแซน ผลิตจาก *Candida lipolytica* (Michael et al., 1984) แมนโนโปรตีน ซึ่งมีอยู่ในผนังเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* (Cameron et al., 1988) และสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซคคาไรด์กับโปรตีน อิมัลแซน สามารถก่ออิมัลชันระหว่างสารประกอบไฮโดรคาร์บอนกับน้ำได้ดีที่ความเข้มข้นเพียง 0.001-0.01 เปอร์เซ็นต์ และอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความคงตัวอีกด้วย (Gautam and Tyagi, 2006)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของอิมัลแซน ซึ่งผลิตจาก *Acinetobacter calcoaceticus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่น กรุณาแจ้งเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : Desai and Banat, 1997

2.2.6 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactants)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดอนุภาคเป็นส่วนหนึ่งของ extracellular membrane vesicle ที่รวมตัวกันเป็นไมโครอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ โดยมีบทบาทในการนำอัลเคน (alkane) เข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ (Monteiro et al., 2007; Mukherjee et al., 2006; Ortiz et al., 2006) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ประกอบด้วยโปรตีน ฟอสโฟลิปิด และ โลโพลีแซ็กคาไรด์ โดย membrane vesicle เหมือนกับ outer membrane ของจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น เช่น Vesicles ของ *Acinetobacter* sp. strain HO1-N (Kaeppli and Finnerty, 1979)

2.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อแบคทีเรียในเบื้องต้น

2.3.1 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

การย่อยสลายของเม็ดเลือดแดงเป็นวิธีคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเบื้องต้น โดยมีการสร้าง Hemolysin และปล่อยออกมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยการทดสอบนี้พัฒนาโดย Mulligan et al., 1984 ซึ่งจากรายงานของ Carrillo et al., 1996; Youssef et al., 2004 พบว่า blood agar lysis เหมาะที่จะเป็นวิธีคัดเลือกเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในเบื้องต้น (Primary method)

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถวัดการผลิตและประสิทธิภาพได้หลายวิธี เช่น การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension) การวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างสองพื้นผิวที่สัมผัสกัน (interfacial tension) การวัดการเกิดอิมัลชัน (emulsification) การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration (CMC)) และการหาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement) เป็นต้น

2.4.1 การวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension)

เป็นการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับอากาศ ซึ่งเป็นวิธีใช้บอกคุณภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สำคัญ มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือไดน์ (dyne) ส่วนใหญ่ใช้วิธีวัดจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (supernatant) โดยถ้าสามารถลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 40 mN/m ได้ แสดงว่าสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ถ้าลดค่าแรงตึงผิวได้ต่ำกว่า 35 mN/m แสดงว่ามีประสิทธิภาพดี (Cooper, 1986)

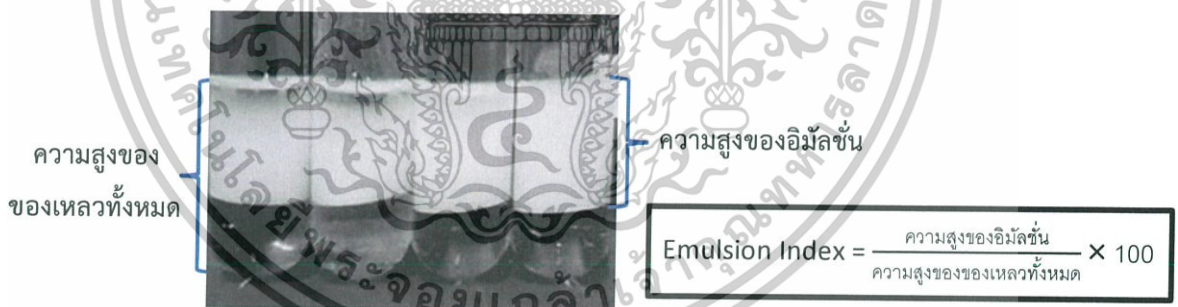
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันกัน (interfacial tension)

เป็นการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างของเหลวกับของเหลว มีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) โดยพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทั่วไปสามารถลดค่าแรงตึงผิวระหว่างผิวที่ประจันกันลงได้เหลืออยู่ในช่วง 0.1-1.0 mN/m (Gerson, 1993)

2.4.3 การวัดการเกิดอิมัลชัน (emulsification)

การวัดการเกิดอิมัลชัน (emulsification) เป็นการวัดความสามารถในการทำให้น้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอนรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำให้เกิดอิมัลชันระหว่างน้ำกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เป็นผลทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดการแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ กระจายตัวแทรกอยู่ในน้ำ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างน้ำและสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Cooper and Zajic, 1980) การวัดประสิทธิภาพในการเกิดอิมัลชันอาจทำได้โดยการวัดค่าดัชนีการเกิดอิมัลชัน (emulsion index) คือ การวัดอัตราส่วนระหว่างความสูงของอิมัลชันและความสูงของของเหลวทั้งหมด (Patel and Desai, 1997) โดยพบว่าสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมได้ ควรมีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันมากกว่าร้อยละ 50 (Willumsen and Karlson, 1997)



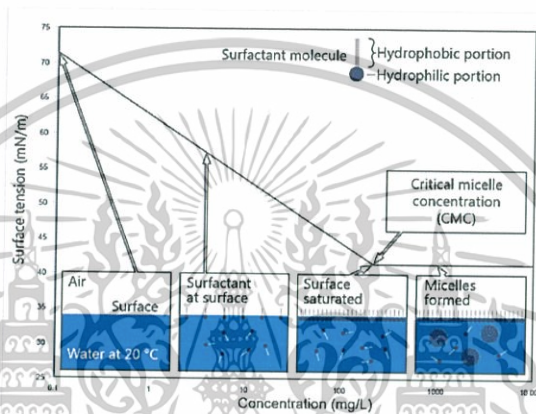
รูปที่ 2.8 การทดสอบการเกิดอิมัลชันระหว่าง n-Hexadecane กับส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ของเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 และ *P. aeruginosa*-estA

ที่มา : Dobler et al., 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 การหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์

ความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration (CMC)) คือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างไมเซลล์ สามารถหาค่า CMC ได้จากกราฟระหว่างค่าแรงตึงผิวกับค่าความเข้มข้นที่ระดับต่างๆของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งค่า CMC ใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวได้ และค่า CMC จะมีค่าต่างกันตามชนิดของสารลดแรงตึงผิวและอุณหภูมิที่ต่างกัน (Desai and Banat, 1997)



รูปที่ 2.9 การเกิดโครงสร้างไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวในน้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวจนถึงจุดความเข้มข้นวิกฤตของการเกิดไมเซลล์ และเมื่อเกิดเป็นโครงสร้างไมเซลล์แล้ว ค่าแรงตึงผิวจะมีค่าคงที่ แม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวก็ตาม (Gillman, 1993)

ที่มา : www.kruss-scientific.com

2.4.5 การหาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (oil displacement)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการทำให้เกิดวงใส (clear zone) บนผิวหน้าน้ำมัน เนื่องจากแผ่นฟิล์มของน้ำมันบนผิวน้ำเกิดการแตกกระจายไปจากผิวน้ำ กลายเป็นหยดน้ำมันเล็กๆลงไปในชั้นน้ำ โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) บนผิวหน้าน้ำมันนี้มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมลดแรงตึงผิว นอกจากใช้วัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและประหยัดค่าใช้จ่ายแล้ว ยังเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวัดค่าการกระจายตัวของน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เนื่องจากใช้สารปริมาณเล็กน้อยในการวิเคราะห์ จึงเหมาะกับสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เนื่องจากมักจะมีปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วยกรด การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

2.5.1 การตกตะกอนด้วยกรด

สารลดแรงตึงผิวที่นำมาตกตะกอนด้วยกรดจะต้องมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำในค่าพีเอชต่ำ สารลดแรงตึงผิวที่มักนำมาใช้ตกตะกอนด้วยวิธีนี้ คือ surfactin (Faria et al., 2011) โดยหลังจากเลี้ยงเชื้อนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) มาตกตะกอนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Priya and Usharani, 2009) หรือใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ (Salehizadeh, 2009; Zhi-feng et al., 2010) แล้วทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนและนำตะกอนที่ได้นำไปล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งนำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 2 นอร์มอล (Priya and Usharani, 2009; Salehizadeh and Mohammadizad, 2009; Zhi-feng et al., 2010)

2.5.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

สารลดแรงตึงผิวที่นำมาตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะต้องละลายน้ำได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากมีส่วนปลายที่ไม่ชอบน้ำ สารลดแรงตึงผิวที่มักนำมาใช้ตกตะกอนด้วยวิธีนี้ คือ Trehalolipids (Rapp et al., 1979) Sophorolipids (Nunez et al., 2001) Liposan โดยหลังจากการเลี้ยงเชื้อนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ไปทำสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น การใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 65:15 สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* CCTCC AB93108 (Zhi-feng et al., 2010) หรือใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *Rhodococcus* sp. (Kuyukina et al., 2001) หรือใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 สกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* 27 และ *Bordetella hinizi* DAFI (Bayoumi et al., 2010) แล้วทำการแยกชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกเพื่อนำไปให้ทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป (Kuyukina et al., 2001; Bayoumi et al., 2010)

