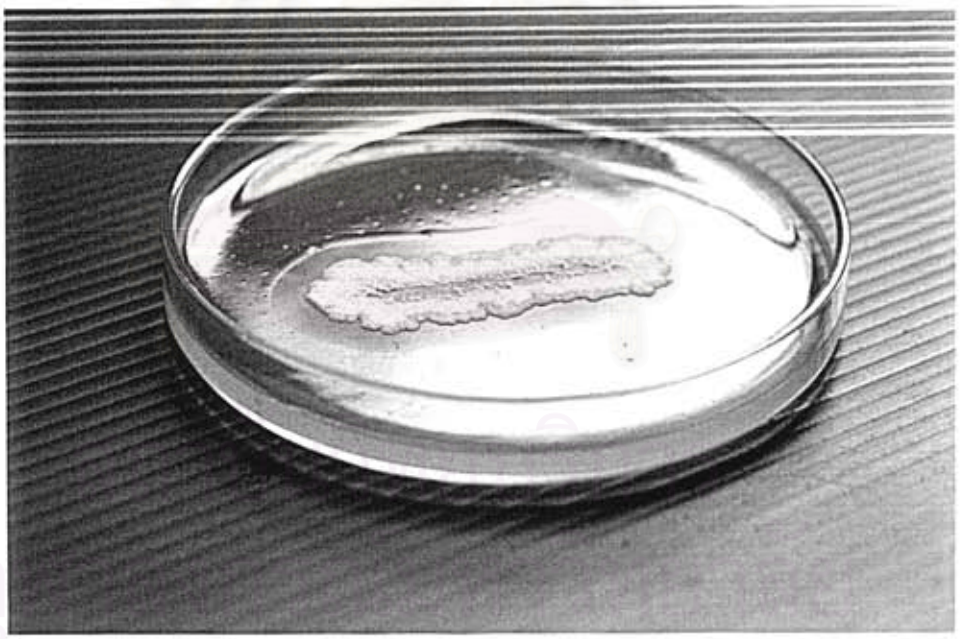
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38

3.1.1 ความสามารถในการกระจายน้ำมันดิบของ *Bacillus subtilis* 3/38 บนอาหารแข็งแอลบี

เมื่อทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมันของ *Bacillus subtilis* 3/38 โดยทำการขีดเชื้อทดสอบลงบนอาหารแข็งแอลบีที่มีน้ำมันดิบปริมาณ 20 ไมโครลิตร ปกคลุมผิวหน้าของอาหารอยู่อย่างสม่ำเสมอและตรวจดูการกระจายน้ำมันที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ พบว่า *Bacillus subtilis* 3/38 เมื่อทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จะปล่อยสารที่สามารถกระจายน้ำมันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงการกระจายน้ำมันดิบของ *Bacillus sutilis* 3/38 โดยวิธีขีดลงบนอาหารแข็งที่มีน้ำมันดิบปกคลุมอยู่ และบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

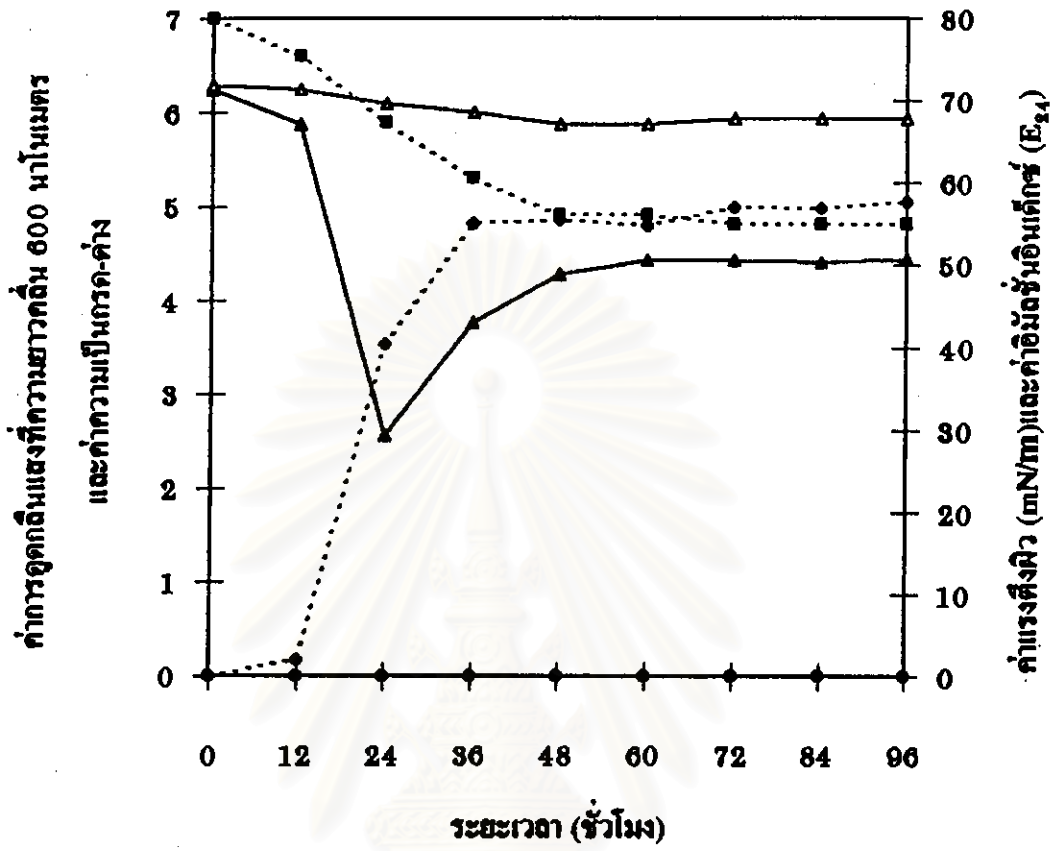
3.1.2 ความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบกลุ่มต่างๆ โดย *Bacillus subtilis* 3/38

จากการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ของ *Bacillus subtilis* 3/38 จะให้ผลชัดเจนเมื่อทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โดยจะให้ผลดีมากในการฆ่าจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ และดีในกลุ่มรา สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียนั้นจะให้ผลในบางสายพันธุ์ โดยไม่มีความจำกัดต่อชนิดแกรมบวกหรือแกรมลบ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบกลุ่มต่างๆ ของ *Bacillus subtilis* 3/38

เชื้อทดสอบ	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	
	48	72
กลุ่มยีสต์		
Torulopsis glabrata	+++	+++
Hansenula anmala	+++	++
Saceharomyces cerevisiae	+++	+++
Candida lipolytica	++	+++
Pichia kluyveri	++	++
กลุ่มแบคทีเรีย		
Micrococcus luteus	-	-
Bacillus subtilis 3/38	+	+
Pseudomonas aeruginosa	-	-
Escherichia coli	+++	+++
กลุ่มรา		
Aspergillus niger	+++	+++
Pennicillium sp.	++	++
Fusarium sp.	++	++
Cladosporium sp.	++	++

หมายเหตุ (+), (++), (+++) แสดงความกว้างของบริเวณใสบนจานเพาะเชื้อ 1.0, 2.0 และ 3.0 ซม. ตามลำดับ ในขณะที่ (-) หมายถึง ไม่แสดงบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.3 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอิมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอิมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

และกลับสูงขึ้นเป็น 43 มิลลินิวตัน/เมตร ในชั่วโมงที่ 36 และไม่มีความสามารถก่ออีมัลชั่นกับน้ำมันก๊าด เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาเจือจาง 10 เท่า แล้ววัดค่าแรงตึงผิวทุก 12 ชั่วโมง พบว่ามีค่าแรงตึงผิวสูงมาก โดยอยู่ที่ระหว่าง 63-72 มิลลินิวตัน/เมตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.3

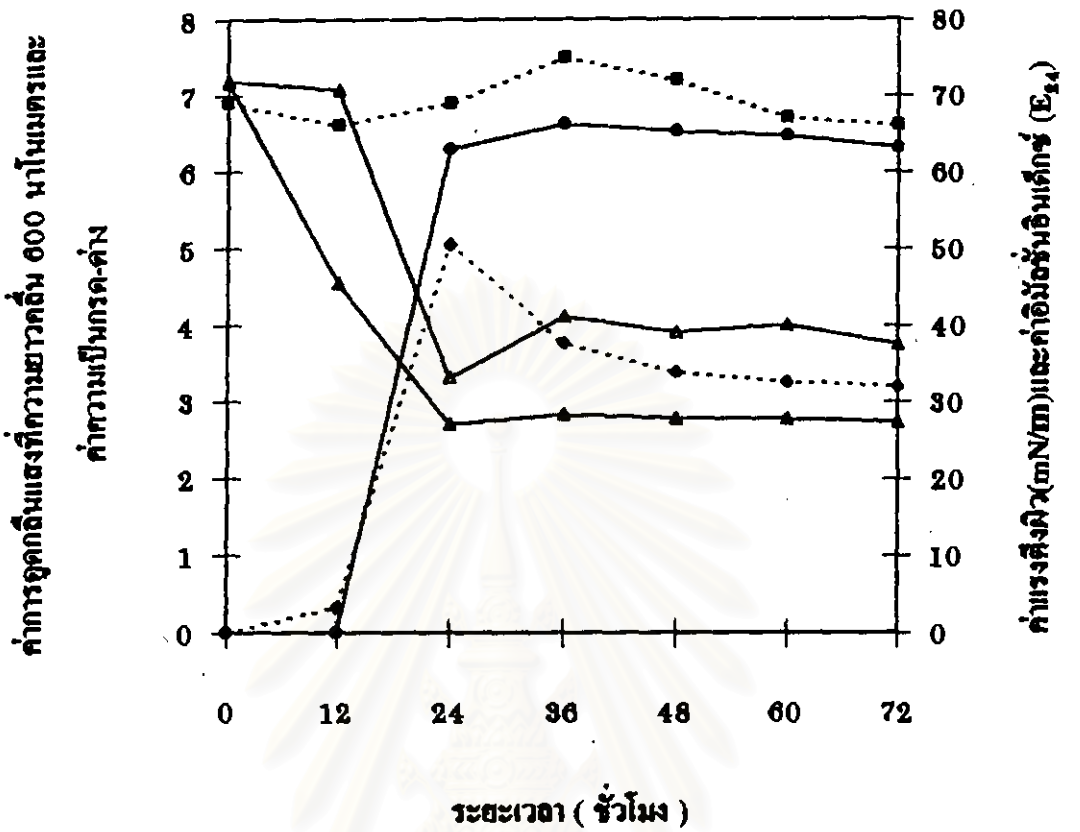
3.2.2 ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38

3.2.2.1 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการเติมกรดหรือด่าง

เมื่อทดลองปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการเติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริกไว้ที่ประมาณ 7 ทุกๆ 12 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.4 พบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ จะลดลงต่ำในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าคงที่โดยไม่มีการเพิ่มขึ้นอีกตลอดการเลี้ยงเชื้อ ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) จะเพิ่มสูงในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ(ประมาณ 66) และมีค่าค่อนข้างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 72 เมื่อเจือจางส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 เท่า แล้ววัดค่าแรงตึงผิวพบว่า ค่าแรงตึงผิวจะมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 33 มิลลินิวตันต่อเมตร และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 36 เป็น 41 มิลลินิวตันต่อเมตร และจะค่อนข้างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 72 ส่วนความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลอง มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 6.6-7.5

3.2.2.2 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้บัฟเฟอร์

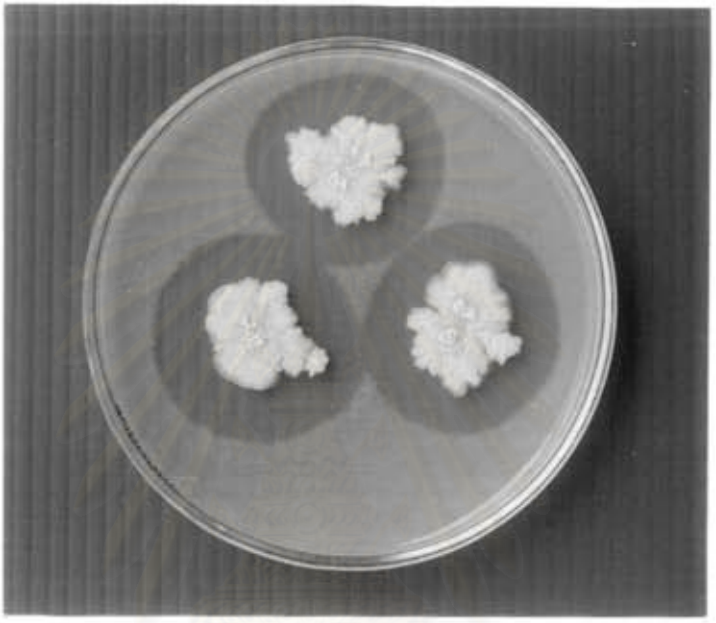
ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 เป็นตัวทำละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7 เมื่อทดสอบค่าแรงตึงผิวของส่วนใส และค่าอีมัลชั่นอินเด็ก(E_{24}) ทุกๆ12 ชั่วโมง พบว่า ค่าแรงตึงผิวลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 และค่อนข้างคงที่ตลอดการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.5) ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์เพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อและผันแปรในช่วงแคบๆในช่วงเวลาที่เหลือ ส่วนน้ำใสที่เจือจางน้ำกลั่น 10 เท่าให้ค่าแรงตึงผิวต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยง และค่อนข้างคงที่ในช่วงเวลาที่เหลือ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองจะแปรเปลี่ยนในช่วง 6.7-7 เปรียบเทียบวิธีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเติมกรดหรือด่างทุก 12 ชั่วโมง กับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยบัฟเฟอร์ พบว่าวิธีการทั้ง 2 ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน แต่วิธีปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยบัฟเฟอร์นั้น สามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างได้ดีและสะดวกกว่า



