บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการลดแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยง *B.subtilis* 3/38 ที่เลี้ยงในภาวะต่างๆ ในอาหารที่กำหนดสูตรโดยทำการทดลองในขวดเขย่า และวัดหาความสามารถในการลดแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนหาค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) ของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองขั้นต้นเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30^0ซ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 พบว่าค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อจะลดลงต่ำสุดในระยะหลังของการเจริญแบบลอการิธึม(Late logarithmic phase) โดยจะลดที่ชั่วโมงที่ 24 และกลับเพิ่มสูงขึ้นอีกในช่วงเวลาต่อมาดังแสดงในรูปที่ 3.3 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Lin และคณะในปี 1993 ที่รายงานในเชื้อ *B. licheniformis* ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ กับความสามารถในการลดแรงตึงผิวน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B.subtilis* 3/38 พบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่ามีค่าสูงมากและค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) ที่ได้ตลอดการทดลองมีค่าเป็น 0 จึงมีข้อสันนิษฐานได้สองประการคือ 1.ค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีผลกระทบต่อการวัดค่าแรงตึงผิวซึ่งรายงานไว้โดย Lin และคณะ(1992)(อ้างถึงใน Lin และคณะ ,1993) 2. ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ (Santos และคณะ, 1986) เพื่อตรวจสอบข้อสันนิษฐานทั้งสองจึงได้ทำการทดสอบโดยนำส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างค่าต่างๆแล้วนำมาทดสอบความสามารถในการลดแรงตึงผิวปรากฏว่าผลลัพธ์ไม่ต่างกันเท่าใดนั้นดังนั้นข้อสันนิษฐานประการหลังจึงมีความถูกต้องมากกว่า เมื่อทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก ทุกๆ 12 ชั่วโมงตลอดการทดลอง เพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ใกลเคียงกับ 7 พบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า ตลอดจนค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24})มีค่าต่ำกว่าเมื่อไม่ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง มาก แสดงว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจริง จากการที่ผลข้างต้นนั้นไม่สามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ได้จึงทดลองใช้การเติม 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ลงในสูตรอาหารซึ่งจะให้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างไว้ที่ 7 ได้ อีกทั้งมีความสะดวกกว่าซึ่งพบว่าให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับการเติมกรดหรือด่างทุก 12 ,ชั่วโมง และเมื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่ม

ต้นที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* 3/38 พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 8.5 โดยการใช้ 75 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ เป็นตัวทำละลายอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ผลผลิตของสารลดแรงตึงผิวดีที่สุด โดยให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่ามีค่าเท่ากับ 29 มิลลินิวตันต่อเมตรและให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24})เท่ากับ 69

สำหรับในขั้นตอนการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *B. subtilis* 3/38 นั้นได้ทดลองใช้แหล่งคาร์บอน 4 ชนิดได้แก่ กลูโคส น้ำตาลทราย กลีเซอรอล และ แป้ง ในขณะที่การแปรผันแหล่งคาร์บอนนี้ไม่เลือกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะยับยั้งการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B.subtilis* (Cooper และคณะ,1981) และยังมีผลรบกวนการวัดค่าแรงตึงผิวของเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นได้ จากการทดลองพบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Cooper และคณะ(1981) และปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมคือ 20 กรัมต่อลิตร โดยให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อเจือจาง 10 เท่าต่ำที่สุดเท่ากับ 29 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24})สูงกว่า แหล่งคาร์บอนอื่นๆเท่ากับ 70 สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลทราย และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าให้ผลสู้กลูโคสไม่ได้ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากซูโคสและแป้งมีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่า จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ทันทีต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายให้อยู่ในรูปที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ก่อนทำให้เซลล์นำไปใช้ได้อย่างช้าๆซึ่งอาจไม่เพียงพอสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิว ที่สร้างในช่วงการเจริญแบบลอการิธึม ส่วนกลีเซอรอลนั้นพบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่ามีค่าสูงกว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนไม่มากนักแต่ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) มีค่าต่ำกว่ามาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโดยตัวของกลีเซอรอลเองเป็นสารที่มีขั้วซึ่งอาจรบกวนการเกิดอีมัลชั่นระหว่างส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อกับน้ำมันก๊าด

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้น ได้ทดลองแปรผันแปรผันแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดคือ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และโซเดียมไนเตรท จากการทดลองพบว่าแอมโมเนียมไนเตรทที่ 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้การลดแรงตึงผิวดีที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นโดยให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่าต่ำที่สุดเท่ากับ 38 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์สูงที่สุดเท่ากับ 74 ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Cooper และคณะ (1981) อนึ่งพบว่า *B.subtilis* 3/38 เมื่อเลี้ยงโดยใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่ง