2.5.3 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นการนำเกลือออกจากสารลดแรงตึงผิวที่มีพอลิเมอร์เป็นองค์ประกอบ หรืออุดมไปด้วยโปรตีน สารลดแรงตึงผิวที่มักนำมาใช้ตกตะกอนด้วยวิธีนี้ คือ Emulsan (Shoham And Rosenberg, 1983) Biodispersan Lipopeptides หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามระยะเวลาที่เหมาะสมนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ไปตกตะกอนโดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้นร้อยละ 45- 65 โดยน้ำหนักตั้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นนำสารละลายตะกอนไปกำจัดเกลือโดยใช้วิธี dialysis จากนั้นนำมาทำแห้งด้วยวิธี lyophilized หรือ freeze dry (Rosenberg et al., 1979; Navon Venezia et al., 1995) แล้วนำไปทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การใช้เทคนิค Gel electrophoresis และ size exclusion chromatography เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 วิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแต่ละชนิด ที่มา : Santos et al., 2016

Process	Biosurfactant Type	Biosurfactant Property Responsible for Separation	Advantages
Acid precipitation	Surfactin	Biosurfactants become insoluble at low pH values	Low cost, efficient in crude biosurfactant recovery
Organic solvent extraction	Trehalolipids Sophorolipids Liposan	Biosurfactants are soluble in organic solvents due to the hydrophobic end	Efficient in crude biosurfactant recovery and partial purification, reusable nature
Ammonium sulphate precipitation	Emulsan Biodispersan Lipopeptides	Salting-out of polymeric or protein-rich biosurfactants	Effective in isolation of certain type of polymeric biosurfactant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากรายงานของ Arima และคณะ (1968) ทำ surfactin ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นโดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 2 ทำการตกตะกอนซ้ำด้วยแคลเซียมคลอไรด์ แล้วทำการสกัดด้วยอีเทอร์ ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคัดแยกขนาดโมเลกุล โดยใช้ Sephadex LH 20 เป็นเรซิน

จากรายงานของ McInerney และคณะ (1990) ซึ่งได้ทำการศึกษาค้นคว้าคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* strain JF-2 พบว่าการตกตะกอนด้วยการปรับค่าพีเอช ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้และมีประสิทธิภาพที่ดีในการแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทโพลีเปปไทด์ออกจากน้ำเลี้ยง

จากรายงานของ จิราภรณ์ ธนียวัน (2539) ซึ่งได้ทำการศึกษาค้นคว้าการผลิตสาร biosurfactant โดย *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2.2 ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วทำการสกัดด้วยบิวทานอล ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยคอลัมน์ซิลิกาเจล คอลัมน์ดีไอเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

จากรายงานของ ปวีณา ดิกิจ และอทิพันธ์ เสียมไหม (2557) ซึ่งได้ทำการศึกษาค้นคว้าและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ โดยทำการศึกษาค้นคว้าการผลิตสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทย นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ โดยวิธี emulsification activity (EA) โดยเชื้อ *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ST1 มีกิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์น้ำมันปาล์มได้สูงสุด จากการศึกษาวิธีการในการเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพ โดยตกตะกอนด้วยการปรับค่าพีเอช ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนด้วยอะซีโตน ตกตะกอนด้วยเมทานอล ตกตะกอนด้วยเอทานอล และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (chloroform : methanol, 2:1) พบว่าวิธีการตกตะกอนโดยการปรับค่าพีเอชสามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบได้มากที่สุด แต่การสกัดสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform : methanol ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร สามารถเก็บเกี่ยวสารอิมัลซิไฟด์เออร์ที่มีค่ากิจกรรมในการอิมัลซิไฟด์สูงสุด ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดหยาบของสารอิมัลซิไฟด์เออร์ชีวภาพได้ 1.85 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรายงานของ นฤมล มีบุญ และอทิพันธ์ เสียมไหม (2562) ซึ่งได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* AS6 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนใน จังหวัดภูเก็ต จากการศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 หลังจากเลี้ยงในอาหาร mineral salt medium (MSM) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ด้วยวิธีการตกตะกอน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (คลอโรฟอร์ม:เมทานอล) พบว่า พบว่าวิธีการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก ให้ปริมาณสารสกัด หยาดมากที่สุด (5.51) แต่เมื่อพิจารณาถึงค่า CMC และกิจกรรมในการลดแรง ตึงผิวพบว่า การสกัด ด้วยด้วยคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) มีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีที่สุด ได้ผลิตสารสกัดหยาดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 0.45 กรัมต่อลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

- ขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร
- ไหมโครปิเปต ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
- ไหมโครปิเปต ขนาด 200 ไมโครลิตร
- ทิปขนาด 1,000 ไมโครลิตร
- ทิปขนาด 200 ไมโครลิตร
- จานเพาะเชื้อ (Plate) ขนาด 15×60 มิลลิเมตร
- จานเพาะเชื้อ (Plate) ขนาด 20×100 มิลลิเมตร
- ปีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- ปีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- แท่งแก้วรูปตัวแอล
- ไฟแช็ค
- ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
- กระดาษกรองเมมเบรนชนิดเซลลูโลสของ Whatman เบอร์ 42 ขนาด 0.45 ไมครอน
- แท่งแก้วคนสาร
- หลอดทดลอง ขนาด 13×100 มิลลิเมตร
- กระบอกตวง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
- หลอดหยด
- หลอดเซนทริฟิวส์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
- ขวดดูแรน (Duran bottle) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
- ขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- ขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- กล้องจุลทรรศน์ (Biocular compound microscope)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องทำความสะอาดอัลตราโซนิค (Sonica sounds better)
- เครื่อง Freeze dry
- ตู้ความดันไอฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ (Autoclave)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- เครื่องกรองสุญญากาศ
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
- เฮกเซน (Hexane)
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
- เมทานอล (Methanol)
- Tween 20

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่ได้จากป่าพรุ จังหวัดกาญจนบุรี โดย S1 เป็นดินตัวอย่างบริเวณผิวน้ำดิน S2 เป็นดินตัวอย่างที่เก็บที่ความลึก 50 เซนติเมตรจากผิวน้ำดิน นำตัวอย่างดินที่ได้มาคัดแยกเอาเศษกิ่งไม้หรือเศษวัสดุที่ไม่ใช่ดินออกแล้วบดให้ละเอียด นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.2 การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี spread plate

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม จากตัวอย่างดินที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เวลา 1 ชั่วโมง เจือจางในหลอดทดลอง โดยปิเปตน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัม เขย่าให้ไม่วางกรณใดๆ หงสน ออกทั้งหมดมีเหตุดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เจือจางจนถึงความเจือจางที่ 10^{-5} นำไปคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี spread plate โดยปิเปตน้ำตัวอย่างดินความเจือจางที่ 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วอาหาร จากนั้นทำการบ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่เจริญงานเพาะเชื้อทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดิน จำนวน 35 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ซึ่งเกิดจากกลไกการหลั่งเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อย Tributyrin จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสชนิดหลังออกมา นอกเซลล์ได้ ทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่สร้างวงใสรอบโคโลนี เพื่อศึกษาในลำดับต่อไป

3.2.4 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย

3.2.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการผลิตเอนไซม์ไลเปส จำนวน 26 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar media (เลือด 5%) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหารมี 3 แบบ ได้แก่ Beta-Hemolysis (β -Hemolysis) เป็นแบคทีเรียที่มีการสร้าง Hemolysin และปล่อยออกมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ เกิดวงใสสีเหลืองรอบโคโลนี (clear zone) Alpha-Hemolysis (α -Hemolysis) เป็นแบคทีเรียที่มีการสร้าง Hemolysin และปล่อยออกมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเกิดวงใสสีเขียวรอบโคโลนี และ Gamma-Hemolysis (γ -Hemolysis) เป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้าง Hemolysin โคโลนีของเชื้อและสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง (Argyri et al., 2013) ซึ่งจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จะเลือกการย่อยเม็ดเลือดแดงแบบ β -Hemolysis ทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) เพื่อทำการทดลองต่อไป (ดัดแปลงจาก Youssef et al., 2004)

3.2.4.2 การวัดการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จำนวน 2 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการกระตุ้นเชื้อด้วยวิธี cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptic soy agar (TSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการ
 เอนกสาขาที่...
 ไม่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้หลอดเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อจำนวน 2 หลบ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำมาทดสอบการเกิดอิมัลชัน ซึ่งทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform) ในสัดส่วน 1:1 โดยปิเปตส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วปิเปตตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ 2 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่ห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตการเกิดอิมัลชันโดยดูจากชั้นการเกิดอิมัลชันเทียบกับชั้นทั้งหมดและบันทึกผลการทดลอง เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น อาหารเลี้ยงเชื้อ และ Tween 20(2%) โดยการเกิดอิมัลชันส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถคำนวณได้ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Cooper and Goldenberg, 1987)

$$\text{การเกิดอิมัลชัน} = \frac{\text{ความสูงของอิมัลชัน (ซ.ม.)}}{\text{ความสูงของสารผสมทั้งหมด (ซ.ม.)}} \times 100$$