รูปที่ 3.4 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของการเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7 ด้วยการเติม 1 M NaOH หรือ 1 M HCl ทุก12ชั่วโมง

3.1.3 การทดสอบแอคติวิตี ของเอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* 3/38

เมื่อทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส โดยทำการขีดไข้วเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีผงกอลล์และไตรบิวไทรินผสมอยู่ ทำการบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จะพบบริเวณใสเกิดขึ้นรอบโคโลนี *Bacillus subtilis* 3/38 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.2

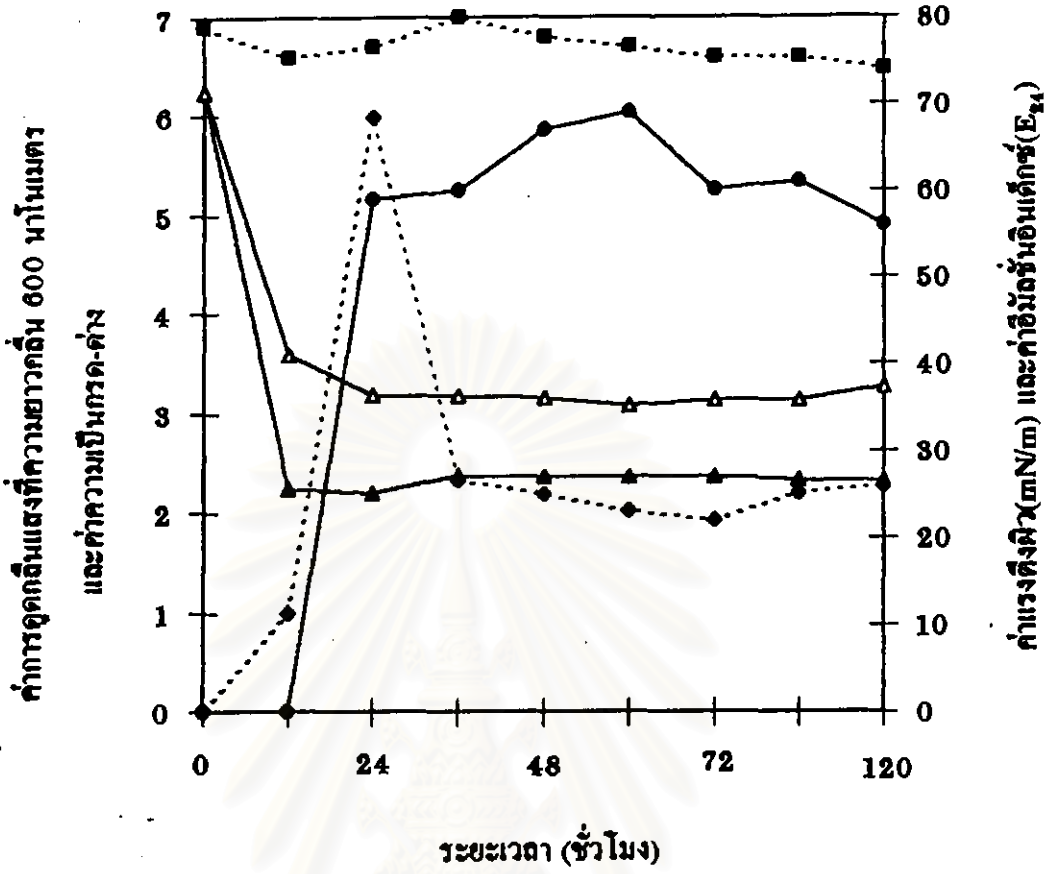


รูปที่ 3.2 แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* 3/3 โดยวิธีขีดไขว้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแอลบี ที่มีผงกอลล์และไตรบิวไทรินผสมอยู่ เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus subtilis 3/38* เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.2.1 การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 และการผลิตสารลดแรงตึงผิว

รูปที่ 3.3 เป็นกราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ที่สร้างจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าเชื้อจะเข้าสู่ระยะเอ็กโพเนนเชี่ยลในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นเข้าสู่ระยะพักในชั่วโมงที่ 24 สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างมีความสอดคล้องกับการเจริญโดยลดจากค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ลงมาและเริ่มคงที่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 ในชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ค่าแรงตึงผิวส่วนน้ำใสเซลล์เพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 มิลลินิวตัน/เมตร ที่ชั่วโมงที่ 24



รูปที่ 3.5 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของการเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

3.2.2.3 การหาความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38

ทำการโดยแปรผันความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 50, 75, 100 และ 125 มิลลิโมลาร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 แล้ววัดค่าแรงตึงผิวส่วนใสของเซลล์เพาะเลี้ยง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า ทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้ผลดีที่สุดดังแสดงในตารางที่ 3.2 จากนั้นทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยง ตั้งแต่ 6.5-8 โดยเพิ่มขึ้นทีละ 0.5 ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5 และ 9 ใช้ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ โดยทำการแปรผันตั้งแต่ 25, 50 , 75 , 100 และ 125 มิลลิโมลาร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.3 จากการติดตามค่าแรงตึงผิวส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่นำมาเจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่น พบว่า 75 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นจึงทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 8.5 ถึง 9 พบว่าทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5 เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38 พบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า มีค่าต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างอื่นโดยมีค่าเท่ากับ 29 มิลลินิวตันต่อเมตรในชั่วโมงที่ 24 ส่วนค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E24) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5 และ 9 มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 70 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.4

3.2.3 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในการศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20°ซ 25°ซ 30°ซ อุณหภูมิห้อง(30±2 °ซ) 35°ซ 40°ซ และ 45°ซ เมื่อทำการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ทำการเจือจาง 20 เท่า และวัดค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24})พบว่าที่อุณหภูมิ 25°ซ 30°ซ อุณหภูมิห้อง และ 35°ซ ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน(รูปที่ 3.6) โดยที่อุณหภูมิห้องให้ผลการทดลองดีที่สุด ลดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ทำการเจือจาง 20 เท่าด้วยน้ำกลั่นลงได้ต่ำที่สุดเท่ากับ 33 มิลลินิวตันต่อเมตร แต่ค่าอีมัลชั่น อินเด็กซ์ (E_{24}) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 70

ตารางที่ 3.2 แสดงผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (มิลลินิวตันต่อเมตร)				ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า (มิลลินิวตันต่อเมตร)				ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})			
	ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (มิลลิโมลาร์)				ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (มิลลิโมลาร์)				ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (มิลลิโมลาร์)			
	50	75	100	125	50	75	100	125	50	75	100	125
0	71	70	71	71	71	71	72	71	0	0	0	0
12	26	25	26	26	56	67	41	65	0	0	0	0
24	27	27	26	27	57	51	36	50	0	7.7	67	31
36	30	28	27	29	64	56	36	51	0	4.6	66	29
48	29	28	28	29	62	46	36	45	0	12	67	37
60	29	27	27	29	60	46	35	44	0	9.2	69	31
72	30	27	27	29	63	46	36	44	0	12	61	44

ตารางที่ 3.3 แสดงผลของความเข้มข้นของทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5 ต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

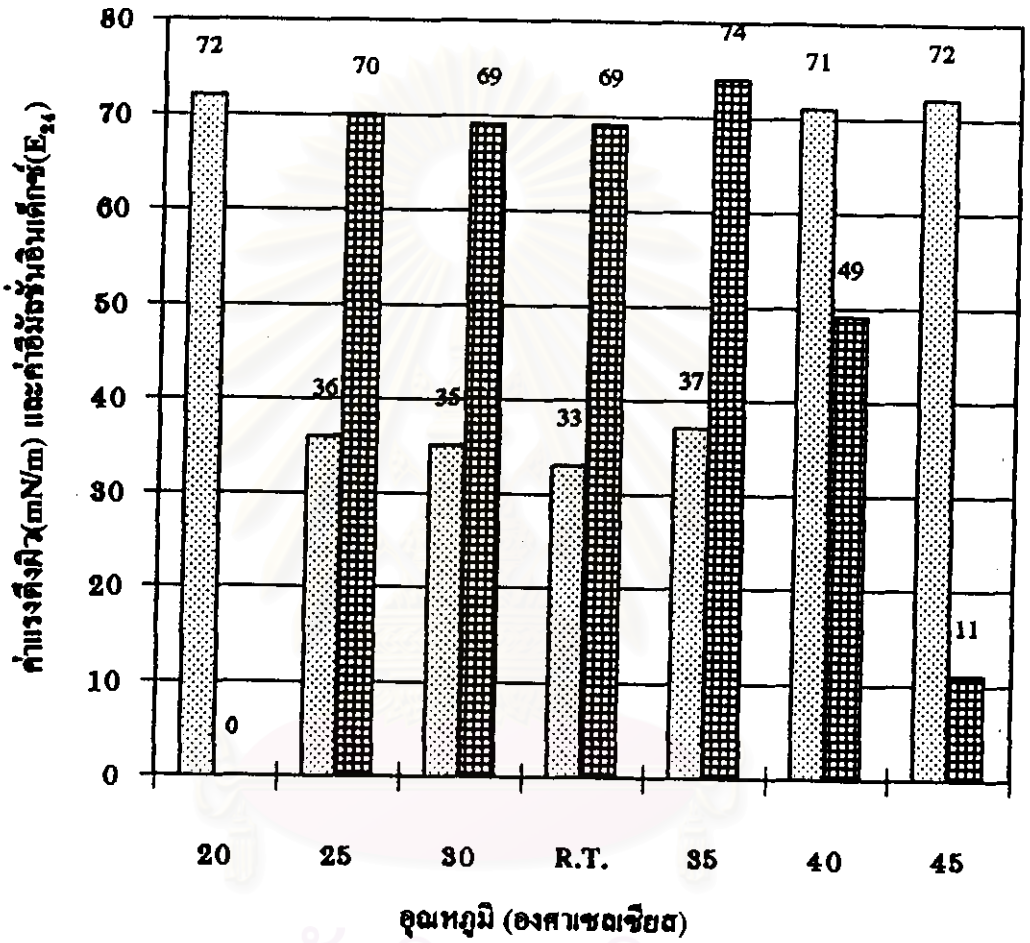
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (มิลลินิวตันต่อเมตร)					ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า (มิลลินิวตันต่อเมตร)					ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})				
	ความเข้มข้นของทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (มิลลิโมลาร์)					ความเข้มข้นของทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (มิลลิโมลาร์)					ความเข้มข้นของทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (มิลลิโมลาร์)				
	25	50	75	100	125	25	50	75	100	125	25	50	75	100	125
0	72	71	70	71	71	71	72	71	72	71	0	0	0	0	0
12	26	26	45	26	61	37	43	66	32	71	0	0	0	0	0
24	27	26	25	26	26	39	32	29	32	39	0	73	69	74	72
36	26	27	25	26	28	37	33	29	31	52	0	74	71	71	71
48	26	27	26	26	27	33	31	30	31	48	0	73	72	73	69
60	26	26	26	26	27	41	32	30	30	42	0	74	71	72	71
72	25	26	27	26	27	41	31	31	30	41	0	72	72	72	71

ตารางที่ 3.4 แสดงผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ , ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (มิลลินิวตันต่อเมตร)						ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า (มิลลินิวตันต่อเมตร)						ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})					
	ค่าความเป็นกรด-ด่าง						ค่าความเป็นกรด-ด่าง						ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
	6.5	7	7.5	8	8.5	9	6.5	7	7.5	8	8.5	9	6.5	7	7.5	8	8.5	9
0	71	71	71	70	71	70	73	72	72	72	71	72	0	0	0	0	0	0
12	47	26	26	27	45	71	73	41	51	57	66	72	0	0	0	0	0	0
24	40	26	27	27	25	28	71	36	47	36	29	61	0	67	62	68	69	69
36	37	27	27	28	25	29	69	36	38	37	29	54	0	66	63	70	71	69
48	33	27	27	27	26	29	66	36	36	36	30	57	0	67	67	70	72	71
60	32	27	27	27	26	29	64	35	39	34	30	55	0	69	61	69	71	71
72	33	27	27	27	27	29	64	36	39	35	31	56	0	61	57	66	72	71

ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6.5 - 8 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 8.5 - 9 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์



รูปที่ 3.6 แสดงค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 20, 25, 30,อุณหภูมิห้อง(30+2^{0}ซ), 35, 40, 45 องศาเซลเซียส

หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า

หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.4 อัตราการเขย่าเซลล์เพาะเลี้ยงต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis 3/38* ในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร(ภาคผนวกหมายเลข 1.10) แปรผันความเร็วรอบการเขย่าที่ 100 , 150 , 200 , 250 และ 300 รอบ/นาที ตามลำดับ พบว่าความเร็วรอบที่เหมาะสมคือ 200 รอบ/ นาที โดยที่ส่วนน้ำใสให้ค่าแรงตึงผิวหลังการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 เท่า มีค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 38 มิลลินิวตันต่อเมตร ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24}) จากการเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบการเขย่า 200 , 250 และ 300 รอบ/นาที มีค่าใกล้เคียงกันได้แก่ 72, 73 และ 73 ตามลำดับ สำหรับค่าการกระจายน้ำมันของส่วนใสที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 50 หน่วย แสดงดังรูปที่ 3.7