ไนโตรเจนนั้น เชื้อมีการเจริญน้อยมาก (รูปที่ 3.16) ซึ่งขัดแย้งกับงานของ Jenny ในปี 1990 ที่ทำการทดลองใน *B.licheniformis* ทั้งนี้อาจมีผลจากการที่เชื้อที่ใช้เป็นเชื้อต่างสปีชีส์กันก็ได้

สำหรับการศึกษาหาแหล่งแร่ปริมาณน้อยที่จำเป็นต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *B.subtilis* 3/38 ทำการแปรผันโดย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขาดแหล่งแร่จำเป็นที่ต้องการศึกษา โดยทำการศึกษากับแหล่งแร่ 3 ชนิดคือ แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) พบว่าเมื่อขาดแมงกานีสซัลเฟตค่าแรงตึงผิวที่ได้จากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ จะมีค่าสูงที่สุด แสดงว่าแมงกานีสซัลเฟตมีผลกระทบต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *B. subtilis* 3/38 มากที่สุด (รูปที่ 3.18) โดยอาจเป็นไปได้ว่าแมงกานีซัลเฟต เป็นธาตุปริมาณต่ำที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวโดยที่ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ (Cooper และคณะ,1981) ทั้งนี้ปริมาณที่เหมาะสมของแมงกานีสซัลเฟต อยู่ที่ความเข้มข้น 3.42 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) ดีที่สุด (รูปที่3.19) โดยสามารถลดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 20 เท่า จาก 72 มิลลินิวตันต่อเมตร ลงเหลือ 33 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 69 และอีมัลชั่นที่ได้ยังมีความเสถียรเป็นอย่างมาก

ในแง่ของอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *B. subtilis* 3/38 นั้นพบว่าอยู่ในช่วงค่อนข้างกว้างคือ 25^0ซ ถึง 35^0ซ และ ให้ผลดีที่สุดที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2^0ซ) (รูปที่3.6) ที่อุณหภูมิ 20^0ซ เชื้อมีการเจริญต่ำมากจึงให้ผลผลิตที่ต่ำมาก ส่วนที่อุณหภูมิ 40^0ซ และ 45^0ซ เชื้อสามารถเจริญได้แต่ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวและก่อให้เกิดอีมัลชั่นต่ำ ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Santose ในปี 1986 ที่รายงานว่าอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจะทำให้เมตาบอลิสมของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป เช่น เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าจุดที่เหมาะสม *Pseudomonas auroginosa* จะผลิตน้ำตาลแรมโนสลดลง ทำให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวแรมโนสลิปิดได้น้อยลง นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Syldatk และคณะ, 1985 (อ้างถึงใน Kosaric ,1993) ที่กล่าวว่าอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่เปลี่ยนแปลงไปอาจมีผลต่อโครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ได้

Sheppard และ Cooper ในปี 1990 (อ้างถึงใน Kosaric , 1993)ได้ทำการศึกษาผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวต่อการผลิตเซอแฟกตินใน cyclone column โดย *B. subtilis* สรุปได้ว่าการถ่ายเทอากาศลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่เป็นแฟกเตอร์สำคัญสำหรับกระบวนการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต และการขยายขนาดการผลิตเซอแฟกติน สำหรับ *B. subtilis* 3/38 พบว่า

ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเขย่าเพื่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนั้นอยู่ที่ 200 รอบต่อนาที ซึ่งให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด

เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเป็น 2 , 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 แล้วนำไปบ่มที่ 4 ^{0} ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้ทำการเจือจาง 10 และ 20 เท่า และวัดค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์พบว่า สารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงกว้าง 6-12 (รูปที่ 20) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cooper และคณะ (1981)ที่ได้รายงานถึงส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Bacillus sp.* IAF 343 ที่เสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำกว่า 7 และ ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 4-8 ตามลำดับ

สำหรับความเสถียรต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่ามีความเสถียรที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) ที่อุณหภูมิ 4°ซ และที่ 0°ซ โดยพบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอด 100 วันทั้ง 3 อุณหภูมิ (รูปที่ 3.21) แต่ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 °ซ) จะเริ่มมีค่าลดลงในวันที่ 80 ของการบ่ม (รูปที่ 3.22) ในส่วนของความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ ,80°ซ และ 100°ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 55 °ซ และ 80°ซ สารลดแรงตึงผิวยังมีความเสถียรอยู่จนถึง 240 นาที สำหรับค่าแรงตึงผิวพบว่ามีค่าค่อนข้างคงที่ทั้ง 3 อุณหภูมิ แต่ที่อุณหภูมิ 100°ซ ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเริ่มมีค่าลดลงในนาทีที่ 180 ของการบ่ม (รูปที่ 3.24) ส่วนค่าการกระจายน้ำมันพบว่าที่อุณหภูมิ 100 °ซ ค่าการกระจายน้ำมันจะลดลงเล็กน้อยตั้งแต่ 30 นาทีแรกของการบ่ม (รูปที่ 3.25) จากการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่เพียงแต่มีความเสถียรมากที่อุณหภูมิต่ำเท่านั้นแต่ก็สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการที่จะทำสารนี้ให้บริสุทธิ์ต่อไป

