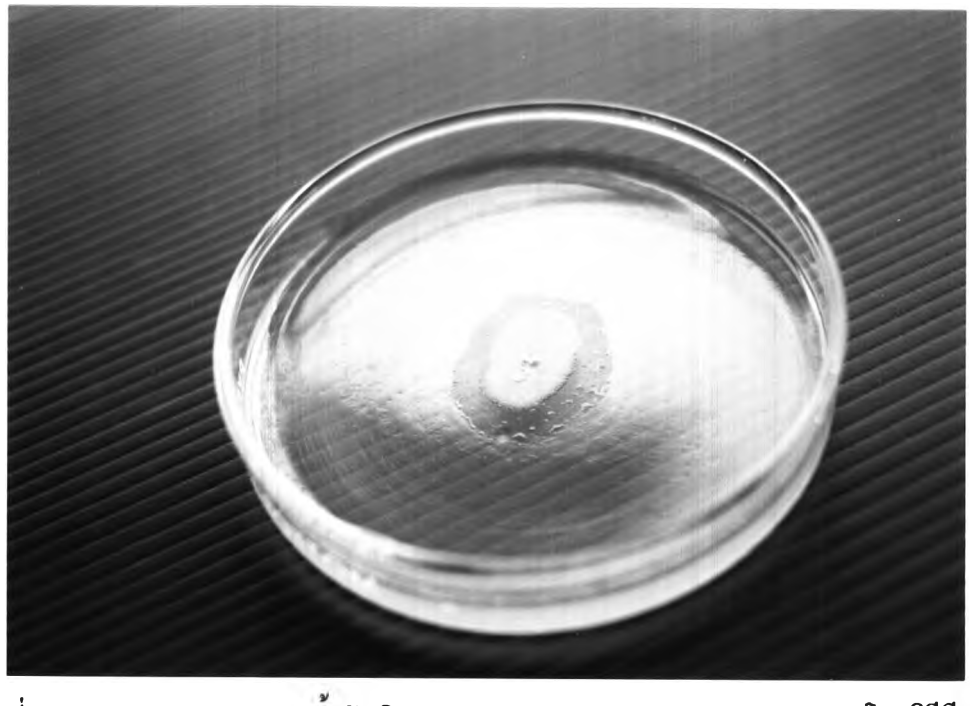
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3. 1 <u>การศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2. 2</u>

3.1.1 ความสามารถในการกระจายน้ำมันดิบของ *Bacillus licheniformis* F2. 2 บนอาหารแข็งแอลบี