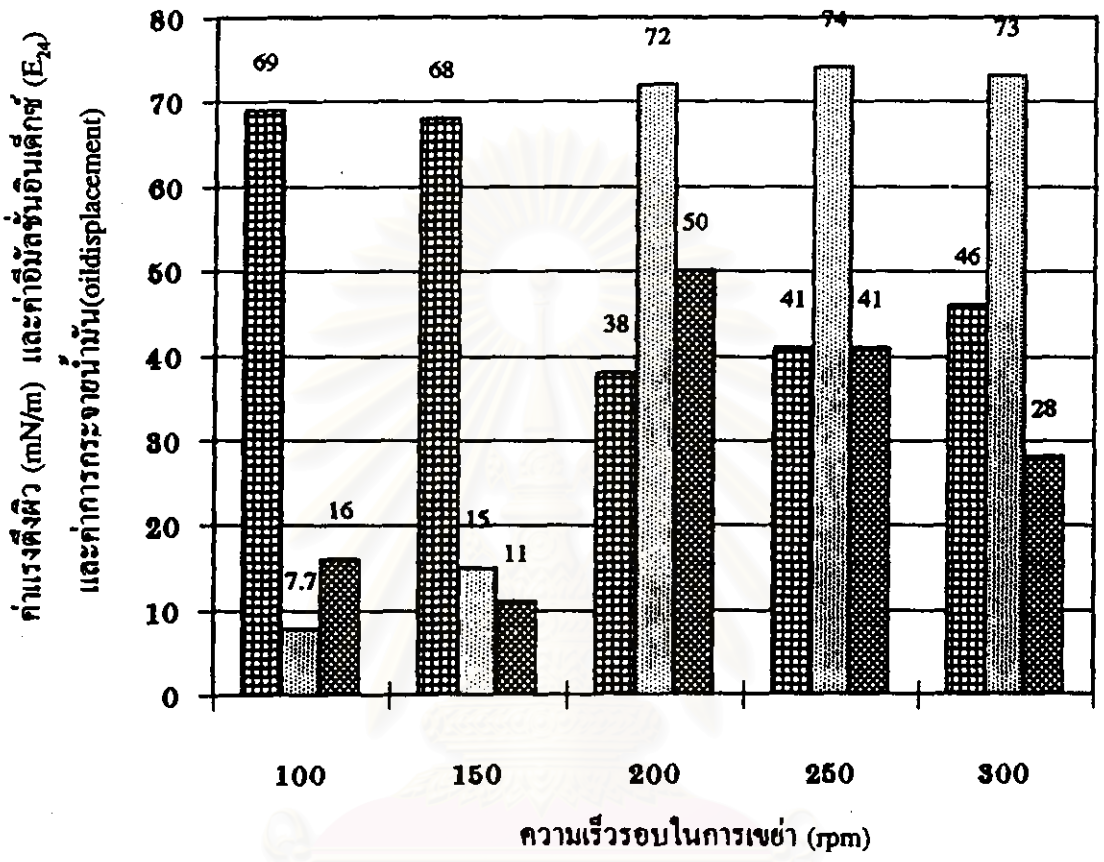
3.3 <u>องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u>

3.3.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการศึกษาเพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* 3/38 ในขวดเขย่า โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร (ภาคผนวกหมายเลข 1.10) ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ กันได้แก่ กลูโคส, น้ำตาลทราย, กลีเซอรอล และแป้ง แล้ววัดค่าแรงตึงผิว ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ของส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อและค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเจือจาง 10 เท่า ทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่ากลูโคสที่ความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ให้ประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวดีที่สุด โดยค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเจือจาง 10 เท่ามีค่าเท่ากับ 30 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) สูงที่สุดเท่ากับ 71 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.8 - 3.11 จากนั้นทำการศึกษาหาปริมาณของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยทำการแปรผันปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 2.5, 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัม/ลิตร พบว่ากลูโคส 20 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด แสดงดังรูปที่ 3.12

3.3.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ *Bacillus subtilis* 3/38 ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ดีที่สุด จะดำเนินการเช่นเดียวกับการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม กล่าวคือ ทดลองใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่เป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร (ภาคผนวกหมายเลข 1.10)

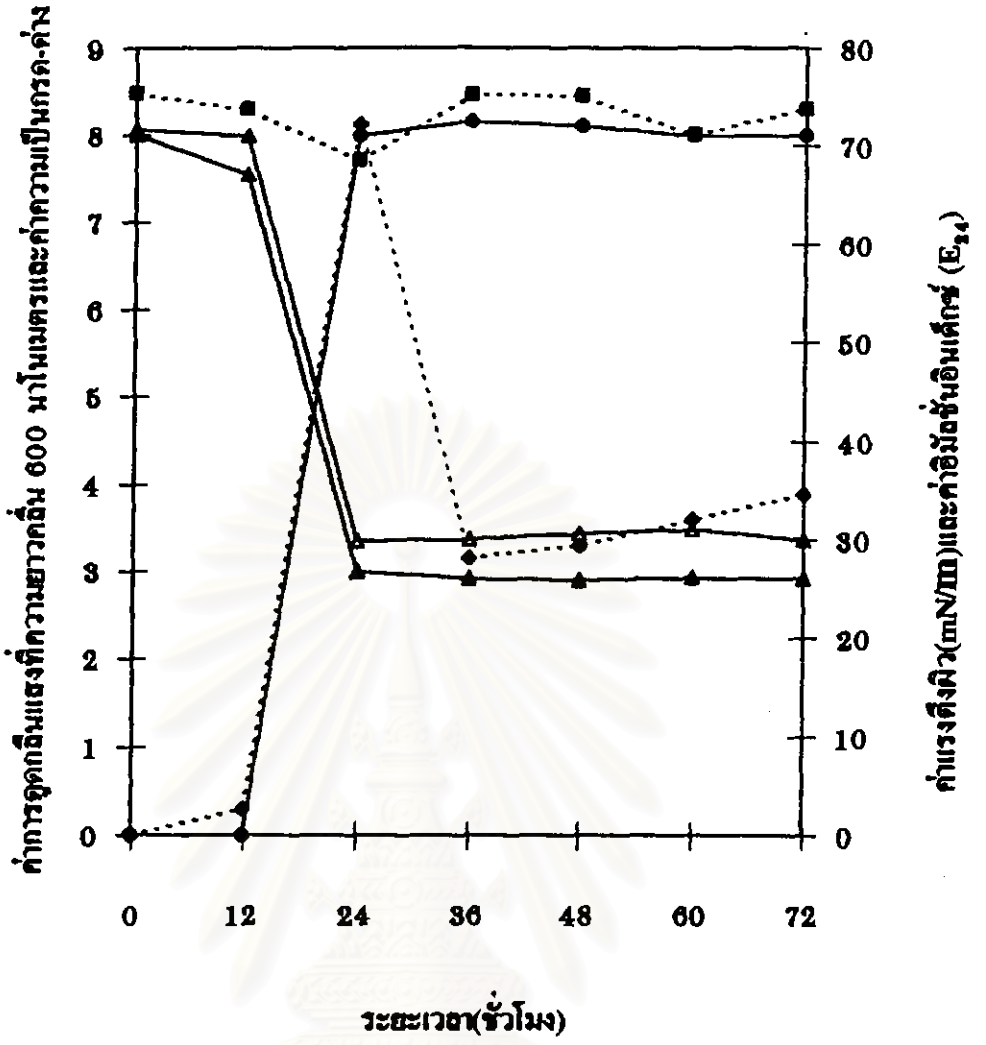


รูปที่ 3.7 แสดงค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และค่าการกระจายน้ำมัน (oildisplacement)ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อให้อากาศแก่เชื้อ

หมายถึง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า

หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

หมายถึง ค่าการกระจายน้ำมัน (oil displacement)ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.8 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้กลูโคส 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

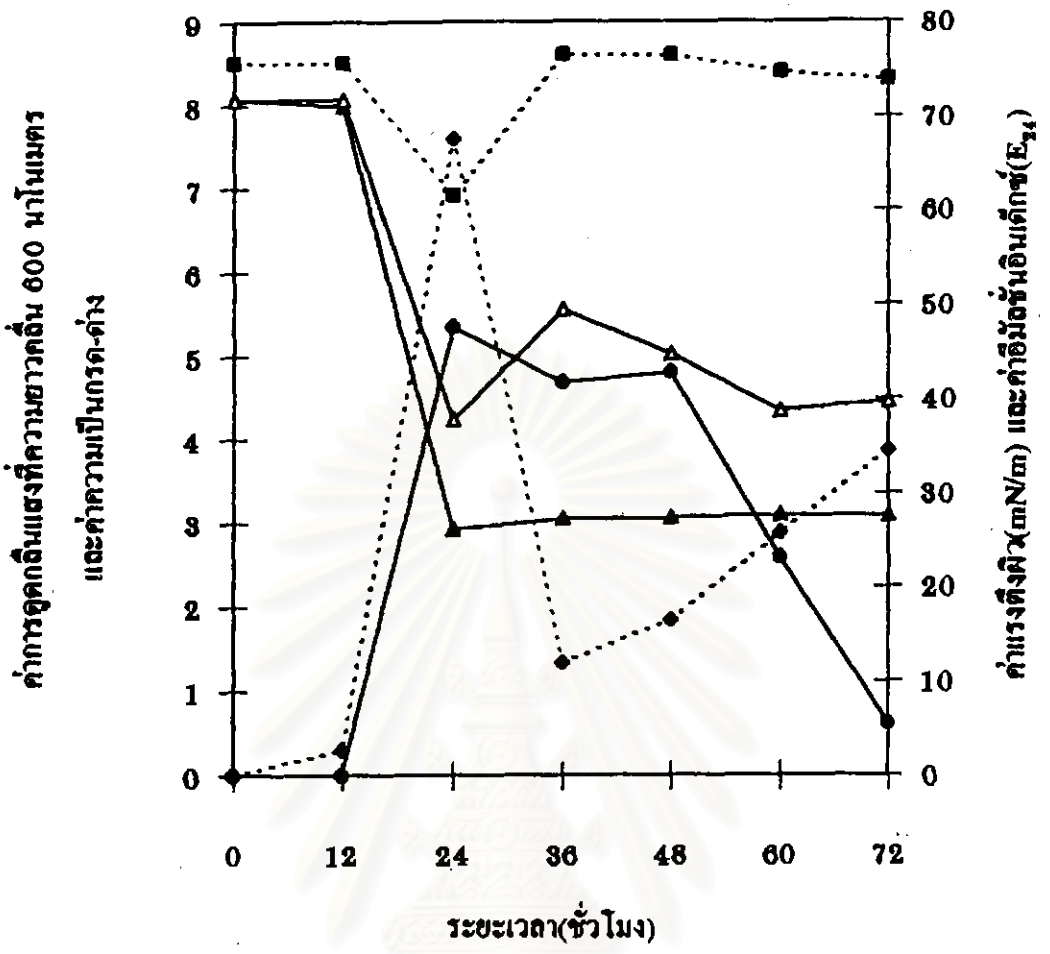
---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.9 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้น้ำตาลทราย 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

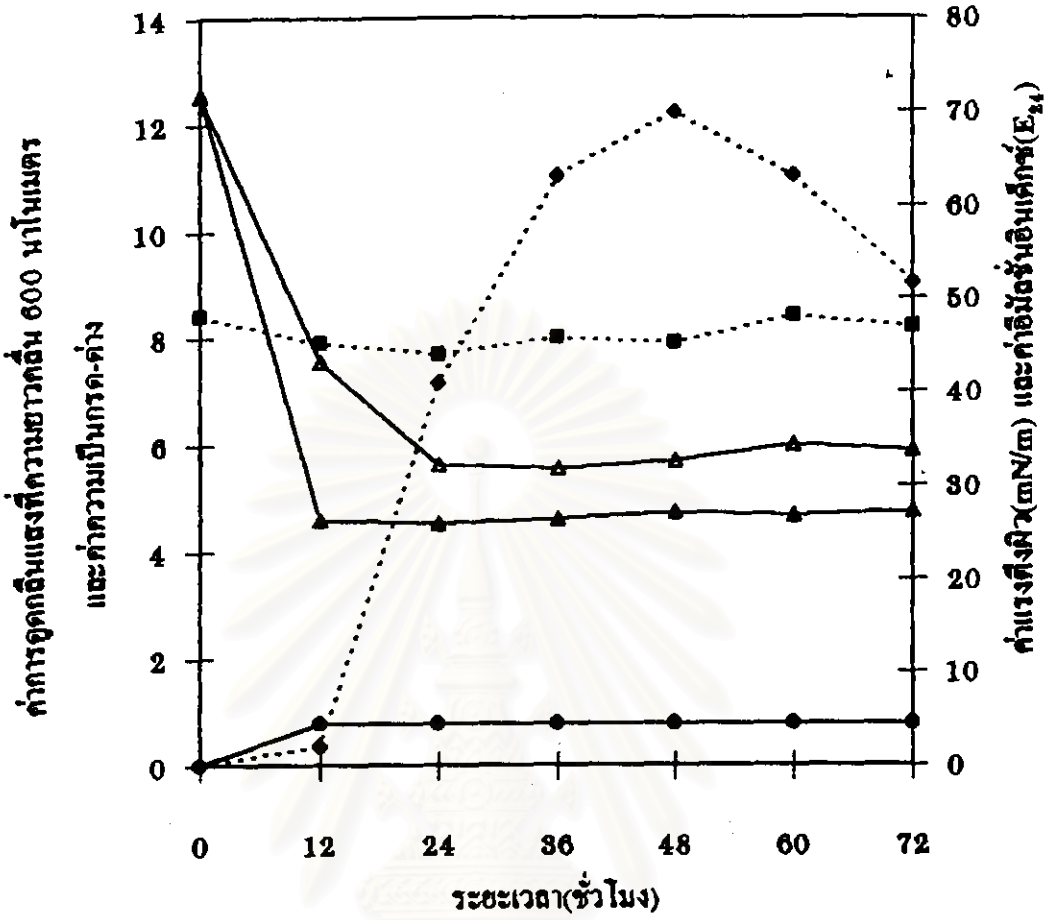
---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.10 แสดงรูปแบบการเจริญ,การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง,ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ กลีเซอรอล 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