ในการทำงานของเครื่องวัดแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นตามเอกสารอ้างอิง (Tasakorn, 1977) นั้นได้ทำการเปรียบเทียบการวัดค่าแรงตึงผิวกับเครื่องวัด แรงดึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน โดยใช้สารละลายโซเดียมไดเดซิลซัลเฟต (SDS) ที่ค่าการเจือจางต่างๆเป็นสารละลายมาตรฐาน (ดังรูปที่ 3.27) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย SDS มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่า cmc จะให้ผลการวัดค่าแรงตึงผิวที่ใกล้เคียงกันทั้งสองเครื่องโดยให้ค่า cmc เท่ากัน คือที่ความเข้มข้น 1: 500 ในการวัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าค่า cmc เครื่องมือที่สร้างขึ้นกับเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวทางการค้ารุ่น K6 ของบริษัท KRUSS จะให้ค่าแรงตึงผิวที่แตกต่างกันโดยที่เครื่องวัดแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นจะให้ค่าแรงตึงผิวที่สูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากส่วนที่สัมผัสกับสารละลายของเครื่องมือทั้ง 2 ทำจากวัสดุต่างชนิดกัน ตามธรรมชาติแล้วสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วน

ไฮโดรฟิลิกเข้าหาแก้วซึ่งต้องแย่งที่กับโซเดียมอิออนในระบบซึ่งเป็นพวกไฮโดรฟิลิกเช่นกัน ดังนั้น ผิวสัมผัสระหว่างแก้วกับสารลดแรงตึงผิวจะน้อยกว่าที่ควรจะเป็นค่าแรงตึงผิวที่ได้จึงสูงกว่าในกรณีที่ผิวเป็นโลหะ โดยที่ในกรณีนี้สารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนไฮโดรโฟบิกเข้าหาโลหะจึงไม่ถูกรบกวนโดยโซเดียมอิออน ดังนั้นหากตัวทำละลายของสารลดแรงตึงผิวที่ต้องการวัดเป็นสารประเภทไฮโดรโฟบิกเครื่องวัดแรงตึงผิวที่ใช้ควรเป็นเครื่องแบบวงแหวนโลหะเนื่องจากสามารถหลีกเลี่ยงการรบกวนจากสารประเภทไฮโดรฟิลิกในสารละลายได้ ในทำนองเดียวกันหากตัวทำละลายของสารลดแรงตึงผิวที่ต้องการวัดเป็นสารประเภทไฮโดรฟิลิกเครื่องวัดแรงตึงผิวที่ใช้ควรทำจากแก้วเพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนการวัดค่าแรงตึงผิวจากสารประเภทไฮโดรโฟบิกในสารละลาย ในการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารประเภทไฮโดรฟิลิกเนื่องจากมีน้ำเป็นตัวทำละลาย จึงควรใช้เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวที่ทำจากแก้ว (Davies และ Ridcal , 1961)

ในการเปรียบเทียบผลการวัดค่าแรงตึงผิวระหว่างเครื่องมือที่สร้างขึ้นกับเครื่องรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS นั้น เมื่อทำการวัดโดยไม่เจือจาง ที่เจือจาง 10 เท่า และ 20 เท่า นั้นให้ผลใกล้เคียงกันแต่หากทำการเจือจางมากขึ้นจะพบความแตกต่างได้(รูปที่ 3.28) นอกเหนือจากประเด็นของโซเดียมอิออนข้างต้นแล้วผิวแก้วยังอาจถูกจับเกาะโดยสารไฮโดรฟิลิกอื่น เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ได้ด้วย ส่วนในกรณีโลหะนั้นไขมันที่อาจมีอยู่ในสารละลายเมื่อจับกับผิวโลหะจะยิ่งช่วยให้ส่วนไฮโดรโฟบิกของสารลดแรงตึงผิวจับกับผิวโลหะดีขึ้นค่าที่ได้จึงยิ่งต่ำกว่ากรณีของแก้ว ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นสูงๆ ซึ่งมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวมากค่าที่ได้จะไม่เห็นความแตกต่างมากนักแต่หากเมื่อเจือจางมากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้นจะมีผลกระทบกับการวัดมากจึงเป็นสาเหตุที่พบความแตกต่างในกรณีทีเจือจางสารละลายมากๆ

จากการหาค่า critical micelle dilution (CMD)ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่องวัดแรงตึงผิวที่สร้างเองเปรียบเทียบกับเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS พบว่าได้ค่า CMD เท่ากันคือที่ค่าการเจือจาง 10 เท่า และพบว่าที่ความเข้มข้นสูงกว่าหรือเท่ากับค่า CMD จะให้ค่าแรงตึงผิวที่ใกล้เคียงกันทั้งสองเครื่อง(ผลการทดลองดังรูป 3.29)