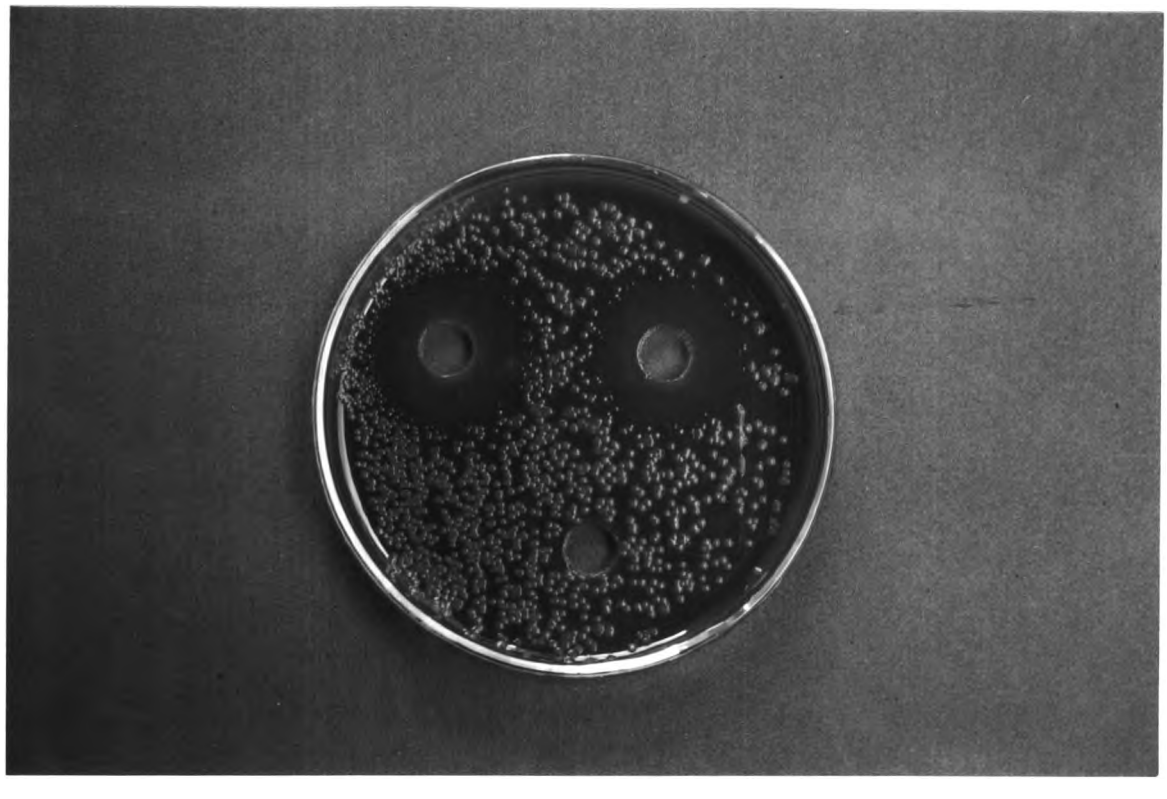
จากการทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมันดิบของ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2. 2 โดยการขีดเชื้อลงบนอาหารแข็งแอลบีที่มีน้ำมันดิบ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ราดทับปกคลุมผิวหน้าของอาหารอย่างสม่ำเสมอ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus licheniformis* F2. 2 จะปล่อยสารที่สามารถกระจายน้ำมันดิบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงการกระจายน้ำมันดิบของ *Bacillus licheniformis* F2. 2 โดยวิธีขีดเชื้อลงบนอาหารแข็งที่มีน้ำมันดิบปกคลุมอยู่ และบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.1.2 ความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบกลุ่มต่าง ๆ โดย *Bacillus licheniformis* F2. 2

จากการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มต่าง ๆ ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ของ *Bacillus licheniformis* F2. 2 โดยวิธี agar diffusion ตามวิธีข้อ 2.3.2 ตรวจดูบริเวณที่ยับยั้งที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ พบว่า *Bacillus licheniformis* F2. 2 จะให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โดยจะให้ผลที่ดีมากในการฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ และให้ผลดีในการฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มรา สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียจะสามารถฆ่าแบคทีเรียได้บางสายพันธุ์ โดยไม่มีความจำกัดต่อชนิดแกรมบวก หรือลบ ดังแสดงในตารางที่ 5 ในขณะที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 แสดงการยับยั้งของ *Bacillus licheniformis* F2. 2 ต่อ *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบ โดยวิธี agar diffusion เมื่อบ่มเชื้อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 แสดงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบกลุ่มต่างๆ ของ *Bacillus licheniformis* F2. 2

เชื้อทดสอบ	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	
	48	72
กลุ่มยีสต์		
Torulopsis glabrata	+++	+++
Saccharomyces cerevisiae	+++	+++
Candida albicans	+++	+++
Hansenula anomata	++	++
Pichia kluyveri	+	+
กลุ่มแบคทีเรีย		
Pseudomonas aeruginosa	++	++
Bacillus licheniformis F2. 2	++	++
Bacillus subtilis 3/38	+++	+++
Escherichia coli	++	++
Micrococcus luteus	–	–
กลุ่มรา		
Aspergillus niger	++	++
Fusarium sp.	++	++
Pennicillium sp.	++	++
Cladosporium sp.	+++	+++

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

3. 2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* F2. 2 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