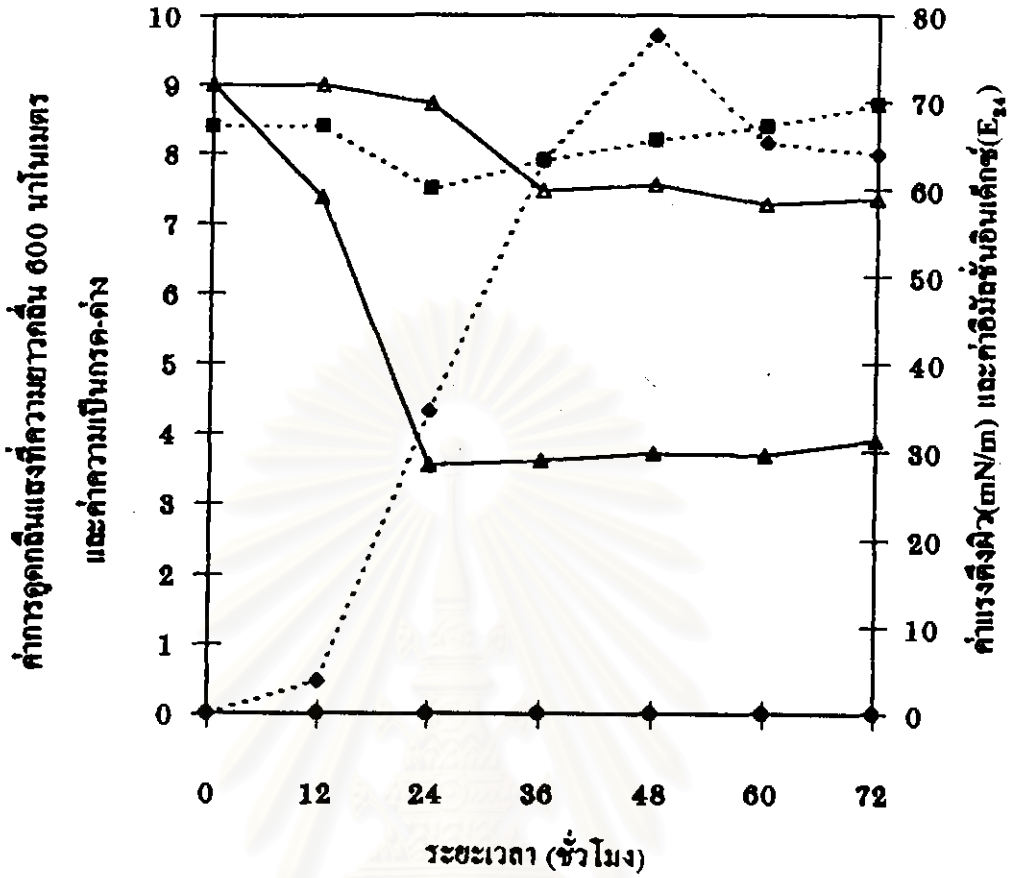
---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—●— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.11 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ แป้ง 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

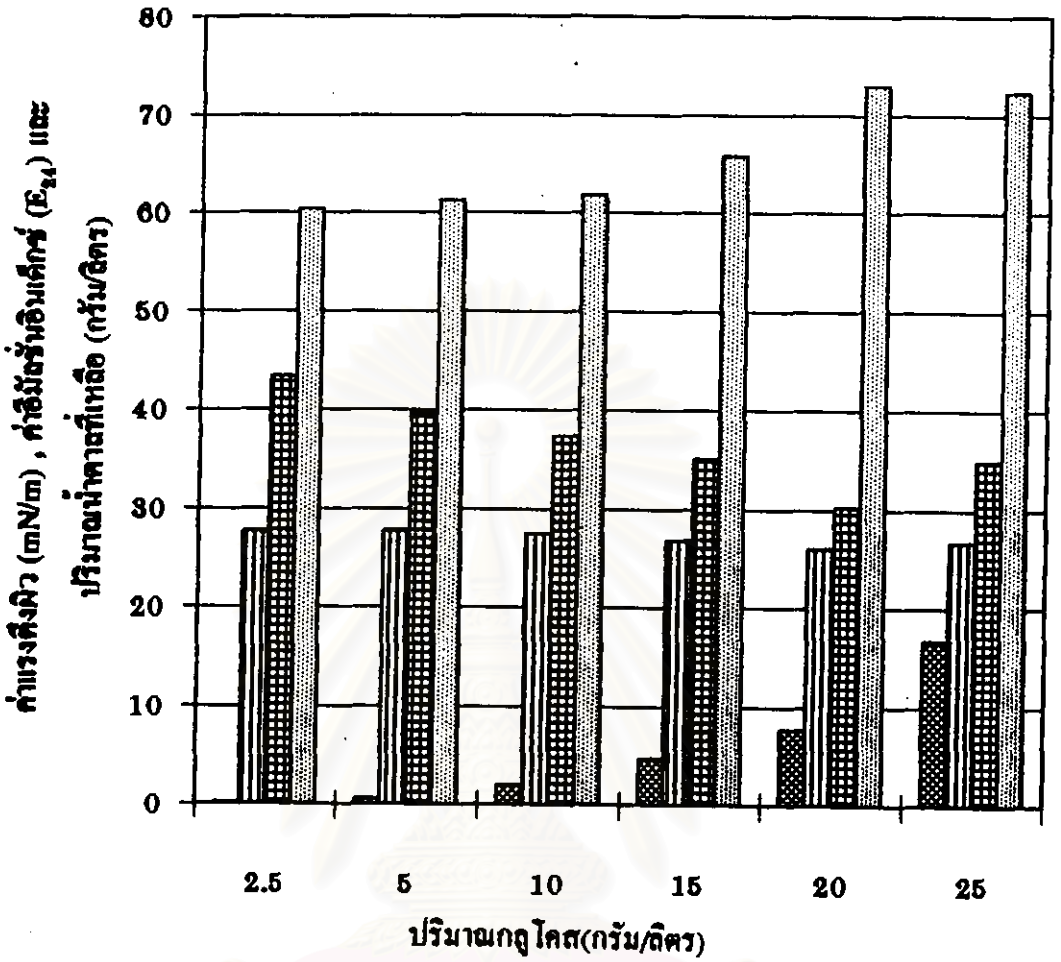
--●-- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

--■-- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.12 แสดงปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการแปรผันปริมาณกลูโคส

หมายถึง ปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

พบว่าแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยลดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทำการเจือจาง 10 เท่าลงต่ำที่สุดเท่ากับ 30 มิลลินิวตันต่อเมตรและให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์เท่ากับ 71 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.13-3.16 และเมื่อทำการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทตั้งแต่ 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 กรัม/ลิตร พบว่าแอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 2 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด โดยลดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทำการเจือจาง 20 เท่าลงได้เท่ากับ 38 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ เท่ากับ 74 ดังรูปที่ 3.17

3.3.3 แหล่งเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

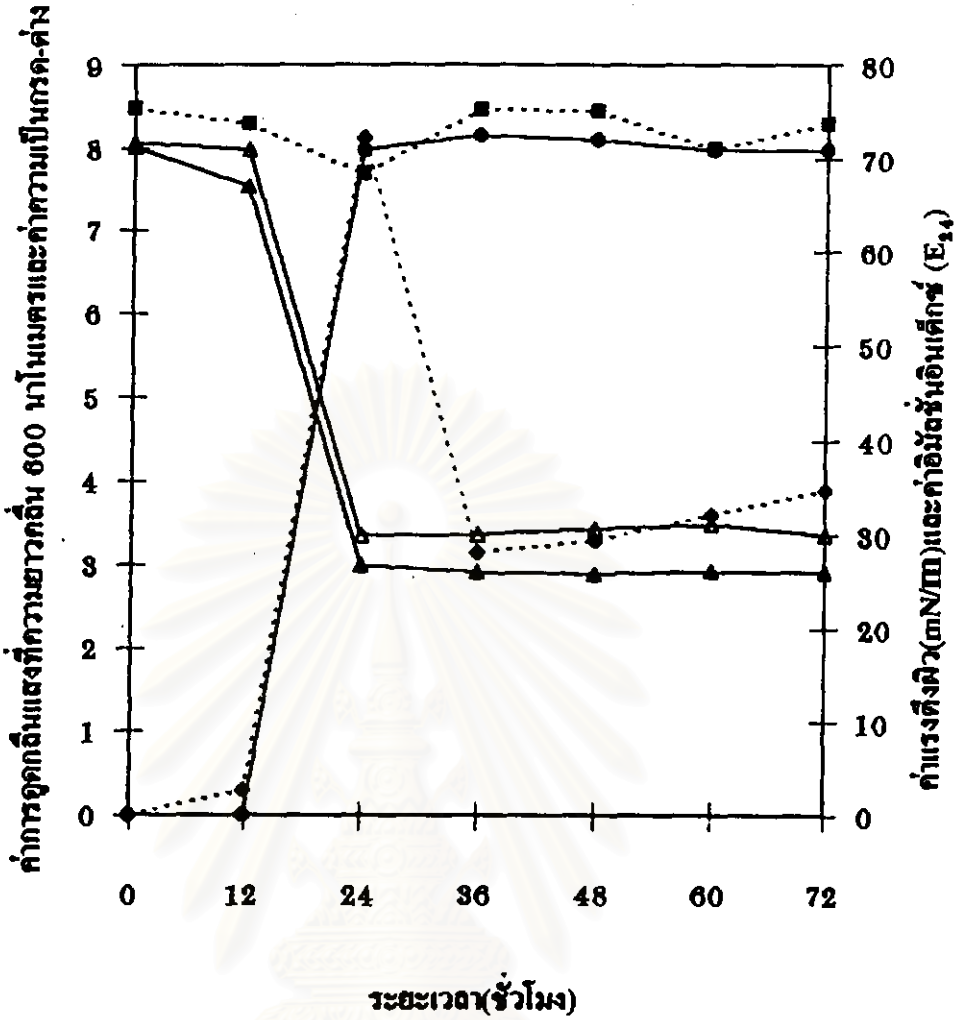
ในการศึกษาเพื่อหาแหล่งแร่ที่จำเป็นและปริมาณที่เหมาะสม สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะดำเนินการโดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร (ภาคผนวก หมายเลข 1.10) ที่ตึงเอาแร่ต่างๆออกทีละตัว ได้แก่ เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 .7H_2O$) ซิงก์ซัลเฟต ($ZnSO_4 .7H_2O$) และแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) แล้วประเมินผลพบว่าการตึงเอาแมงกานีสซัลเฟตออกจากสูตรอาหารจะมีผลต่อปริมาณของสารลดแรงตึงผิวนี้ได้ โดยหากขาดจะทำให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจือจาง 20 เท่ามีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 60 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ เท่ากับ 69 ดังรูปที่ 3.18 เมื่อแปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟตตั้งแต่ 1.71, 3.42 และ 5.13 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า แมงกานีสซัลเฟตที่ 3.42 มิลลิกรัม/ลิตร จะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ดังรูปที่ 3.19 โดยลดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจือจาง 20 เท่าลงเหลือ 33 มิลลินิวตันต่อเมตรและให้ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) เท่ากับ 69

หลังจากที่ได้ภาวะที่เหมาะสมในเบื้องต้นแล้ว ได้ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus subtilis* 3/38 ผลการทดลองแสดงดังรูป 3.20 พบว่าสามาทำให้ส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 20 เท่ามีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 33 มิลลินิวตัน/เมตร ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ(E_{24}) มีค่าเท่ากับ 74 และให้ค่าการกระจายน้ำมัน 38 หน่วย ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง

3.4 <u>สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก</u> *Bacillus subtilis* 3/38

3.4.1 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการศึกษาความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 โดยนำส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 นำไปบ่มที่ 4°ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ติดตามผลโดยวัดค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24})



รูปที่ 3.13 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท 4 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

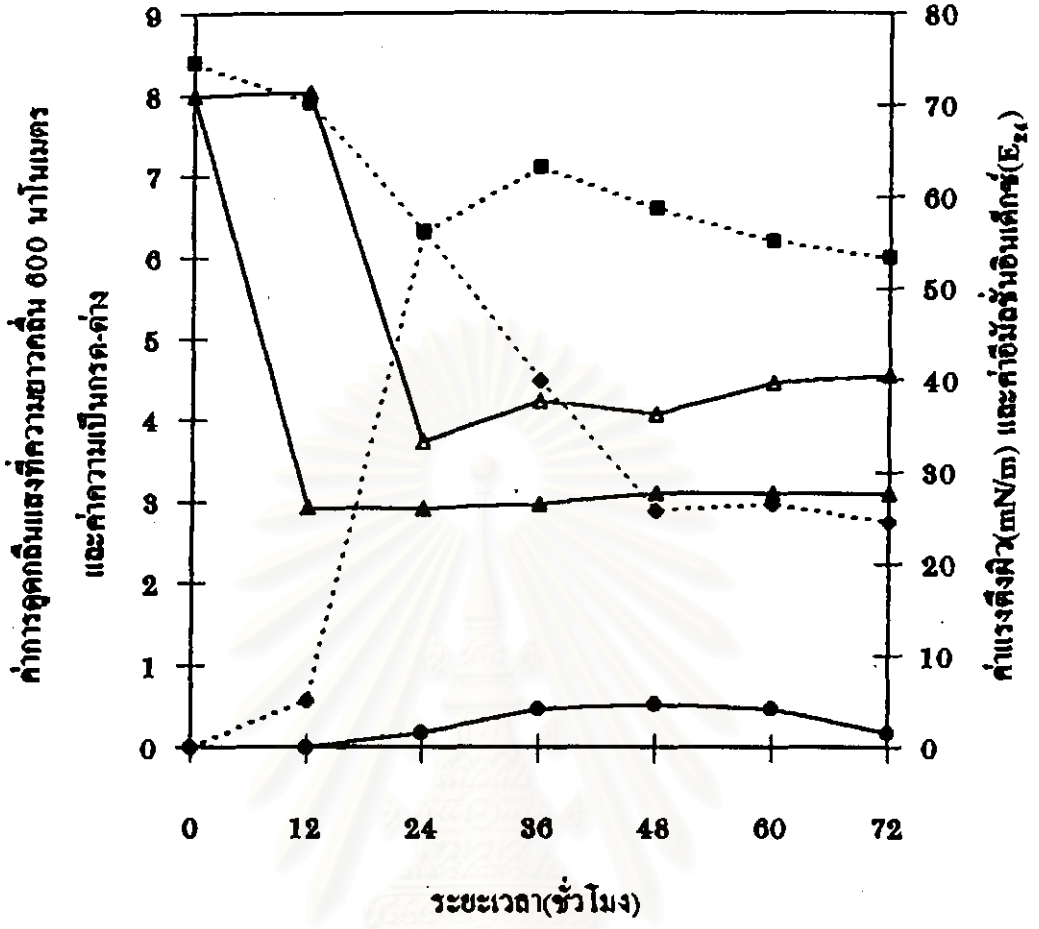
---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.14 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