3.2.4.3 การวัดการกระจายน้ำมัน (Oil displacement)

นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) เขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำมาทดสอบการกระจายของน้ำมัน โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ปิเปตน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกราฟรองอยู่เป็นมาตรวัดความกว้างบริเวณใส (โดย 1 ช่องใหญ่ของกราฟที่มีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร) จากนั้นปิเปตตัวอย่างน้ำมันที่ต้องการทำการทดสอบ (น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหมู และน้ำมันเครื่อง) 2 มิลลิลิตร บนผิวหน้าน้ำจะเกิดเป็นแผ่นฟิล์ม แล้วใช้ไมโครปิเปต ปิเปตส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) 200 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นฟิล์มน้ำมัน ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วใช้ปลายทิวลิปจิ้มลงบนหยดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) สังเกตลักษณะการเกิดวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใส แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์เทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของน้ำมันที่ล้อมรอบอยู่ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Morikawa et al., 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ **ขนาดของการเกิดวงใส (clear zone) (ซ.ม.)** ประโยชน์ด้านการค้า
ควาการกระจายน้ำมัน = $\frac{\text{ขนาดของการเกิดวงใส (clear zone) (ซ.ม.)}}{\text{ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางน้ำมัน (ซ.ม.)}} \times 100$
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาเอกสารนี้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากข้าพเจ้า

3.2.5 การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak plate

การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยกระตุ้นเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธี cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการกระตุ้นด้วยวิธี cross streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (Single colony) ทำการเก็บเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี cross streak plate ทำการกระตุ้นเชื้อด้วยวิธี cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้หลอดเชื้อ เชื้อเชื้อจำนวน 2 หลบ ลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำมาทดสอบการเกิดอิมัลชัน โดยทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane)

3.2.7 การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย

3.2.7.1 การตกตะกอนด้วยเอทานอล

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ผ่านชุดกรองแบบสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรองเมมเบรนขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทานอล 3 ส่วนต่อส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) 1 ส่วน โดยนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ที่ผ่านการกรอง 100 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอล 300 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ระเหยเอทานอลเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก ปวีณา ดิกิจ ,อทิพันธ์ เสียมใหม่ , 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์โดยกรมชั่งน้ำหนักแห่งตะกอน นำตะกอนและส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) หลังการตกตะกอนไปหาค่าการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) โดยละลายตะกอน

ด้วยน้ำกลั่นปรับให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการละลายตะกอนมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของสารลดแรงตึงผิวธรรมชาติในน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ก่อนการตกตะกอน ซึ่งทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) โดยชั่งตะกอน 10 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายตะกอนจนหมด ปิเปตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ละลายได้จากตะกอน 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วปิเปตเฮกเซน (Hexane) 2 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตการเกิดอิมัลชัน โดยดูจากชั้นการเกิดอิมัลชันเทียบกับชั้นทั้งหมด

3.2.7.2 การตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรด

นำน้ำหมัก (culture broth) จากการเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ผ่านชุดกรองแบบสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรองเมมเบรนขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) มาตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรด โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 6 โมลาร์ ปรับพีเอชเป็น 2.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอน โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 100 มิลลิโมลาร์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน นำตะกอนไปละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 นอร์มอล และทำให้แห้งด้วยวิธี Lyophilization หรือ Freeze-drying โดยนำตะกอนที่สกัดได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเข้าเครื่อง Freezer อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งทำให้เชื้ออยู่ในสภาพเย็นจัดและแข็งตัวในสภาพสุญญากาศ แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze-dry เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการทำแห้งเรียกว่าสารสกัดหยาบ (ดัดแปลงจาก Rosenberg et al., 1979; Navon- 12 Venezia et al., 1995)

วิเคราะห์ผลโดยการชั่งน้ำหนักแห้งตะกอน นำตะกอนและส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) หลังการตกตะกอนไปหาค่าการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) โดยละลายตะกอนด้วย Phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS) ให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการละลายตะกอนมีความเข้มข้นเป็น 20 เท่าของสารลดแรงตึงผิวธรรมชาติในน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ก่อน

การตกตะกอน ซึ่งทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) โดยชั่งตะกอน 10 มิลลิกรัม ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัม ปรับปริมาตรโดยเติม Phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS) ให้ได้น้ำหนัก 5 กรัม ละลายตะกอนจนหมด ปิเปตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ละลายได้จากตะกอน 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วปิเปตเฮกเซน (Hexane) 2 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตการเกิดอิมัลชันโดยดูจากชั้นการเกิดอิมัลชันเทียบกับชั้นทั้งหมด

3.2.8 ศึกษาความคงตัวของอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้

นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ปิเปตลงหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร ทดสอบความคงตัวของอิมัลชันสูง โดยนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) เข้าเครื่อง Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) มาหาค่าการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) โดยทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform) ในสัดส่วน 1:1 โดยปิเปตส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วที่มีฝาปิด แล้วปิเปตตัวทำละลายอินทรีย์ 2 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตการเกิดอิมัลชันโดยดูจากชั้นการเกิดอิมัลชันเทียบกับชั้นทั้งหมดและบันทึกผลการทดลองแล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับค่าการเกิดอิมัลชันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ที่บ่มด้วยอุณหภูมิห้อง

3.2.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดเลือกได้จากดิน มาทำการกระตุ้นเชื้อด้วยวิธี cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาศึกษาลักษณะของโคโลนี รูปร่าง เซลล์ การเรียงตัว การติดสี (Gram staining) และสปอร์ของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินป่าพรุ จังหวัดกาญจนบุรี ที่มีความลึกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ เป็นเชื้อแบคทีเรียจำนวน 35 ไอโซเลท โดยนำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 26 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เนื่องจากมีการสร้างวงใสรอบโคโลนี (clear zone) (ดังรูปที่ 4.1) และเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส ได้แก่ Y10.1 Y1.1 และ 3BD2 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่นกัน

เอนไซม์ไลเปสจะย่อยสลายโมเลกุลของน้ำมันและไขมันซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์ชนิดหนึ่ง โดยไปตัดพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมต่อน้ำมันไฮดรอกซิลของกลีเซอรอล และหมู่คาร์บอกซิลของกรดไขมัน การย่อยสลายน้ำมัน และไขมันอย่างสมบูรณ์ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กลีเซอรอล และกรดไขมัน ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในเซลล์จะถูกขับออกมานอกเซลล์ และเกิดการเร่ง ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จึงแสดงออกเป็นวงใสรอบโคโลนี (clear zone) (พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ, 2555)

เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone)

ไม่เกิดวงใสรอบโคโลนี

รูปที่ 4.1 ลักษณะการเกิดวงใสและไม่เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ของแบคทีเรียที่ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรีย

4.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 26 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity) พบว่าแบคทีเรียจำนวน 24 ไอโซเลทไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบโคโลนีไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และพบว่าแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ S1(13/2) และ S2(9) มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -Hemolysis เกิดวงใสสีเหลืองรอบโคโลนี (clear zone) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการสร้าง Hemolysin และปล่อยออกมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ (ดังรูปที่ 4.2) และเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเสาวรส ได้แก่ Y10.1 Y1.1 และ 3BD2 มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (β -hemolysis) เช่นกัน

การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar media เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ในเบื้องต้น เนื่องจากแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จะเป็นแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งมี Activity สูง จึงสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่พบว่า การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับค่าแรงตึงผิว (Youssef et al., 2004).

รูปที่ 4.2 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β -Hemolysis ของแบคทีเรีย S1(13/2) และ S2(9)

4.2.2 การเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index)

นำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ S1(13/2) และ S2(9) ซึ่งเป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการใส่ลงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทุกสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รอบต่อหน้าที่ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) มาทดสอบการเกิดอิมัลชันกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform) เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับ Tween 20(2%) พบว่าการเกิดอิมัลชันส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.1

ตาราง 4.1 การเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform)

ตัวอย่าง	% อิมัลชันในเฮกเซน (24 ชั่วโมง)	% อิมัลชันในคลอโรฟอร์ม (24 ชั่วโมง)
S1(13/2)	44.58	58.47
S2(9)	27.89	50.28
Y10.1	16.31	0.34
Y1.1	16.87	62.77
3BD2	0.00	0.34
น้ำกลั่น	0.00	0.00
อาหาร	0.00	0.00
อาหาร+Tween 20(2%)	46.29	27.10

จากการทดสอบการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform) พบว่าส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) มีค่าการเกิดอิมัลชันในเฮกเซน 44.58 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการเกิดอิมัลชันในคลอโรฟอร์ม 58.47 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S2(9) มีค่าการเกิดอิมัลชันในเฮกเซน 27.89 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการเกิดอิมัลชันในคลอโรฟอร์ม 50.28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y10.1 มีค่าการเกิดอิมัลชันในเฮกเซน 16.31 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการเกิดอิมัลชันในคลอโรฟอร์ม 0.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y1.1 มีค่าการเกิดอิมัลชันในเฮกเซน 16.87 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการเกิดอิมัลชันในคลอโรฟอร์ม 62.77 เปอร์เซ็นต์ และส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ 3BD2 ไม่เกิดอิมัลชันในเฮกเซน และมีค่าการเกิดอิมัลชันในคลอโรฟอร์ม 0.34 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) ที่มีค่าการเกิดอิมัลชันดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ

น้ำกลั่น อาหาร และอาหารผสมกับ Tween 20(2%) คือ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S1(13/2) รองลงมาคือ S2(9) Y1.1 Y10.1 และ 3BD2 ตามลำดับ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่าสารสกัดหยาบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมได้ ควรมีค่าการเกิดอิมัลชันมากกว่าร้อยละ 50 (Willumsen and Karlson, 1997) โดยส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) มีค่าการเกิดอิมัลชันมากที่สุดร้อยละ 44.58 แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะสามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมได้

การเกิดอิมัลชันของของเหลวสองชนิดที่ไม่เข้ากัน เมื่อนำมาผสมกันของเหลวทั้งสองชนิดจะแยกกันอยู่ ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งหากมีอิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิวเข้ามาช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวทั้งสอง เมื่อมีการเขย่าซึ่งเป็นการเพิ่มพลังงานอิสระที่พื้นผิว ทำให้ของเหลวกระจายตัวเป็นหยดเล็กๆ ในกันและกัน เกิดเป็นอิมัลชันมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (พิมพร ,2532) สอดคล้องกับการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว ได้แก่ NKHM 13 NKHM 15 NKHM 22 และ NKHM 39 พบว่าการเกิดอิมัลชันของ NKHM 39 ที่สุดคือ เฮกเซน กับ โอลีฟิน แต่ไม่เกิดอิมัลชันในน้ำมันปาล์ม อาจเนื่องจากความหนืดของน้ำมัน กรดไขมันอิสระ กับ น้ำมันปาล์ม มีความหนืดสูงกว่า เฮกเซน กับ โอลีฟิน จึงทำให้เกิดอิมัลชันได้ยาก (ณัฐชารัตน์ รวมญาติ , 2559) การศึกษาสารลดแรงตึงผิวประเภท Tween ชนิดต่างๆ ได้แก่ Tween 20 Tween 40 Tween 60 Tween 80 และ Tween 85 พบว่า Tween แต่ละชนิดมีหัวเป็นสายโพลีออกซีเอทิลีนติดกับซอร์บิแทนและมีหางเป็นสายกรดไขมันที่มีความยาวต่าง ๆ กัน จึงง่ายต่อการเกิดอิมัลชันและ เมื่อเกิดอิมัลชันจะมีขนาดอนุภาคน้ำมันขนาดเล็ก (Chang et al., 2013 ; Guttoff et al., 2015 ; Saberi et al., 2013b, 2016) โครงสร้างที่ต่างกันของสารลดแรงตึงผิวทำให้สารลดแรงตึงผิวมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลระหว่างพื้นผิวกับวฏภาคน้ำมันและวฏภาคน้ำต่างกัน เกิดเป็นชั้นสารลดแรงตึงผิวที่มีความโค้งและความยืดหยุ่นต่างๆ ทำให้อนุภาคน้ำมันที่ผลิตได้มีขนาดใหญ่อหรือเล็กแตกต่างกันตามชนิดของสารลดแรงตึงผิวนั้นๆ (Komaiko and McClements, 2015 ; Komaiko et al., 2015)

4.2.3 ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement)

นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ S1(13/2) และ S2(9) มาทดสอบความสามารถในการกระจายตัวของน้ำมัน โดยการเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่ออนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) มาทดสอบกระจายตัวของน้ำมันกับน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหมู และ

น้ำมันเครื่อง สังเกตลักษณะการเกิดวงใส (clear zone) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่วงใส แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การกระจายตัวในน้ำมัน (Oil displacement) ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ใน น้ำมันต่างๆ

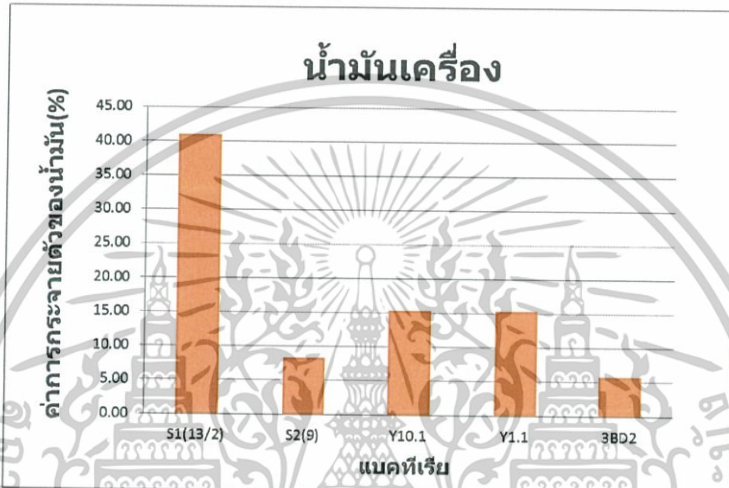
ตัวอย่าง	น้ำมันเครื่อง (%)	น้ำมันหมู (%)	มันถั่วเหลือง (%)	น้ำมันปาล์ม (%)
S1(13/2)	41.03	39.10	35.26	30.77
S2(9)	8.33	13.46	0.00	0.00
Y10.1	15.38	10.90	0.00	9.62
Y1.1	15.38	5.77	5.77	0.00
3BD2	5.77	10.26	10.62	5.77
น้ำกลั่น	0.00	0.00	0.00	0.00
อาหาร	0.00	0.00	0.00	0.00
อาหาร+Tween 20(2%)	49.36	14.74	39.10	19.23

จากตารางที่ 4.2 พบว่าการกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดคือ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) ซึ่งการกระจายตัวในน้ำมันเครื่อง 41.03 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันหมู 39.10 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง 35.26 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมันปาล์ม 30.77 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ Y10.1 3BD2 Y1.1 และ S2(9) ตามลำดับ ซึ่งการกระจายตัวในน้ำมันเครื่องของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) มีค่าใกล้เคียงกับการกระจายตัวในน้ำมันเครื่องของอาหาร+Tween 20(2%) คล้ายคลึงกับการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BBK-1 ที่มีประสิทธิภาพในการกระจายน้ำมันได้ดีเทียบเท่ากับเซอร์แฟคติน และ Tween 80 (Niran Roongsawang., 2542) การกระจายของน้ำมันจะทำให้ไขมันที่แผ่ปกคลุมเป็นฟิล์มหนาแตกกระจายไปจากผิวน้ำ กลายเป็นหยดน้ำเล็กๆ ลงไปในชั้นน้ำ ปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการแตกตัวของน้ำมันบนผิวน้ำ ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวจะลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับน้ำมัน ทำให้น้ำมันแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ รวมตัวน้ำ น้ำมันที่แตกตัวนี้จะกระจายออกเป็นหยดขนาดต่างๆ เกิดเป็นวงใส (clear zone) บริเวณบนผิวน้ำ (นภดล สว่างนาวิน , 2547)

น้ำมันพืชคือน้ำมันที่สกัดได้จากพืช มีความหนืดสูงและมีโครงสร้างโดยทั่วไปเป็นไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของกลีเซอรอล 1 โมเลกุล เชื่อมต่อกับกรดไขมัน 3

โมเลกุลด้วยพันธะเอสเทอร์ (Ali และคณะ, 1994) ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไขมันไม่อิ่มตัว ทำเอกลสารนี้เป็นเอกลสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ให้แตกตัวได้ง่าย จึงมีการเติมสารที่ช่วยรักษาคุณภาพของน้ำมันพืชซึ่งสารที่ช่วยรักษาคุณภาพของไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกลสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

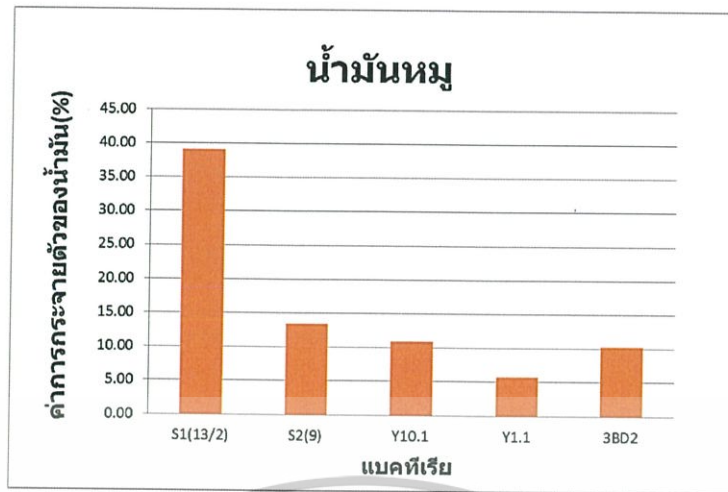
น้ำมันพืชจะทำปฏิกิริยากับสารลดแรงตึงผิว ส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวลดลง โดยไตรกลีเซอไรด์จะมีปริมาณไขมันอยู่ในโครงสร้างแตกต่างกัน ทำให้น้ำมันพืชแต่ละชนิดมีสมบัติที่ต่างกันอย่างแตกต่างจากน้ำมันสัตว์ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไขมันอิ่มตัวแตกตัวได้ยาก และมีความหนืดสูง จึงไม่มีการเติมสารเพื่อรักษาคุณภาพของน้ำมัน ส่งผลให้การกระจายตัวในน้ำมันสัตว์สูงกว่าการกระจายตัวในน้ำมันพืช