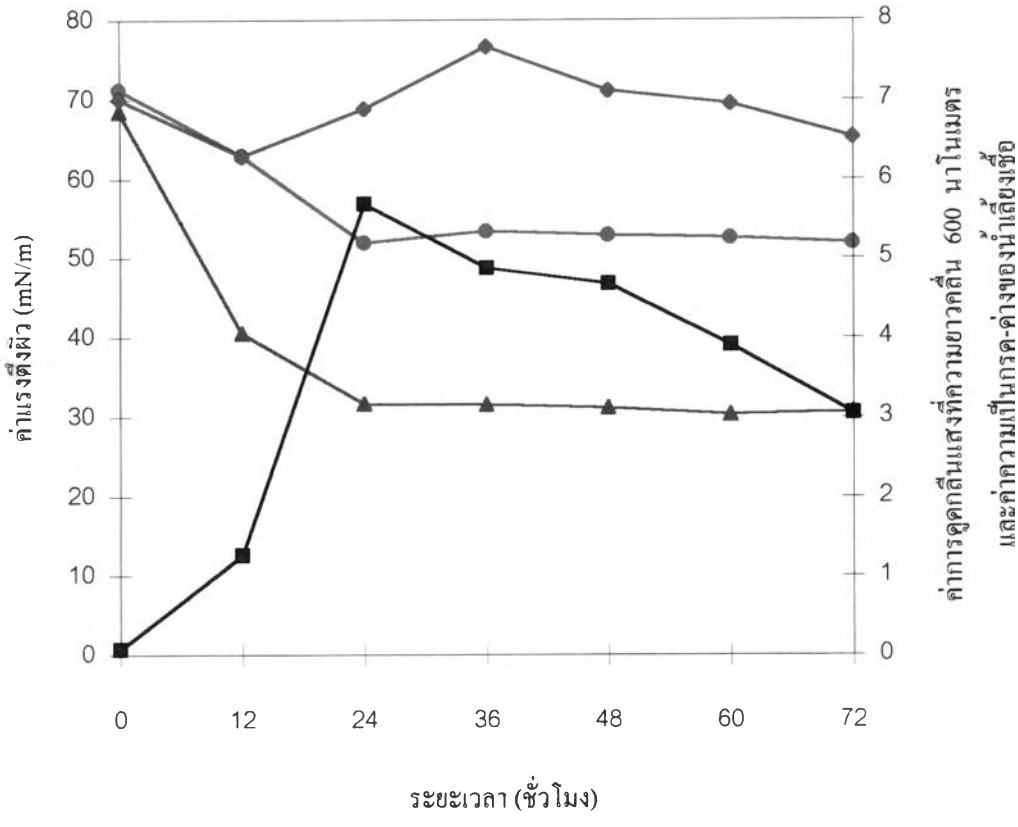
3. 2 .1 การติดตามกราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2. 2 ที่เวลาต่าง ๆ

จากการติดตามการเจริญของเชื้อ *Bacillus licheniformis* F2. 2 ที่เวลาต่าง ๆ โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร ตามภาคผนวก ก หมายเลข 9 ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที พบว่าเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะเอ็กโพเนนเชียล ในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นจะเข้าสู่ระยะพัก (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 24 รูปที่ 24 สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 12 ค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีค่าสูงขึ้นและสูงสุด ในชั่วโมงที่ 36 ในขณะที่ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง เริ่มมีค่าลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และต่ำสุดเท่ากับ 31.6 มิลลินิวตัน ต่อเมตร ที่ชั่วโมงที่ 24 เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ มาทำการเจือจาง 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่น แล้ววัดค่าแรงตึงผิวทุก 12 ชั่วโมง พบว่า มีค่าแรงตึงผิวอยู่ระหว่าง 51.9-53.4 มิลลินิวตัน ต่อเมตร ดังแสดงในรูปที่ 24

3. 2. 2 ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการ ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *Bacillus licheniformis* F2. 2

3.2. 2.1 การแปรความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกรดหรือด่าง

เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วง 4.0-9.0 ด้วยการเติมกรดหรือด่าง (1.0 นอร์มอล HCl และ NaOH) พบว่าระดับความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นที่เหมาะสม ต่อการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อยู่ในช่วง pH 7.0-9.0 โดยในช่วง pH นี้ ค่าแรงตึงผิวมีค่าอยู่ระหว่าง 29.9 - 30.8 มิลลินิวตัน/เมตร เมื่อเจือจางส่วนน้ำใส ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 เท่าด้วยน้ำกลั่น แล้ววัดค่าแรงตึงผิว พบว่าจะอยู่ในช่วง 43.8- 50.9 มิลลินิวตัน/เมตร โดยค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 8.0 ให้การผลิตดีที่สุด เนื่องจากส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจืองจาง 100 เท่า ลดแรงตึงผิวได้ต่ำที่สุด