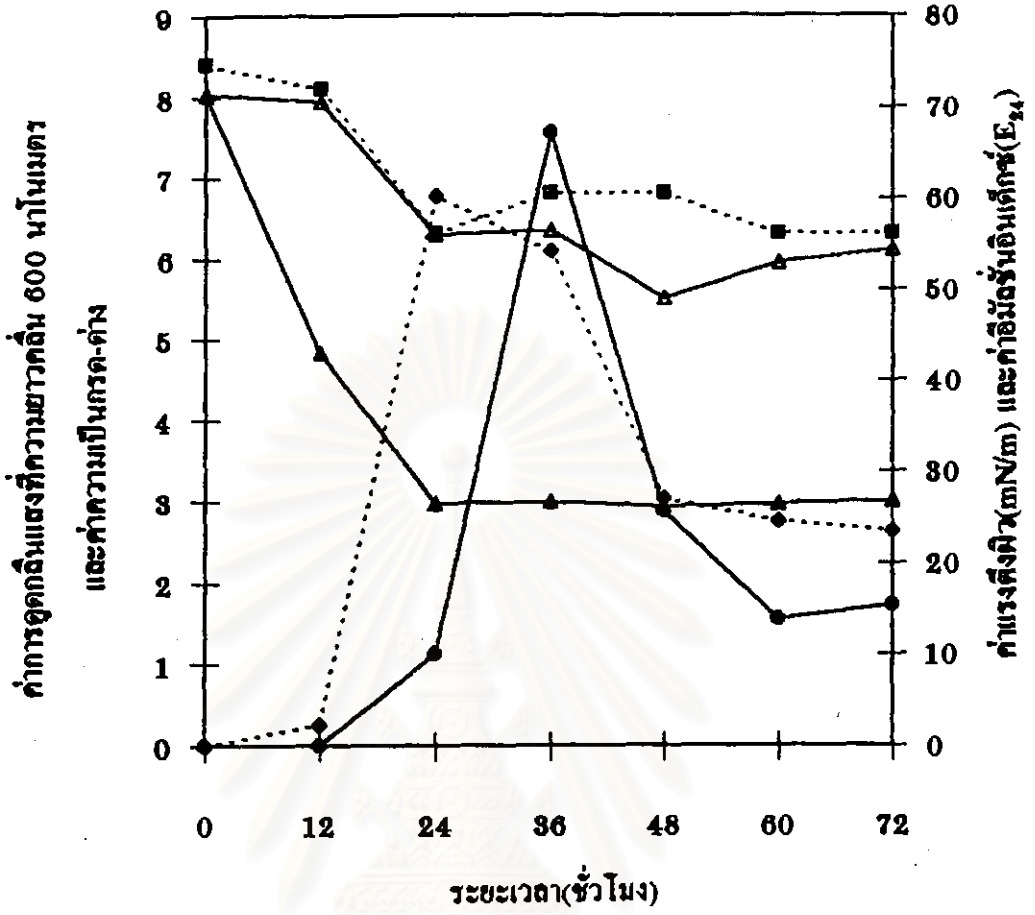
---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.15 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

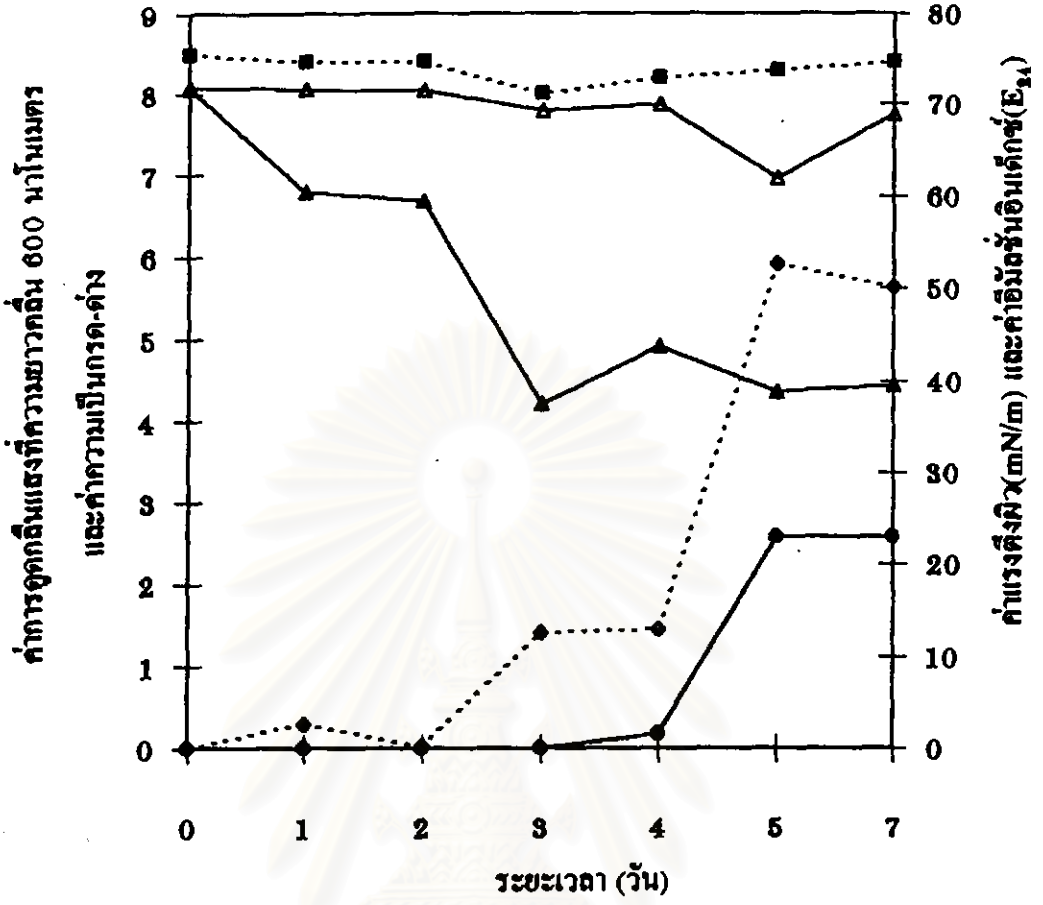
---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—●— หมายถึง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—▲— หมายถึง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.16 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า และค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้โซเดียมไนเตรท 4 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

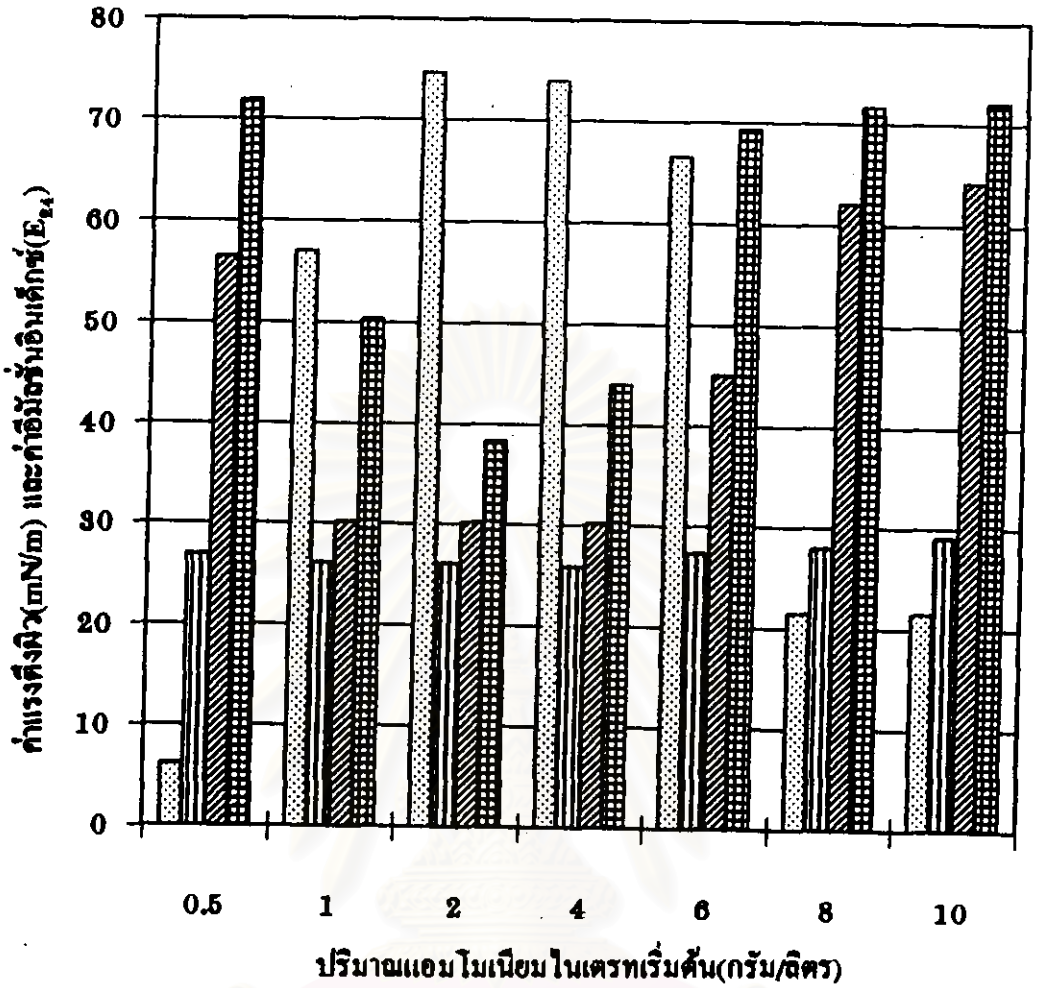
--●-- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

--■-- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.17 แสดงค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่าและ 20 เท่า ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ

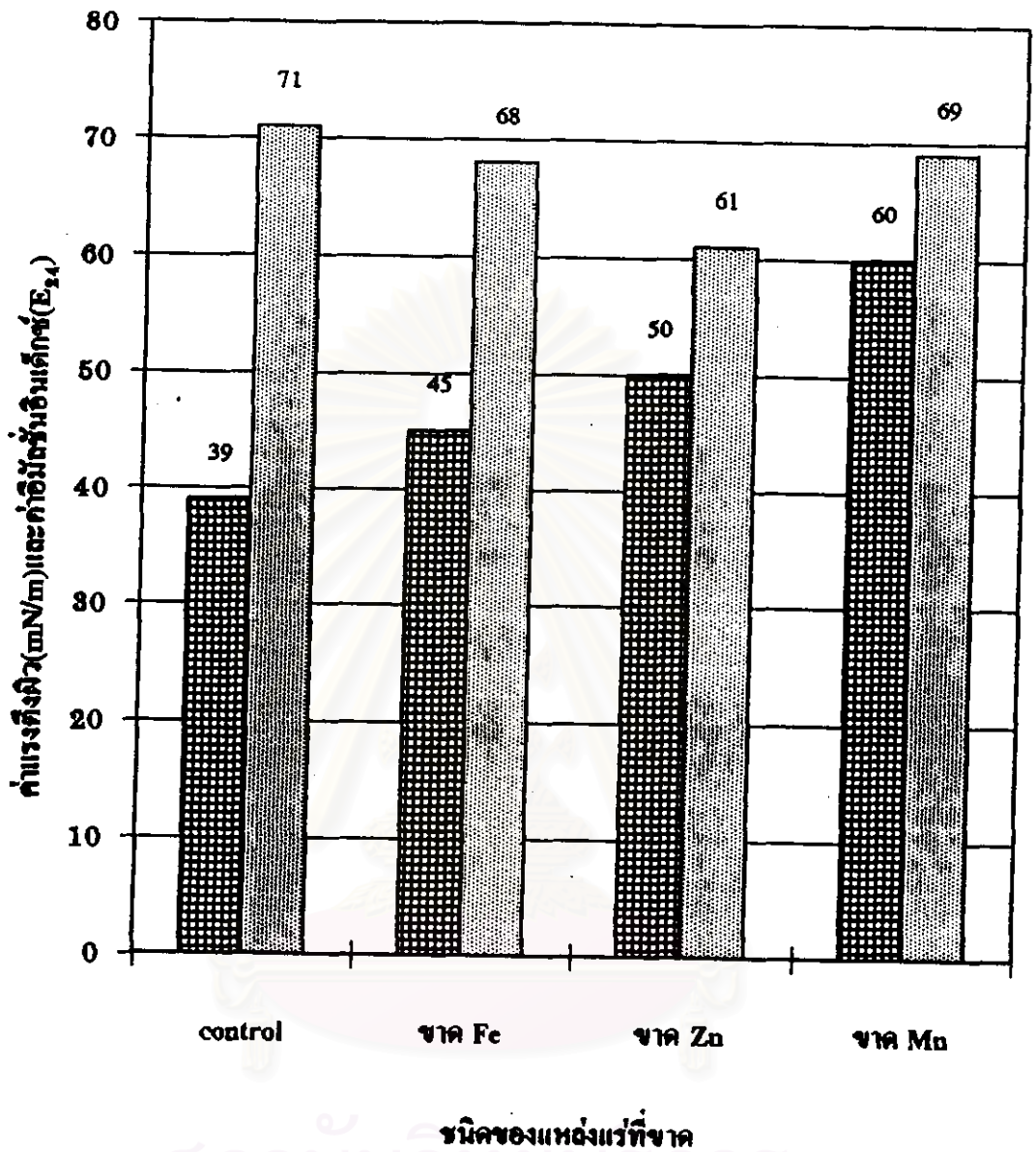
หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า

หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

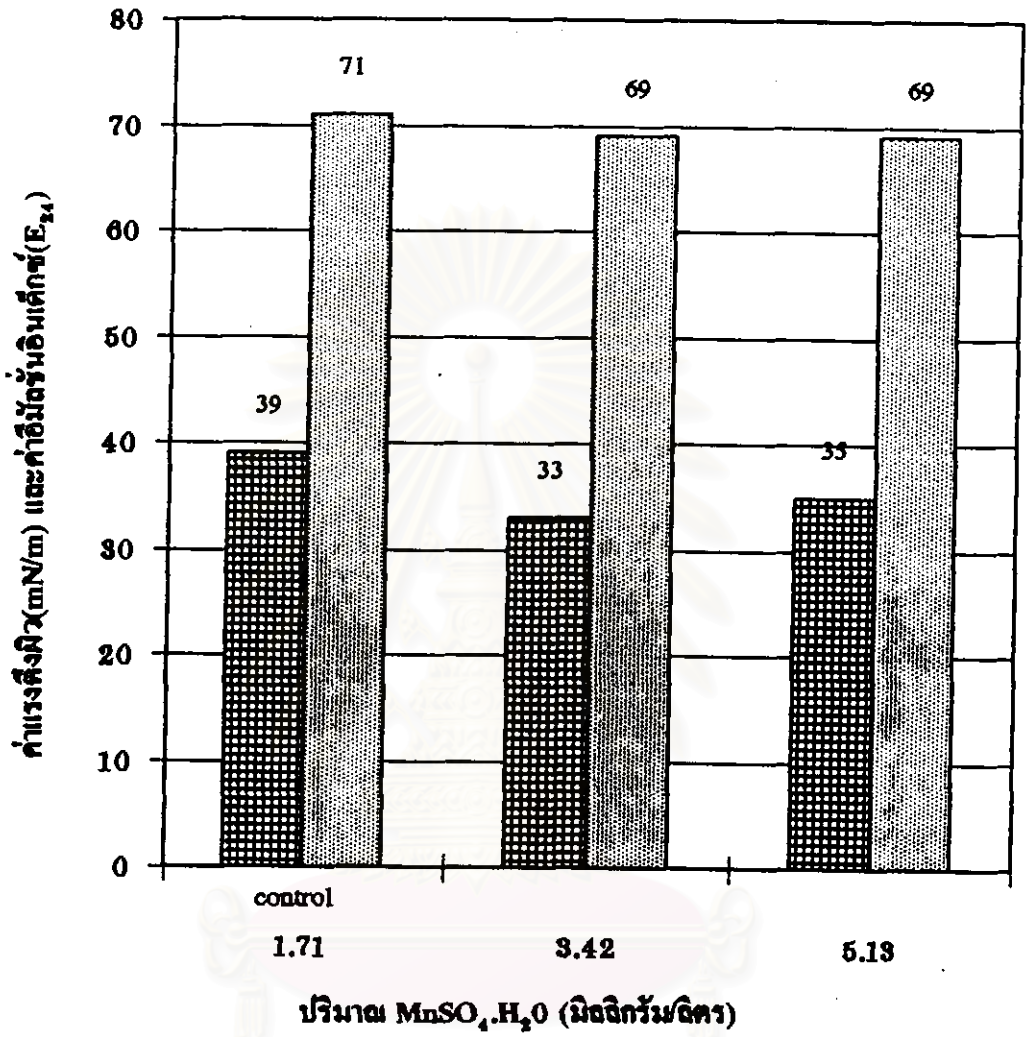
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.18 แสดงค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการแปรผันแหล่งแร่ปริมาณน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ

▩ หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า

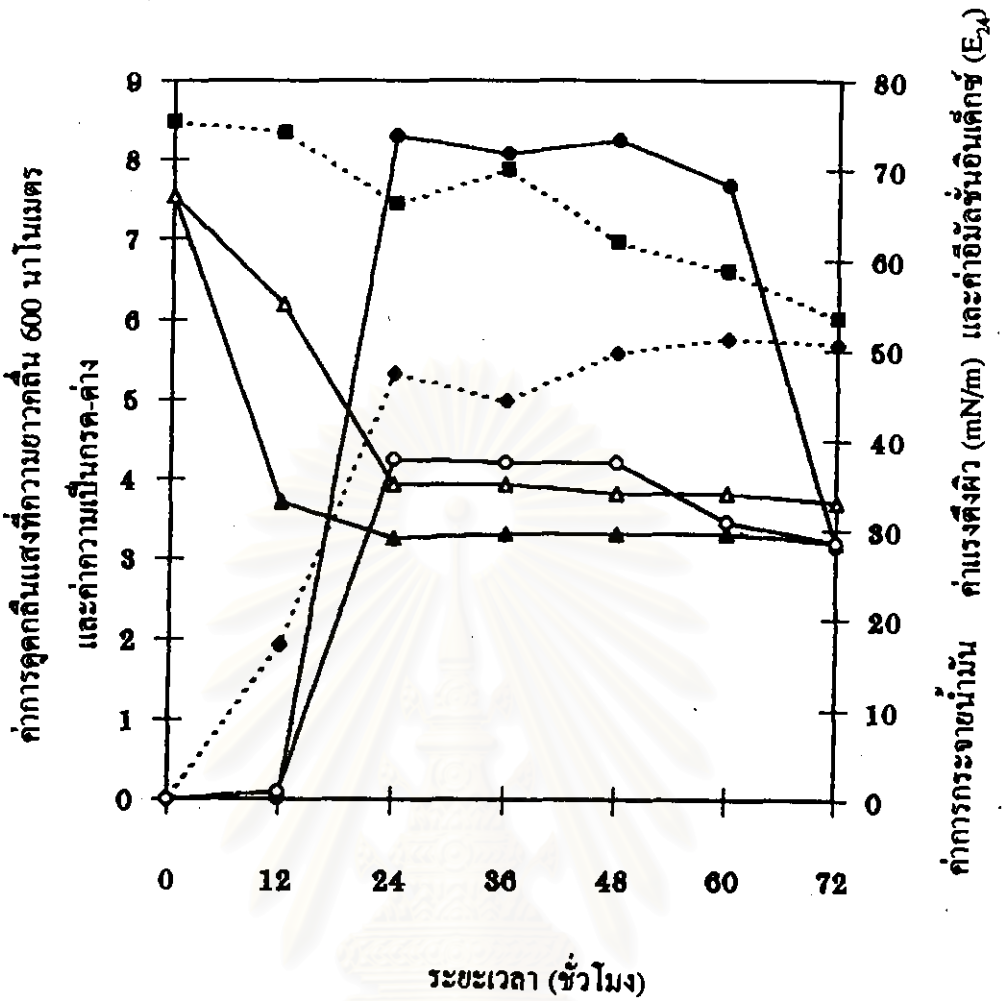
▩ หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.19 แสดงค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการแปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟต($MnSO_4.H_2O$) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1.71, 3.42 และ 5.13 มิลลิกรัม/ลิตร

▦ หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า

▨ หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 3.20 แสดงรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และค่าการกระจายน้ำมัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis 3/38* ในภาวะที่เหมาะสม

---●--- หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

---■--- หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—△— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า

—●— หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

—○— หมายถึง ค่าการกระจายน้ำมัน

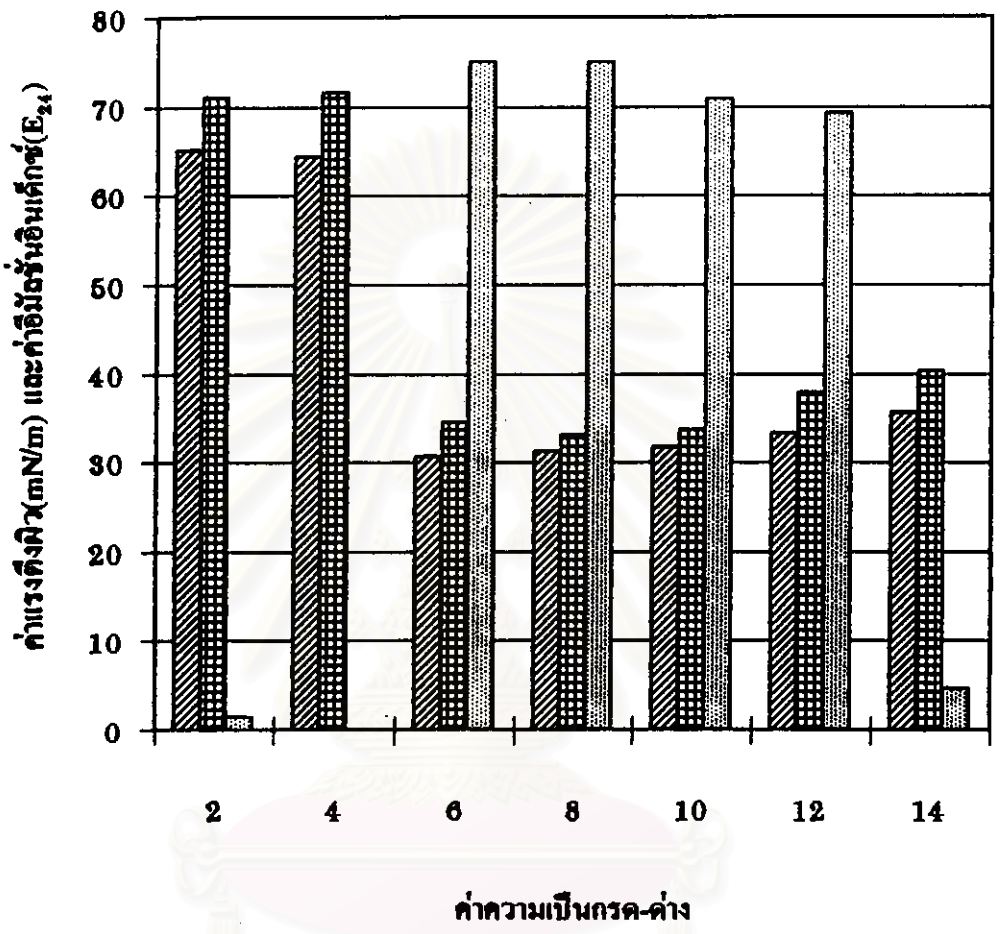
และวัดค่าแรงตึงผิวส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อซึ่งทำการเจือจาง 10 เท่า และ 20 เท่า จากรูปที่ 3.21 พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* 3/38 มีความเสถียรที่ค่าเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง คือ 6.0-12.0

3.4.2 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อทดลองเก็บสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกันได้แก่ อุณหภูมิ 0 °ซ, 4°ซ และอุณหภูมิห้อง ทำการติดตามผลโดยการวัดค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})และวัดค่าแรงตึงผิวส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 เท่า โดยประเมินผลทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 100 วัน พบว่าค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 0°ซ , 4°ซ และ ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°ซ) ในส่วนของค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ (E_{24})พบว่ามีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 0°ซ และ 4°ซ แต่ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°ซ) ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) จะเริ่มลดลงหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 80 วัน ผลการทดลองได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.22 และ 3.23 สำหรับการทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อุณหภูมิสูงได้ทำการบ่มส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 55°ซ, 80°ซ และ 100°ซ ทำการติดตามผลโดยวัดค่าการกระจายน้ำมัน วัดค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ และวัดค่าแรงตึงผิวส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 เท่า ทำการวัดผลทุกๆ 30 นาทีเป็นเวลา 240 นาที ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 55°ซ และ 80°ซ ค่าการกระจายน้ำมัน ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์ และความสามารถในการลดแรงตึงผิวยังคงเสถียรอยู่จนถึง 240 นาที ที่อุณหภูมิ 100°ซ ค่าแรงตึงผิว และค่าการกระจายน้ำมันยังคงเสถียรอยู่จนถึง 240 นาที แต่ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์จะลดลงเมื่อบ่มเป็นเวลานาน 180 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.24 ,3.25 และ 3.26

3.5 <u>การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการวัดค่าแรงตึงผิวของเครื่องวัดแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นกับเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน</u>

เปรียบเทียบการวัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายโซเดียมไดเดซิลซัลเฟต (SDS) ในน้ำกลั่นที่ทำการเจือจาง 10^{-1}, $10^{-1.5}$, 10^{-2}, $10^{-2.5}$, 10^{-3}, $10^{-3.5}$, 10^{-4}, $10^{-4.5}$, 10^{-5} โดยใช้เครื่องวัดค่าแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นวัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายเปรียบเทียบกับการวัดค่าแรงตึงผิวของสารละลายด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS พบว่า ได้ค่า cmc เท่ากันที่ค่าความเข้มข้น $10^{-2.5}$