รูปที่ 4.3 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำล้างเชื้อแบคทีเรียในน้ำเครื่อง

จากรูปที่ 4.3 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำล้างเชื้อแบคทีเรียในน้ำเครื่อง พบว่าส่วนใสของน้ำล้างเชื้อ S1(13/2) มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 41.03 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำล้างเชื้อ S2(9) มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 8.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำล้างเชื้อ Y10.1 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 15.38 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำล้างเชื้อ Y1.1 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 15.38 เปอร์เซ็นต์ และส่วนใสของน้ำล้างเชื้อ 3BD2 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 5.77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำล้างเชื้อแบคทีเรียในน้ำเครื่องสูงที่สุดคือ S1(13/2) Y(10.1) Y(1.1) S2(9) และ 3BD2 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



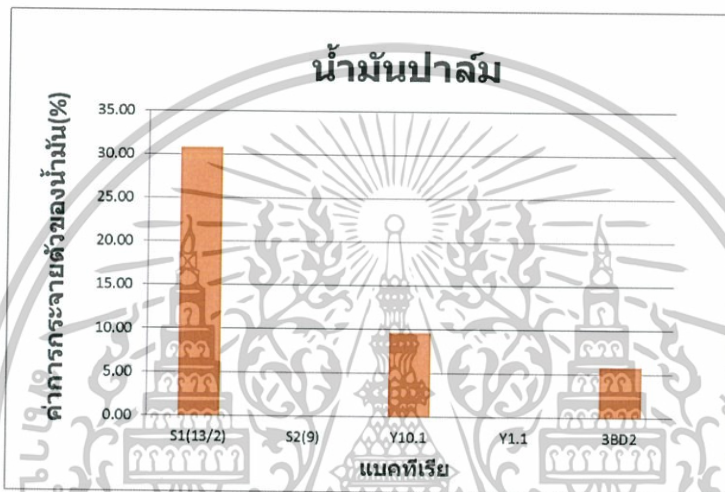
รูปที่ 4.4 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันหมู

จากรูปที่ 4.4 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันหมู พบว่า ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 39.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S2(9) มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 13.46 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y10.1 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 10.90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y1.1 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 5.77 เปอร์เซ็นต์ และส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ 3BD2 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 10.26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันหมูสูงที่สุดคือ S1(13/2) S2(9) Y(10.1) 3BD2 และ Y(1.1) ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ 4.5 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันถั่วเหลือง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 35.26 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S2(9) ไม่เกิดการกระจายตัวของน้ำมัน ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y10.1 ไม่เกิดการกระจายตัวของน้ำมัน ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y1.1 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 3.85 เปอร์เซ็นต์ และส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ 3BD2 ไม่เกิดการกระจายตัวของน้ำมัน ซึ่งการกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันถั่วเหลือง สูงที่สุดคือ S1(13/2) Y(1.1) S2(9) Y(10.1) และ 3BD2 ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันปาล์ม

จากรูปที่ 4.6 การกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันปาล์ม พบว่าส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 30.77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ S2(9) ไม่เกิดการกระจายตัวของน้ำมัน ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y10.1 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 9.62 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ Y1.1 ไม่เกิดการกระจายตัวของน้ำมัน และส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ 3BD2 มีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 5.77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการกระจายตัวน้ำมันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมันปาล์มสูงที่สุดคือ S1(13/2) Y(10.1) 3BD2 Y(1.1) และ S2(9) ตามลำดับ

4.5 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อค้ำไม่ว่ (supernatant) นำมาทดสอบอิมัลชันโดยทดสอบกับ เฮกเซน (Hexane) ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าการเกิดอิมัลชัน (Emulsification Index) ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) กับ เฮกเซน (Hexane) ในระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	% อิมัลชันในเฮกเซน
24	49.63 ±1.8
48	49.67 ±1.7
72	49.99 ±1.3
96	49.38 ±1.6

จากตารางที่ 4.3 พบว่าการเกิดอิมัลชันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) ในเฮกเซน (Hexane) ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีค่าการเกิดอิมัลชันดีที่สุดในช่วงที่ 49.99±1.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 48 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดอิมัลชันพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) คือ 72 ชั่วโมง คล้ายคลึงกับการศึกษาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. พบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่ระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง โดยอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้คือ 25-75 องศาเซลเซียส (Buchanan et al., 1974) ดังนั้นจึงเลือกเวลาในการเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) ที่ 72 ชั่วโมงเพื่อ ทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.6 การเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) มาตกตะกอนด้วยเอทานอล และตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรด วิเคราะห์ผลโดยการชั่งน้ำหนักแห้งตะกอน นำตะกอนและส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) หลังการตกตะกอนไปหาค่าการเกิดอิมัลชัน (Emulsion) ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.4 น้ำหนักตะกอนแห้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยวิธีตะกอนด้วยเอทานอลและตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรด

ตัวอย่าง	น้ำหนักตะกอนแห้ง (มิลลิกรัม)	
	ตกตะกอนด้วยเอทานอล	ตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรด
S1(13/2)	10	50

จากตารางที่ 4.4 พบว่าการตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการปรับพีเอชด้วยกรดสามารถเก็บเกี่ยวตะกอนแห้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 50 มิลลิกรัม และเมื่อนำตะกอนมาละลายด้วย Phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS) แล้วนำมาทดสอบการเกิดอิมัลชัน พบว่าเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) เท่ากับ 49.02 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ และ PBS ที่ไม่เกิดอิมัลชัน ต่างกับการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่สามารถเก็บเกี่ยวตะกอนแห้งของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ 10 มิลลิกรัม และเมื่อนำตะกอนมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาทดสอบการเกิดอิมัลชัน พบว่าไม่เกิดอิมัลชัน การตกตะกอนด้วยกรดจึงมีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มไลโปเปปไทด์ (Lipopeptides) เช่น surfactin ซึ่งเป็นไลโปเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นวงแหวนผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (Arima et al., 1968) คล้ายคลึงกับการศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *B. subtilis* AS6 พบว่าการตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกรด โดยการปรับค่าพีเอชของสารละลายส่วนใสให้เท่ากับ 2.0 สามารถเก็บเกี่ยวสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด 4.51 กรัมต่อลิตร (Naruemon Meeboon and Atipan Saimmai, 2018)

4.7 ศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

จากการเลี้ยงเชื้อ S1(13/2) ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) เข้าเครื่อง Autoclave ออกรีดเป็นเอกสารที่ส่งคืนเวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ออณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาทดสอบการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Index) ไม่มีการผลิตฯ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่ให้เกิดแบคทีเรียและต้องใช้องค์ประกอบของเอกสารทุกสิ่งทุกอย่างที่นำมาใช้

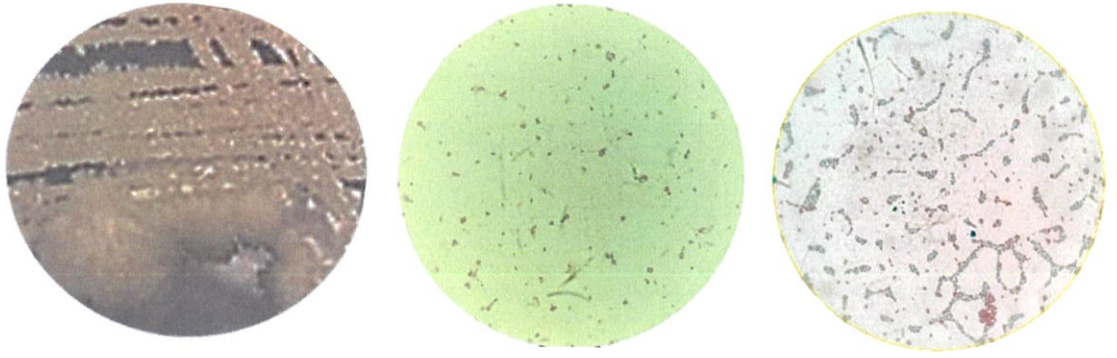
โดยทดสอบกับ เฮกเซน (Hexane) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform) พบว่าการเกิดอิมัลชันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อในเฮกเซนเท่ากับ 45.65 เปอร์เซ็นต์ และการเกิดอิมัลชันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อในคลอโรฟอร์มเท่ากับ 57.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การเกิดอิมัลชันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง การเกิดอิมัลชันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อในเฮกเซนเท่ากับ 44.58 เปอร์เซ็นต์ และการเกิดอิมัลชันของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อในคลอโรฟอร์มเท่ากับ 58.47 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าการเกิดอิมัลชันที่ใกล้เคียงกัน จึงถือได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากเชื้อ S1(13/2) มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ผลการทดลองคล้ายคลึงกับการศึกษาแบคทีเรียรูปร่างท่อนในกลุ่ม *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ ซึ่งมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี โดยสปอร์ของ *B. subtilis* สามารถทนสภาพ ร้อน-ชื้นได้ถึง 100 องศาเซลเซียส และต้องใช้เวลา 20-30 นาทีจึงจะทำให้ความสามารถในการมีชีวิตของมัน (viability) ลดจำนวนลงได้ แต่ถ้าเป็นสภาวะที่ ร้อน-แห้ง ความสามารถในการมีชีวิตของมันจะเพิ่มขึ้นอีกถึง 1000 เท่า (Nicholson et al., 2000) จากการศึกษาของ (Wang และคณะ , 2011) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกลุ่มไลโปเปปไทด์ (Lipopeptides) ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* strain JA-1 มีความคงตัวที่อุณหภูมิในช่วง 4-121 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าการอิมัลชัน (Emulsion Index) อยู่ในช่วง 72-75 เปอร์เซ็นต์