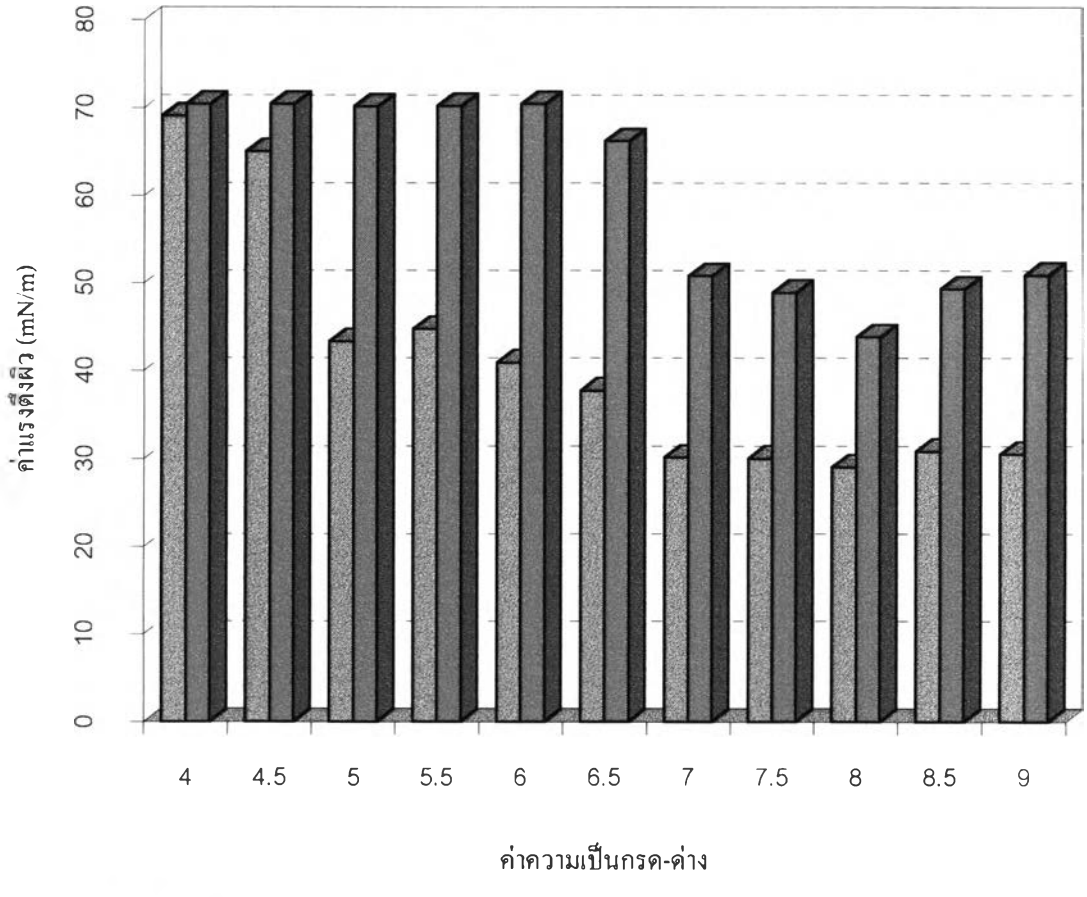


รูปที่ 24 แสดงรูปแบบการเจริญ,การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า ของ *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร ตามภาคผนวก ก หมายเลข 9 ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 7.0 ในขวดแก้วทรงกรวย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที