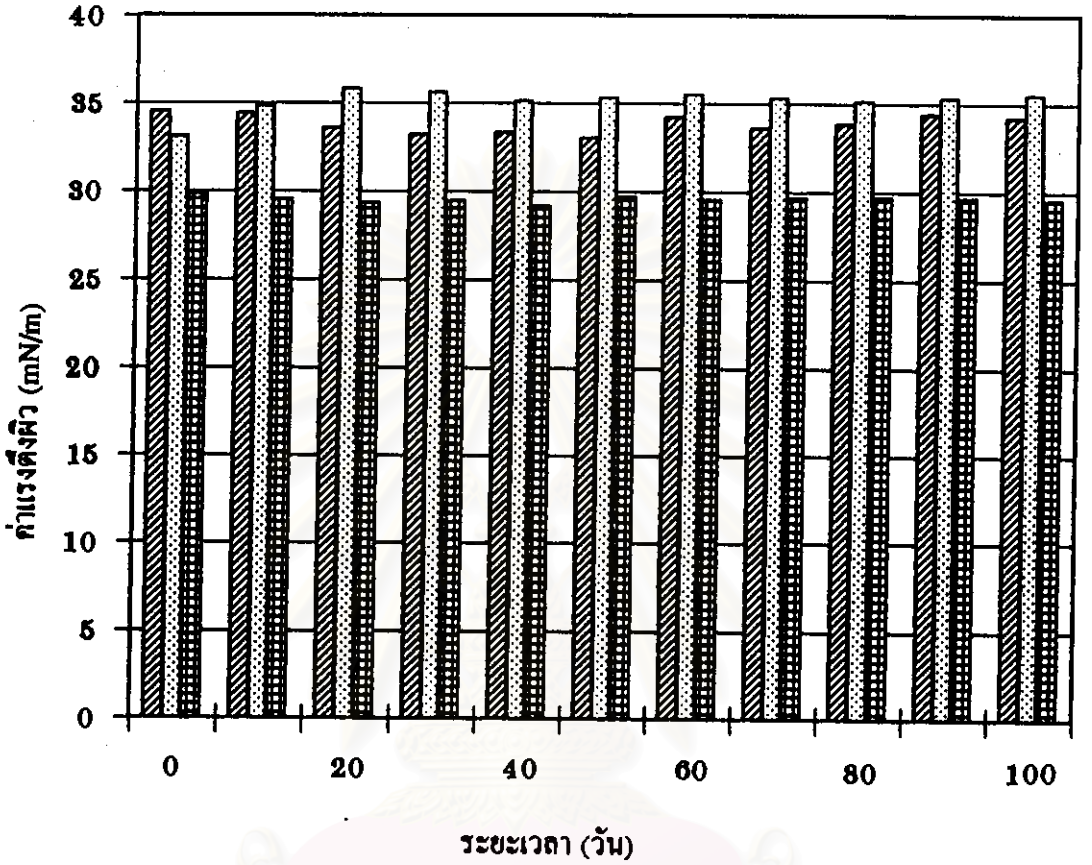


รูปที่ 3.21 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการ เจือจาง 10 เท่าและ 20 เท่า ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2, 4, 6, 8, 10, 12, และ14

▨ หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 10 เท่า

▦ หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 20 เท่า

▩ หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

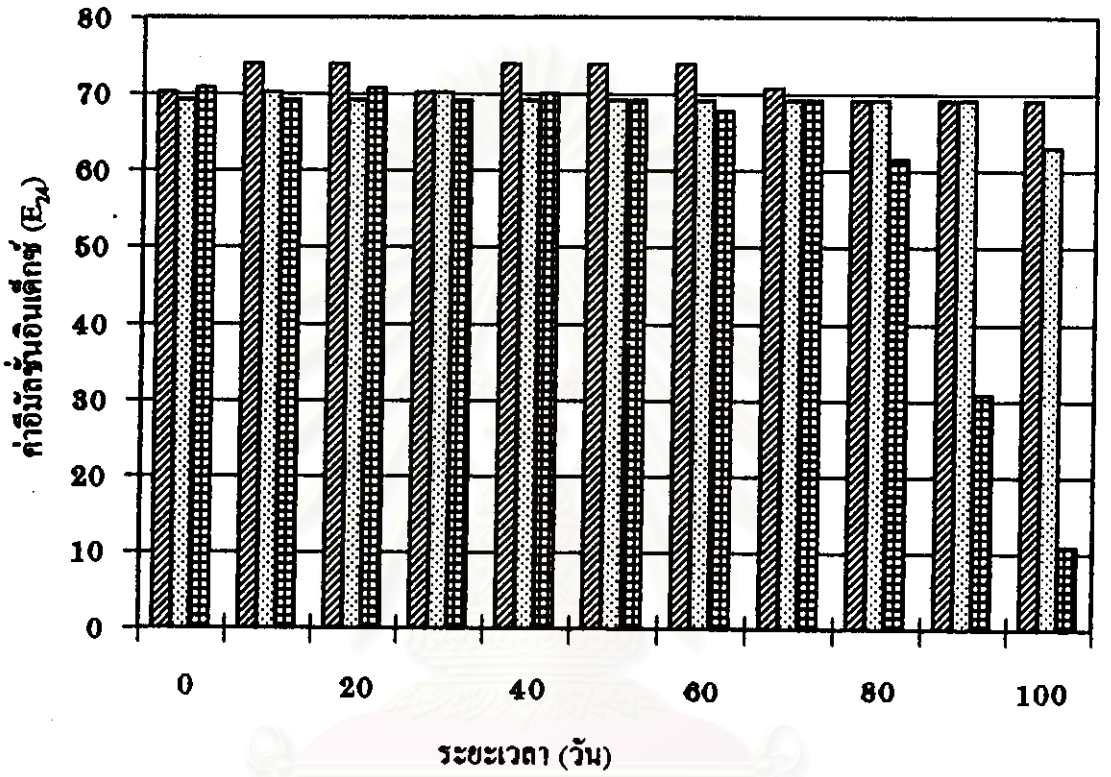


รูปที่ 3.22 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 0^0ซ, 4^0ซ และที่อุณหภูมิห้อง$(30\pm2)^0$ซ ทำการบันทึกผลทุก 10 วันเป็นเวลา 100 วัน

หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 20 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 0^0ซ

หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 20 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4^0ซ

หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 20 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง$(30+2)^0$ซ

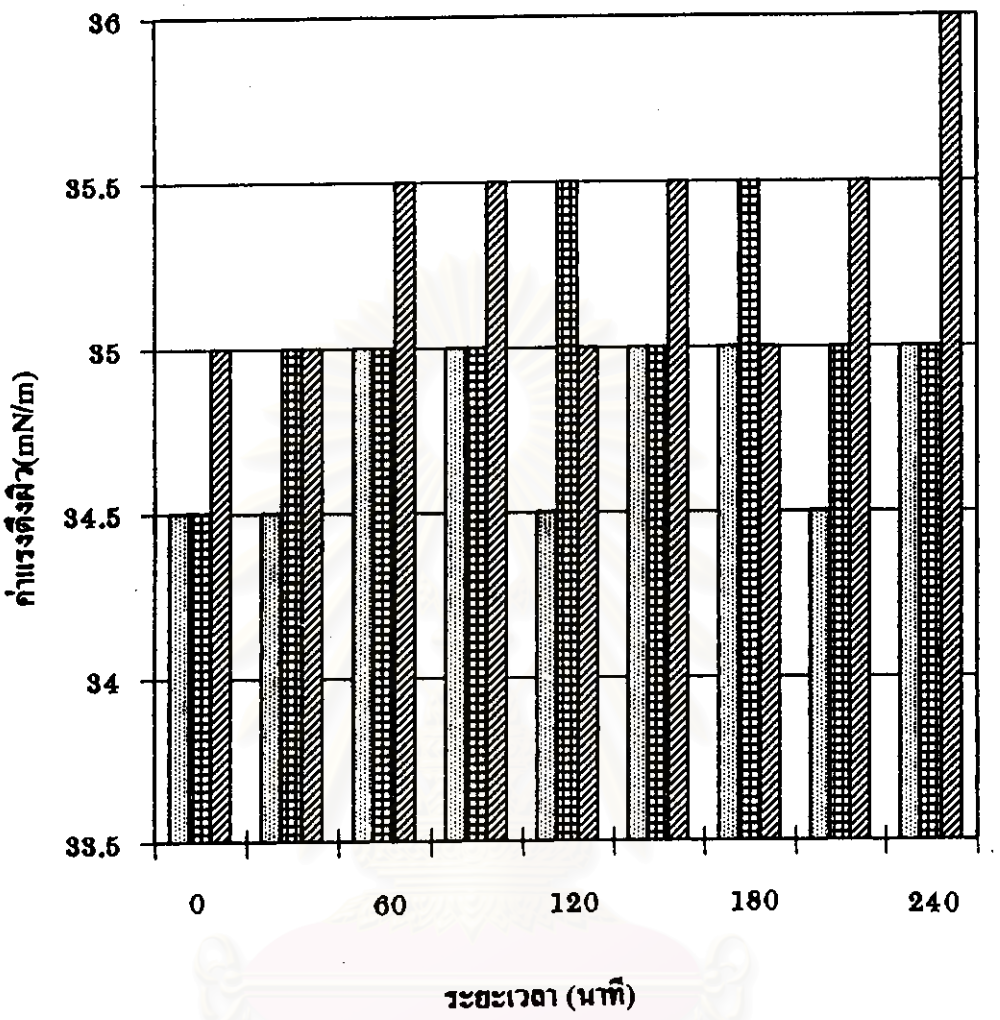


รูปที่ 3.23 แสดงผลของอุณหภูมิต่อค่าอิมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 0^{0}ซ, 4^{0}ซ และที่อุณหภูมิห้อง$(30+2)^{0}$ซ ทำการบันทึกผลทุก 10 วันเป็นเวลา 100 วัน

▧ หมายถึง ค่าอิมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 0^{0}ซ

▨ หมายถึง ค่าอิมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ

▦ หมายถึง ค่าอิมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24}) ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง$(30\pm2)^{0}$ซ

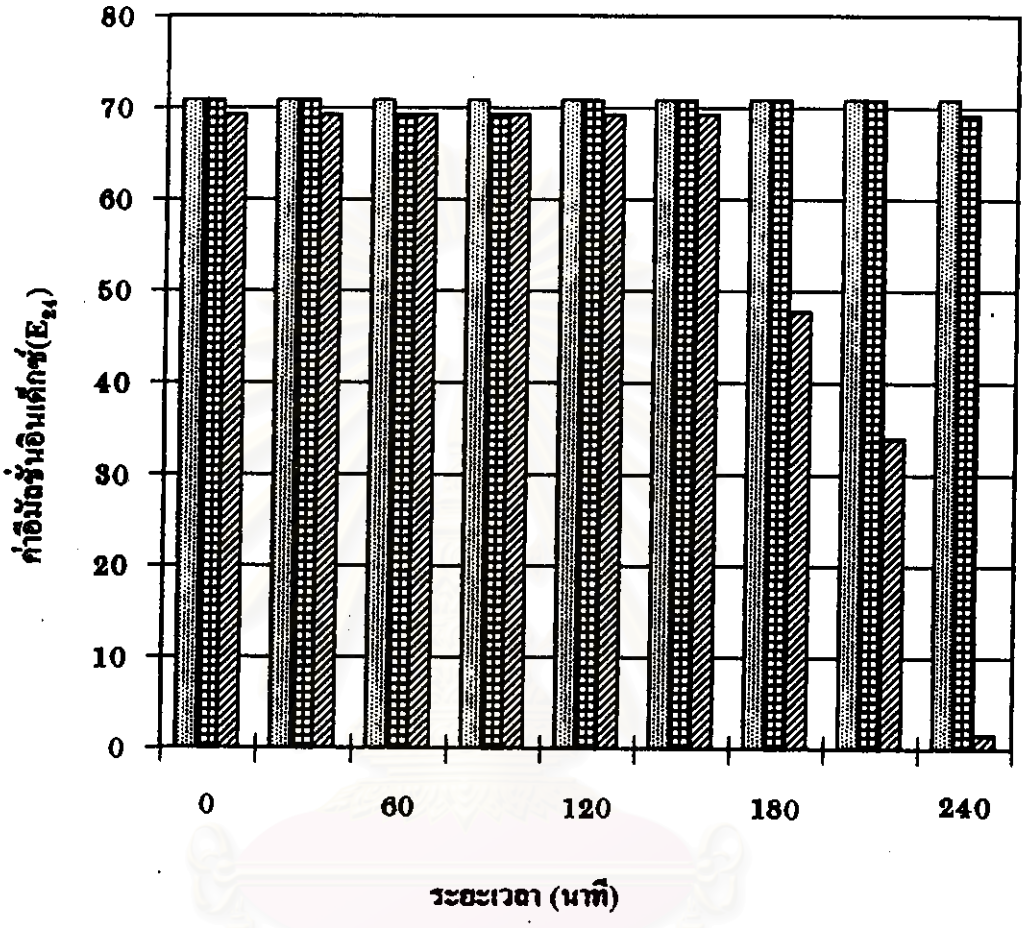


รูปที่ 3.24 แสดงผลของอุณหภูมิต่อค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55^{0}ซ 80^{0}ซ และ100^{0}ซ เป็นเวลา 240 นาที โดยทำการบันทึกผลทุก 30 นาที

หมายถึง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 20 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55^{0}ซ

หมายถึง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 20 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80^{0}ซ

หมายถึง ค่าแรงดึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง 20 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 100^{0}ซ

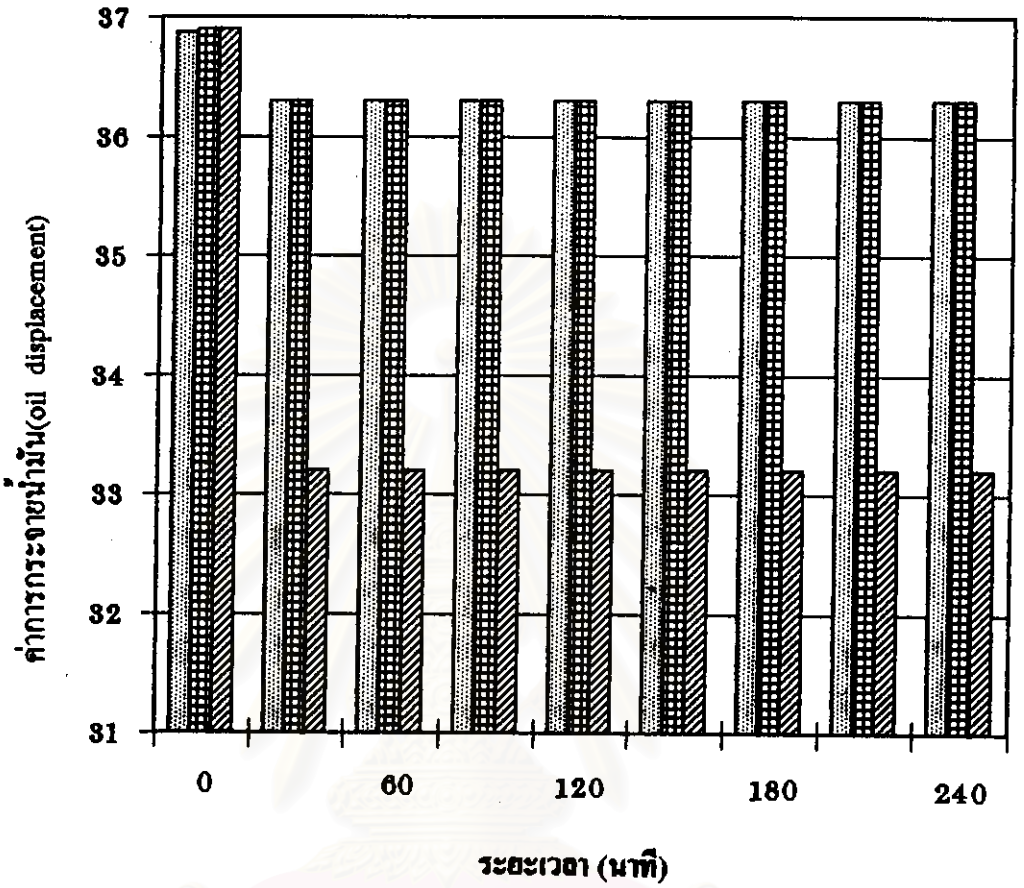


รูปที่ 3.25 แสดงผลของอุณหภูมิต่อค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55^0ซ, 80^0ซ และ100^0ซ เป็นเวลา 240 นาที โดยทำการบันทึกผลทุก 30 นาที

หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55^0ซ

หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80^0ซ

หมายถึง ค่าอีมัลชั่นอินเด็กซ์(E_{24})ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 100^0ซ



รูปที่ 3.26 แสดงผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการกระจายน้ำมันของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55^{0}ซ, 80^{0}ซ และ100^{0}ซ เป็นเวลา 240 นาที โดยทำการบันทึกผลทุก 30 นาที

หมายถึง ค่าการกระจายน้ำมันของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55^{0}ซ

หมายถึง ค่าการกระจายน้ำมันของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80^{0}ซ

หมายถึง ค่าการกระจายน้ำมันของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 100^{0}ซ

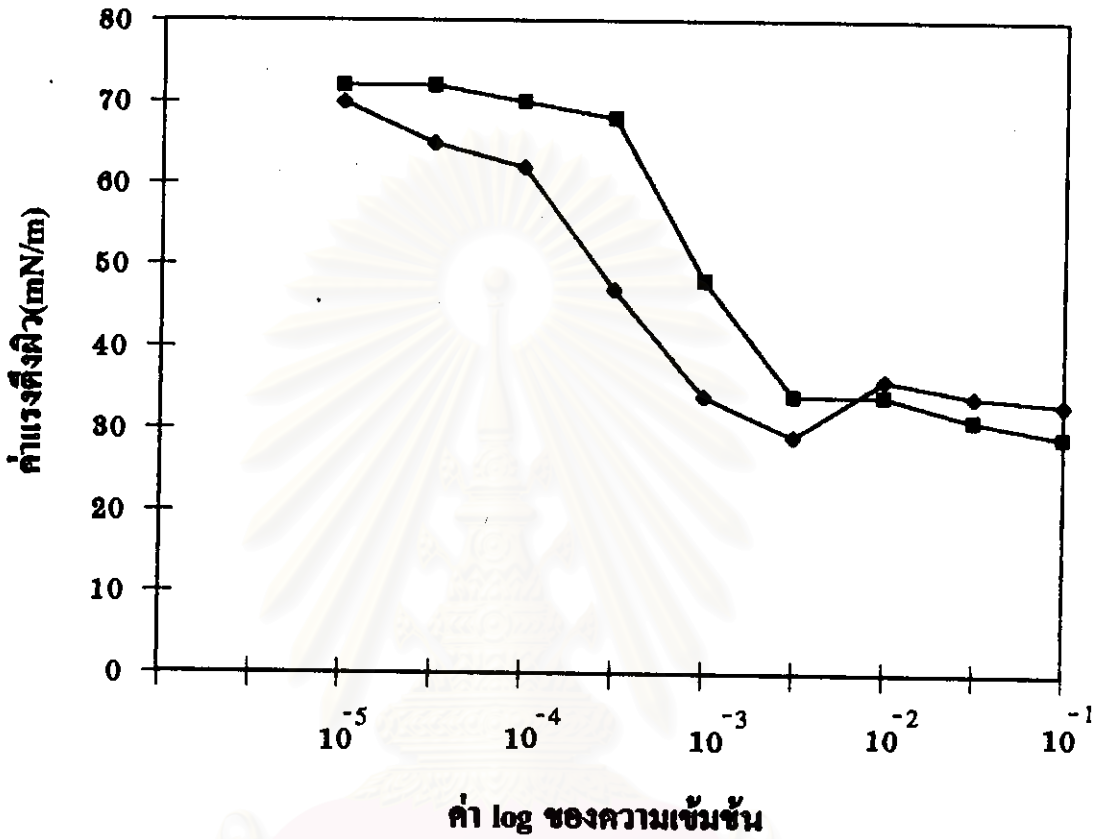
และเครื่องมือทั้งสองมีผลการวัดค่าแรงตึงผิวที่ใกล้เคียงกันมากเมื่อความเข้มข้นของสารละลายมีค่าเท่ากับหรือมากกว่าค่า cmc ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.27

จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 3/38 ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้วในสภาวะที่เหมาะสม นำส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาทำการเจือจาง แล้ววัดค่าแรงตึงผิว โดยทำการเจือจาง 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 เท่าแล้ววัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นเอง เปรียบเทียบกับเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน พบว่า ที่ค่าความเจือจาง 10 เท่า ผลของการวัดค่าแรงตึงผิวมีค่าเท่ากัน และที่ค่าความเจือจาง 20 เท่า ยังคงให้ผลการวัดค่าแรงตึงผิวที่ใกล้เคียงกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.28

3.6 <u>การศึกษาจุดวิกฤตของการเจือจางไมเซลล์ (critical micelle dilution, CMD)</u>

จากการศึกษาหาจุดวิกฤตของการเจือจางไมเซลล์ (CMD) ทำโดยนำส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมมาทำการเจือจาง 10 เท่า 100 เท่า 1,000 เท่า และ 10,000 เท่า วัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นเอง เปรียบเทียบกับเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน พบว่า จุดวิกฤตของการเจือจางส่วนใสของอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมที่วัดได้จากทั้งสองเครื่องมีค่าเท่ากัน คือ ที่การเจือจาง 10 เท่า ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.29

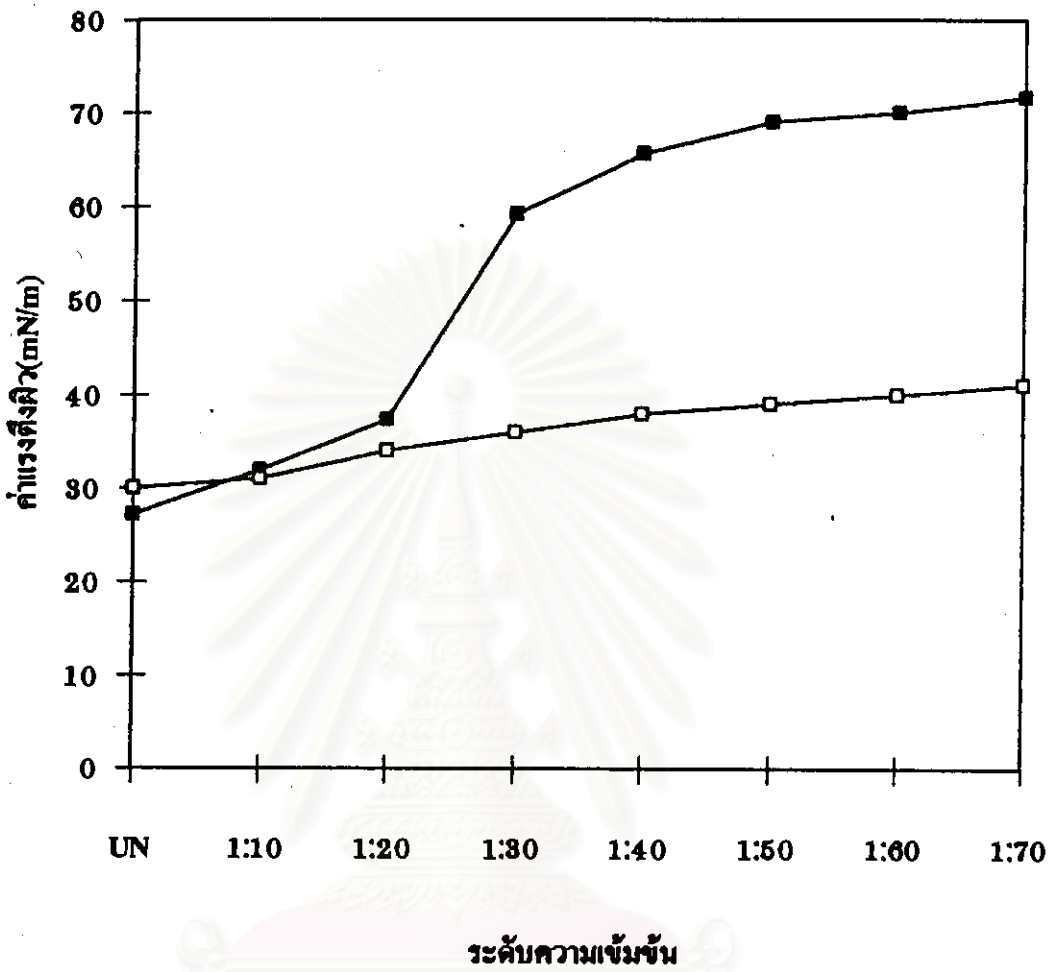
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.27 เปรียบเทียบผลของการวัดค่าแรงดึงผิวด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นเองกับเครื่องวัดแรงดึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS โดยทำการวัดค่าแรงดึงผิวของสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่ทำการเจือจาง 10^{-1}, $10^{-1.5}$, 10^{-2}, $10^{-2.5}$, 10^{-3}, $10^{-3.5}$, 10^{-4}, $10^{-4.5}$, 10^{-5} ตามลำดับ

—◆— หมายถึง ค่าแรงดึงผิวที่วัดด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นเอง

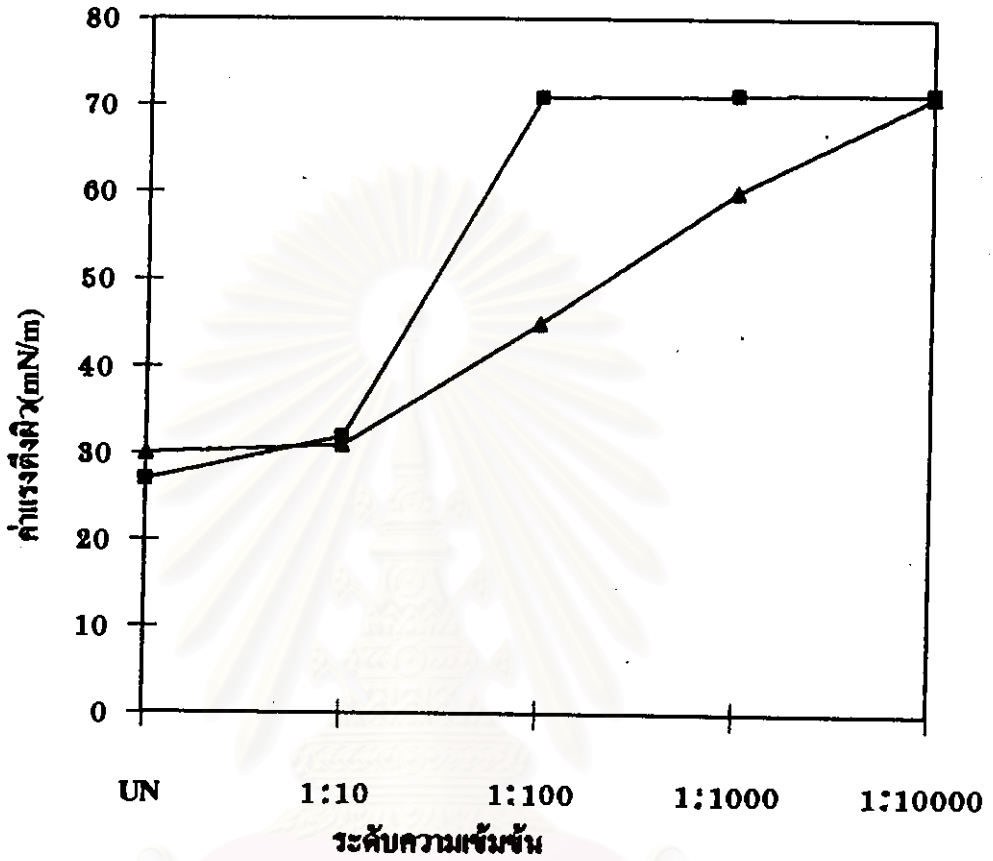
—■— หมายถึง ค่าแรงดึงผิวที่วัดด้วยเครื่องวัดแรงดึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน



รูปที่ 3.28 เปรียบเทียบผลของการวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นเองกับเครื่องวัดแรง-ตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS โดยทำการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อและวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ทำการเจือจาง 10, 20, 30, 40, 50, 60, และ 70 เท่าตามลำดับ

—■— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวที่วัดด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นเอง

—□— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวที่วัดด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน



รูปที่ 3.29 เปรียบเทียบผลของการหาค่า critical micelle dilution โดยใช้เครื่องวัดแรงตึงผิวที่สร้างขึ้นเองเปรียบเทียบกับเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS โดยทำการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อและวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ทำการเจือจาง 10, 100, 1000, และ 10000 เท่าตามลำดับ

—■— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวที่วัดด้วยเครื่องมือที่สร้างขึ้นเอง

—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวที่วัดด้วยเครื่องวัดแรงตึงผิวรุ่น K6 ของบริษัท KRUSS ประเทศเยอรมัน