4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากผลการทดสอบคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการทดสอบ การเกิดอิมัลชันและค่าการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่าแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) พบว่าลักษณะวิทยาของแบคทีเรีย โคโลนีมีลักษณะนูนขึ้นจากผิวด้านหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ขอบขรุขระ มีขนาดใหญ่กลม สีขาวขุ่น มีการสร้างเมือกสีใสคล้ายหยดน้ำบริเวณโคโลนี เป็นเชื้อที่ใช้ออกซิเจน สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาในการเจริญเติบโต 24 ชั่วโมง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นอกจากนี้ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) พบว่าเซลล์มีการเรียงตัวรูปร่างท่อน (Rod) แกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่อยู่กึ่งกลางเซลล์ (ดังรูปที่ 4.7) คล้ายคลึงกับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการเรียงตัวรูปร่างท่อน (Rod) การสร้างสปอร์ (Buchanan et al., 1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ลักษณะโคลน

การย้อมติดสีแกรม (100 เท่า)

การย้อมติดสีสปอร์ (100 เท่า)

รูปที่ 4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินป่าพรุ จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท มีแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ S1(13/2) และ S2(9) ที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity) ได้ ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทดสอบการเกิดอิมัลชัน (Emulsion) การกระจายตัวของน้ำมัน (Oil displacement) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) มีประสิทธิภาพสูงสุด และจากการศึกษาการตกตะกอนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 2 วิธี ได้แก่ การตกตะกอนด้วยเอทานอล และการตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรด พบว่าการตกตะกอนโดยการปรับพีเอชด้วยกรดสามารถตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากที่สุด ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความคงตัวต่ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จากคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) ที่ทนอุณหภูมิสูง เจริญเติบโตเร็ว ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและคงตัวได้ดี เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรม และไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 5.2.1 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อสภาวะที่เกี่ยวข้องในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
- 5.2.2 ศึกษาการทำให้การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ ธนียวัน. (2539). การผลิตสาร biosurfactant โดย *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2.2. รายงานวิจัยโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2539.

ณัฐชาริ รวมญาติ. (2559). คุณสมบัติและการประยุกต์ใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดต่างที่ใช้ แวกซ์เป็น สารตั้งต้น. คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ทิพวรรณ ประพันธ์. (2555). การคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* sp. โดยเทคนิค PCR สำหรับประยุกต์ใช้ ในการบำบัดกากไขมันจากการผลิตพลาสติก. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม วท.ม., มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.

นฤมล มีบุญ และอทิพันธ์ เสียมไหม. (2562). คุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* AS6 ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดภูเก็ต. วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 11(1) : 67-83 (2562).

ปวีณา ดิกิจ และอทิพันธ์ เสียมไหม. (2557). การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารอิมัลซิไฟต์เออร์ชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้. รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. 2532. เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 220

พจน์ ศรีบุญลือ พัชรีย์ บุญศิริ, ขงุภามาศ พินิจสุนทรและเปรมใจ อาริจิตรานุสรณ์. (2555). ตำราชีวเคมี (พิมพ์ครั้งที่ 6). ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

อลงกฎ แซมสีม่วง ศิริพรรณ สารินทร์ และ จริญญา สารินทร์. (2554). การศึกษาการใช้แบคทีเรียที่สร้างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน. Journal of Community Development Research 2011; 4(2)

Ali, Y. and Hanna, M.A. 1994. Alternative diesel fuels from vegetable oils. Bioresource Technology, 50(2): 153-163

Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food Microbiology. 33: 282-291.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31(3), 488–494.
- Ahimou, F., Jacques, P., & Deleu, M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10), 749–754.
- Bayoumi, R.A., Haroun, B.M., Ghazal, E.A. & Maher, Y.A. (2010). Structural Analysis and Characteristics of Biosurfactants Produced by Some Crude Oil Utilizing Bacterial Strains. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(8), 3484–3498.
- Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M. ., & Moraes, I. . (2002). *Rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa LBI growing on soapstock as the sole carbon source. Journal of Food Engineering*, 54(4), 283–288.
- Chang, Y., McLandsborough, L., and McClements, D. J. 2013. Physicochemical Properties and Antimicrobial Efficacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(37): 8906–8913.
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giuliatti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 82–84.
- Cooper, D. G., & Zajic, J. E. (1980). Surface-Active Compounds from Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology Volume 26*, 229–253.
- Cooper, D.G. 1986. Biosurfactants. *Microbiol. Sci.*, 3: 145-149.
- Cooper, D.G. & Goldenberg, B.G. (1987). Surface active agents from two *Bacillus*
- Clint, J.H. 1992. Micelle formation. *Surfactant aggregation*, pp. 82 – 129. New York : Chapman and Hall
- Deisi Altmajer Vaz ,Eduardo J. Gudina b, Encarnación Jurado Alamedaa, José A.

Teixeira b, Ligia

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สแกนขึ้นเพื่อการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Desai, J. D., Banat, I. M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 61(1), 47-64
- Dobler, L., de Carvalho, B. R., Alves, W. de S., Neves, B. C., Freire, D. M. G., & Almeida, R. V. (2017). Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing *estA* in a simple medium. *PLOS ONE*, 12(8), e0183857.
- De Faria, A. F., Teodoro-Martinez, D. S., de Oliveira Barbosa, G. N., Gontijo Vaz, B., Serrano Silva, Í., Garcia, J. S., ... Regina Durrant, L. (2011). Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46(10), 1951–1957.
- Elshafie, A. E., Joshi, S. J., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Bemani, A. S., Al-Bahry, S. N., Al-Maqbali, D., & Banat, I. M. (2015). Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its Potential Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Evans F, Wennerstrom H. The Colloidal Domain Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet. New York, New York: Wiley-VCH; 1999.
- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology*, 10, 208–217.
- Frazer, L. (2000). Lipid lather removes metals. *Environmental Health Perspectives*, 108(7).
- Guttoff, M., Saberi, A. H., and McClements, D. J. 2015. Formation of vitamin D nanoemulsionbased delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. *Food Chemistry*. 171: 117–122.
- Gerson, D.F. 1993. The biophysics of microbial surfactants : Growth on insoluble substrates. In N. Kosaric (ed.), *Biosurfactants : production , properties , applications* , pp. 169 – 286. New York : Marcel Dekker.
- GAUTAM, K. K., & TYAGI, V. K. (2006). *Microbial Surfactants: A Review. Journal of Oleo Science*, 55(4), 155–166.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Khopade, A., Ren, B., Liu, X.-Y., Mahadik, K., Zhang, L., & Kokare, C. (2012). *Production and characterization of biosurfactant from marine Streptomyces species B3*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1), 311–318.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Philp, J. C., Christofi, N., Dunbar, S. A., & Ritchkova, M. I. (2001). Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*, 46(2), 149–156.
- Kitamoto, D., Isoda, H., & Nakahara, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — from energy-saving materials to gene delivery carriers —. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(3), 187–201.
- Komaiko, J., Sastrosubroto, A., and McClements, D. J. 2015. Formation of Oil-in-Water Emulsions from Natural Emulsifiers Using Spontaneous Emulsification: Sunflower Phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(45): 10078–10088.
- Komaiko, J., and McClements, D. J. 2015. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *Journal of Food Engineering*, 146: 122–128.
- Kaeppli, O. and W.R. Finnerty, 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.*, 140: 707-712.
- Kruss, Services-Education-Theory-Glossary-CMC, Hamberg, Germany
- Liu, Z., Zeng, G., Zhong, H., Fu, H., & Liu, X. (2010). Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* CCTCC AB93108. *Journal of Central South University of Technology*, 17(3), 516–521.
- McInerney, M.J., Javaheri, M., Nagle, DP. Jr. (1990). Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. *Journal of Industrial Microbiology*, April 1990, Volume 5, Issue 2–3, pp 95–101
- Mulligan, C.N., D.G. Cooper and R.J. Neufeld, 1984. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *J. Ferment. Technol.*, 62: 311-314.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z., and Rosenberg, E. (1995). Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3240–3244.

Nuñez, A., Ashby, R., Foglia, T. A., & Solaiman, D. K. Y. (2001). *Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization*. *Chromatographia*, 53(11-12), 673–677.

Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., and Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3): 548-572.

Ortiz, A., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Marqués, A., Manresa, Á., & Aranda, F. J. (2008). *Interactions of a Rhodococcus sp. biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylethanolamine membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(12), 2806–2813.

Patel, R. M., & Desai, A. J. (1997). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, 25(2), 91–94.

Priya, T. & Usharani, G. (2009). Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Botany Research International*, 2(4), 284-287.

Pranav H Nakhate, P. A. (2015). *Optimisation of Bhamnolipid: A New Age Biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa MTCC 1688 and its Application in Oil Recovery, Heavy and Toxic Metals Recovery*. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 05(05).

Protocols Online. Phosphate buffer saline. October 3, 2016. from <https://www.protocolsonline.com/recipes/phosphate-buffered-saline-pbs/#section-2>

Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. and Gutnick, D. L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 402-408.

R. Rodrigues (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis*

strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- surfactants. Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal
- Rau, U., Nguyen, L. A., Schulz, S., Wray, V., Nimtz, M., Roeper, H., ... Lang, S. (2004). *Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by Pseudozyma aphidis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(5), 551–559.
- RAPP, P., BOCK, H., WRAY, V., & WAGNER, F. (1979). *Formation, Isolation and Characterization of Trehalose Dimycolates from Rhodococcus erythropolis Grown on n-Alkanes*. *Journal of General Microbiology*, 115(2), 491–503.
- Shoham, Y., & Rosenberg, E. (1983). Enzymatic depolymerization of emulsan. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Oct. 1983, p. 161-167.
- Saharan, B.S., Sahu, R.K., & Sharma, D. (2011). A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, Vol. 2011
- Saberi, A. H., Fang, Y., and McClements, D. J. 2013b. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*. 391: 95–102.
- Saimmai, A., Riansa-ngawong, W., Maneerat, S., and Dikit, P., 2015. Isolation and screening of bioemulsifier-producing bacteria using used palm oil as a substrate, pp. 49-53. In *Biotechnology International Congress (BIC) 2015 (Biotechnology for Healthy Society)*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok
- Salehizadeh, H. (2009). Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis*. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY*, 7(4), 216-223
- Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., & Sarubbo, L. (2016). *Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tuleva, B. K., Ivanov, G. R., & Christova, N. E. (2002). Biosurfactant Production By A New *Pseudomonas Putida* Strain. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 57(3-4), 356–360.
- TAHARA, Y., YAMADA, Y., & KONDO, K. (1976). *Phospholipid composition of Gluconobacter cerinus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(12), 2355–2360.
- Yoneyama M, M Masubuchi, S Oishi, O Takahashi, M Ikawa, S Yoshida, H Oishi, H Mikuriya, K Yuzawa, K Hiraga, Toxicity of LAS by dietary administration for life-span to rats, *Ann. Rep Tokyo Metro Res Lab Public Health* 28 (2): 73-84, 1977
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347.
- Youssef, N.H., Kathleen E.D., Nagle, D.N., Savage, K.N., Knapp, R.M., & McInerney, M.J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 56(3), 339-347
- Yu, G. , Sinclair, J. , Hartman, G. , & Bertagnolli, B. . (2002). *Production of iturin A by Bacillus amyloliquefaciens suppressing Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(7), 955–963
- Wang, J., Ji, G., Tian, J., Zhang, H., Dong, H. and Yu, L. 2011. Functional characterization of a biosurfactant-producing thermo-tolerant bacteria isolated from an oil reservoir. *Pet. Sci.* 8:353-356
- Wang, R., Guo, Z. K., Li, X. M., Chen, F. X., Zhan, X. F., & Shen, M. H. (2015). *Spiculisporic acid analogues of the marine-derived fungus, Aspergillus candidus strain HDf2, and their antibacterial activity*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(1), 215–219.
- Wang, R., Liu, T.-M., Shen, M.-H., Yang, M.-Q., Feng, Q.-Y., Tang, X.-M., & Li, X.-M. (2012). *Spiculisporic Acids B–D, Three New γ -Butenolide Derivatives from a Sea Urchin-Derived Fungus Aspergillus sp. HDf2*. *Molecules*, 17(11), 13175–13182

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Willumsen, P.A. and Karlson, U. 1997. Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 7: 415-423



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร Nutrient agar (NA) 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 \pm 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบเพื่อฆ่าเชื้อ ประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Tributyrin	100.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งเปปโตน 5.0 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 3.0 กรัม และวุ้น 15.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย ปิเปตไตรบูไทริน 100.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร นำไปให้ความร้อนเล็กน้อย ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบเพื่อฆ่าเชื้อ ประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar media

Nutrient broth	8.0	กรัม
Neomycin	0.1	กรัม
Agar	1.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่ง Nutrient broth 8.0 กรัม Neomycin 0.1 กรัม และวุ้น 1.5 กรัม นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้พออุ่นเติมเลือดลงไป 5% ผสมให้เข้ากันเทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบเพื่อฆ่าเชื้อ ประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA)

Peptone from Casein	15.0	กรัม
Peptone from Soymeal	5.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร Tryptic soy agar (TSA) 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.4 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบเพื่อฆ่าเชื้อ ประมาณ 15 มิลลิลิตร ทิ้งให้วุ้นแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB)

Peptone from Casein	15.0	กรัม
Peptone from Soymeal	5.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซั่งอาหาร Tryptic soy broth (TSB) 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เป็น 7.4 ± 0.2 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้มันละลาย ถ่ายใส่ ขวดรูปชมพู่ (Flask) ปิดด้วยจุกสำลี หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS pH 7.4)

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.15	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย HCl และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

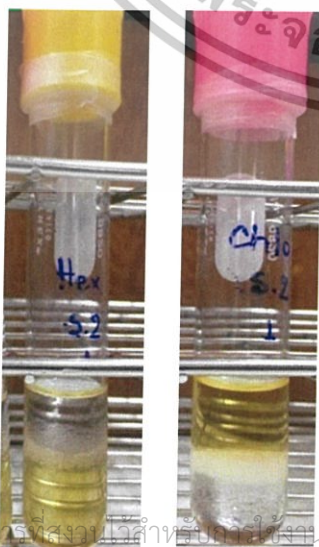
รูปผลการทดลอง

ค่าดัชนีอิมัลชัน

คำบรรยายภาพ



รูป ข.1 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน
ของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2) กับเฮกเซน
(รูปซ้าย) และ คลอโรฟอร์ม(รูปขวา)



รูป ข.2 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน
ของเชื้อแบคทีเรีย S2(9) กับเฮกเซน
(รูปซ้าย) และคลอโรฟอร์ม(รูปขวา)

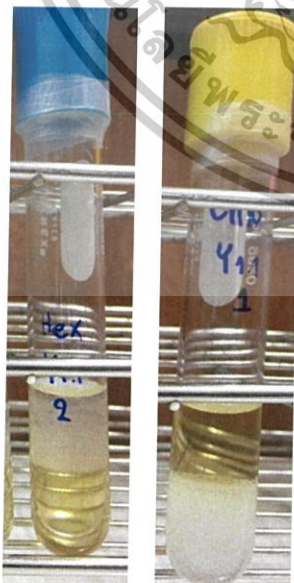
เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับนักเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าดัชนีอิมัลชัน

คำบรรยายภาพ



รูป ข.3 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ
เชื้อแบคทีเรีย Y10.1 กับเฮกเซน(รูปซ้าย)
และคลอโรฟอร์ม(รูปขวา)

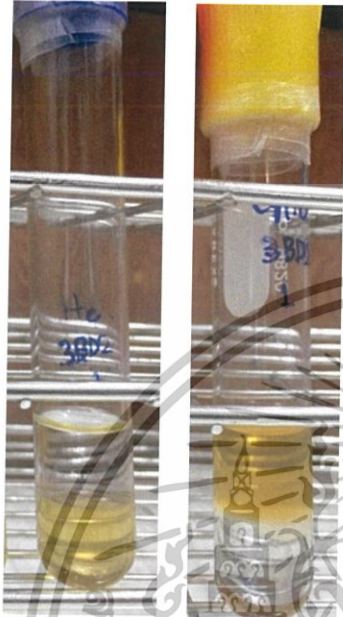


รูป ข.4 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ
เชื้อแบคทีเรีย Y1.1 กับเฮกเซน(รูปซ้าย) และ
คลอโรฟอร์ม(รูปขวา)

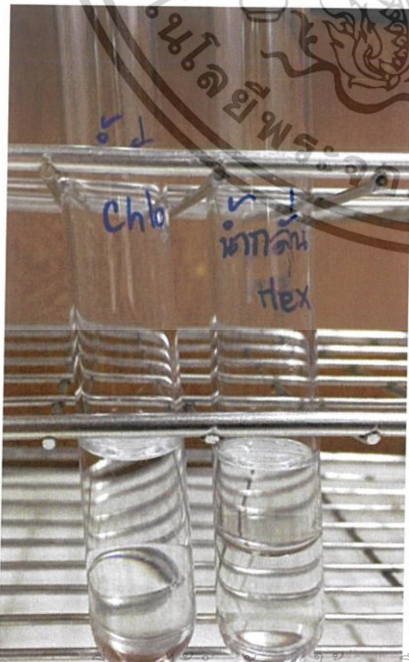
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าดัชนีอิมัลชัน

คำบรรยายภาพ



รูป ข.5 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ
เชื้อแบคทีเรีย 3BD2 กับเฮกเซน(รูปซ้าย) และ
คลอโรฟอร์ม(รูปขวา)



รูป ข.6 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ
น้ำกลั่นกับเฮกเซน(รูปซ้าย) และคลอโรฟอร์ม
(รูปขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าดัชนีอิมัลชัน

คำบรรยายภาพ



รูป ข.7 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของ
อาหาร TSB กับเฮกเซน(รูปซ้าย) และ
คลอโรฟอร์ม(รูปขวา)

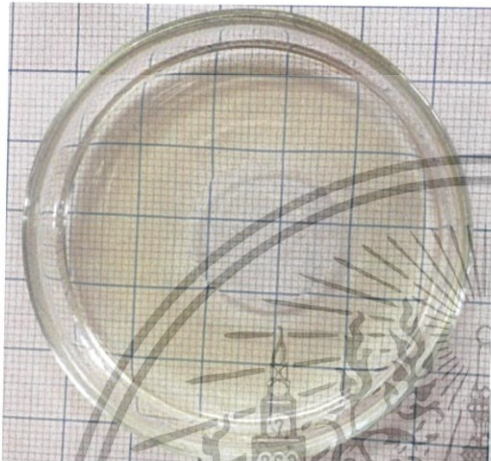


รูป ข.8 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ของ
อาหารร่วมกับ Tween 20 (2%) กับเฮกเซน
(รูปซ้าย) และคลอโรฟอร์ม(รูปขวา)

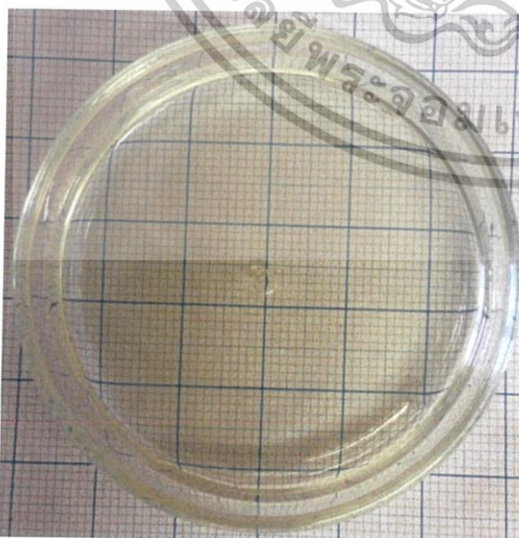
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน

คำบรรยายภาพ



รูป ข.9 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันใน
น้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2)

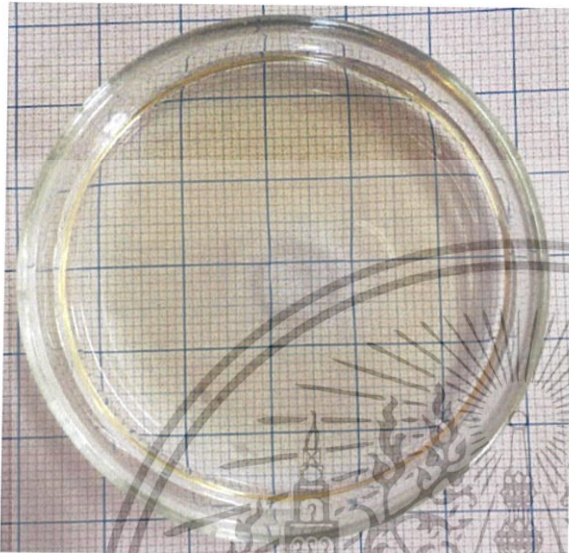


รูป ข.10 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน
ในน้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย S2(9)

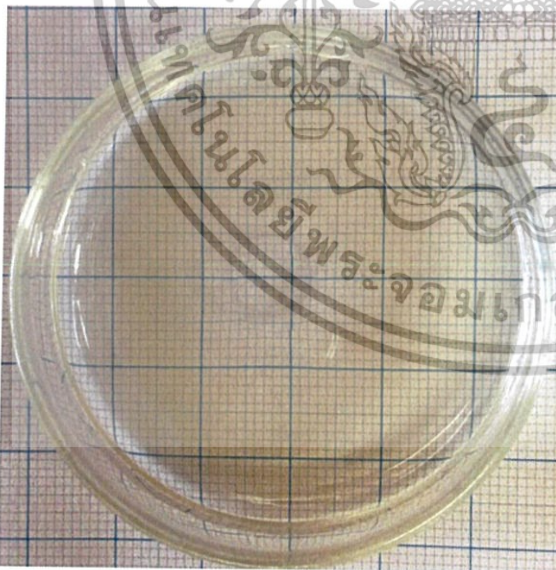
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน

คำบรรยายภาพ



รูป ข.11 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน
ในน้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย Y10.1

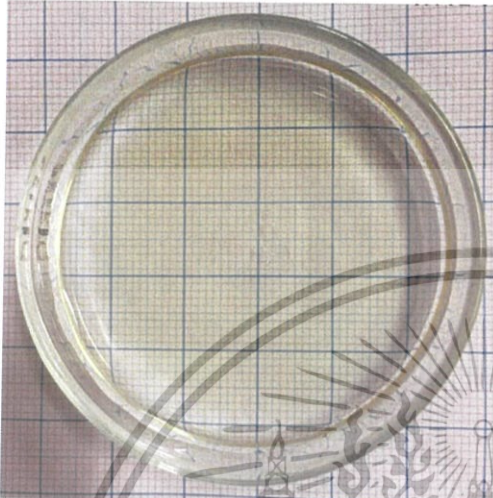


รูป ข.12 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน
ในน้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย Y1.1

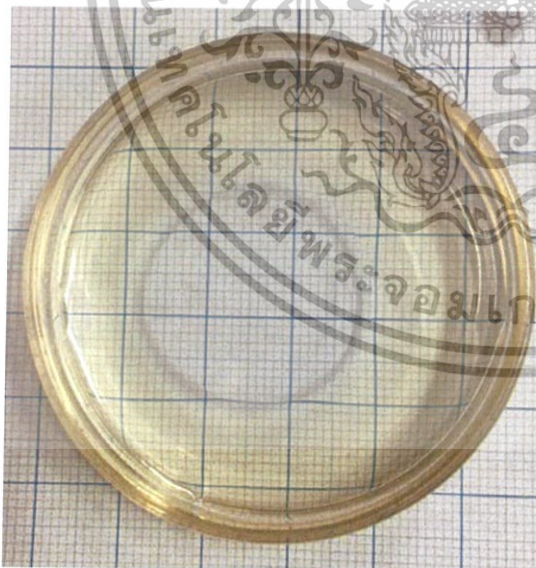
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน

คำบรรยายภาพ



รูป ข.13 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันใน
น้ำมันเครื่องของเชื้อแบคทีเรีย 3BD2

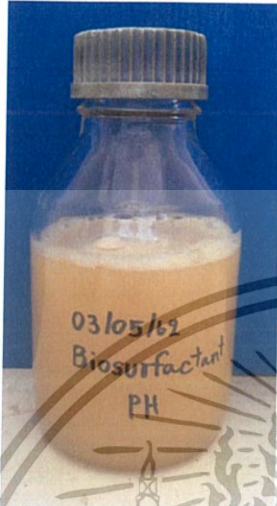


รูป ข.14 ทดสอบการกระจายตัวของน้ำมันใน
น้ำมันเครื่องของอาหารกับ Tween 20 (2%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตกตะกอน

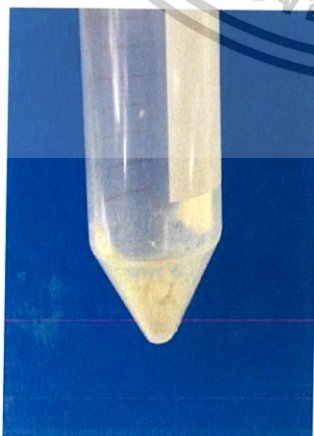
คำบรรยายภาพ



รูป ข.15 การตกตะกอนสารลดแรงตึงผิว
ชีวภาพด้วยการตกตะกอนด้วยกรด



รูป ข.16 ลักษณะตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย
S1(13/2) ที่ตกตะกอนด้วยกรด



รูป ข.17 ลักษณะตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย
S1(13/2) ที่ตกตะกอนด้วยกรดหลัง
Freeze dry

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าอิมัลชันของตะกอนที่สกัด

คำบรรยายภาพ



รูป ข.18 ค่าอิมัลชันของตะกอนหลังจากการ
ตกตะกอนด้วยกรดเชื้อแบคทีเรีย S1(13/2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้