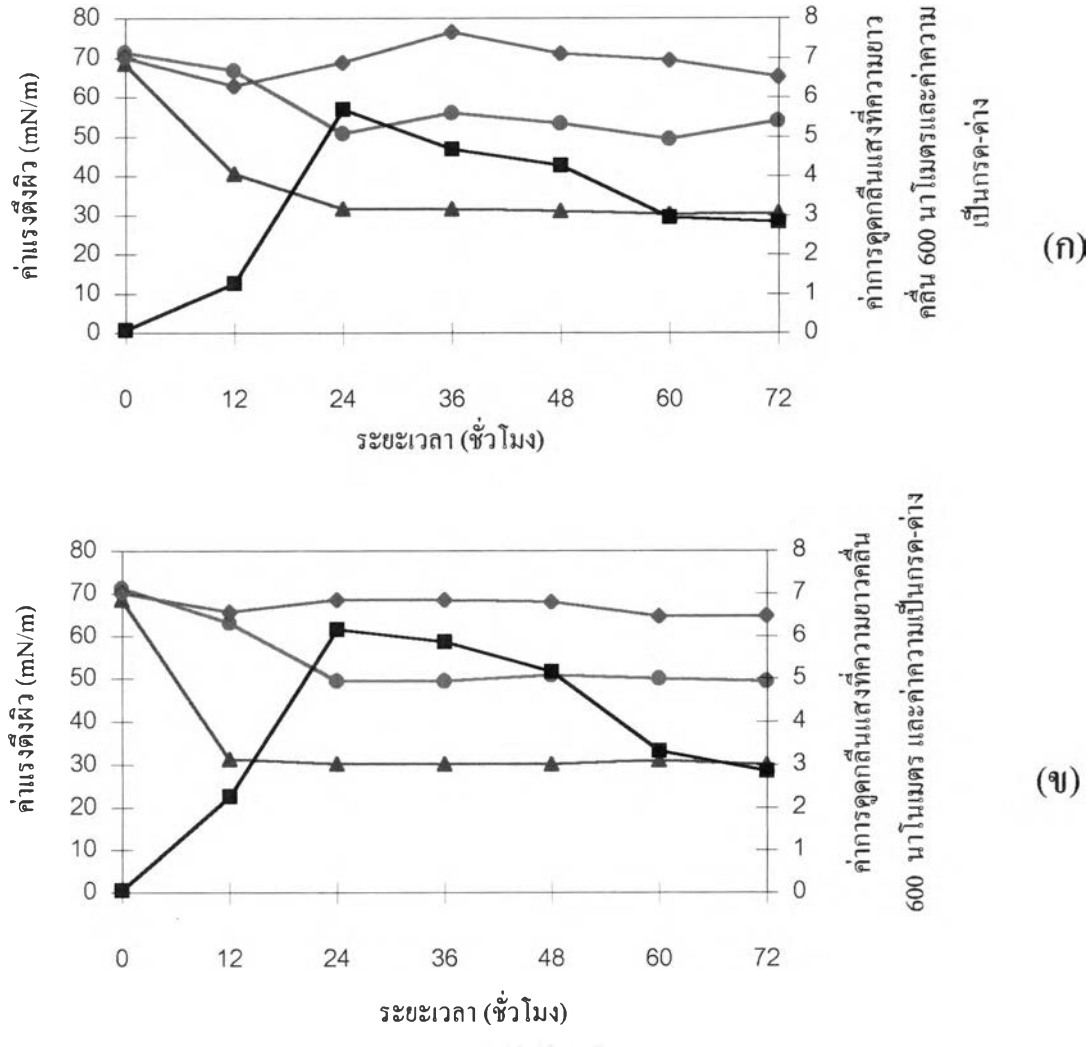
ความสามารถในการลดแรงตึงผิว ของน้ำเลี้ยงเชื้อ จะลดลงอย่างมาก เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลดจาก 7.0 เป็น 6.0 และเมื่อพิจารณาค่าแรงตึงผิวของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ทำการเจือจางที่ pH 6.0-5.0 มีค่าอยู่ระหว่าง 40.9-44.7 มิลลินิวตัน/เมตร แสดงว่าช่วง pH นี้ มีการผลิตสารลดแรงตึงผิวอยู่บ้าง เพียงเล็กน้อย เนื่องจากเมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า พบว่าส่วนน้ำใสจะหมดความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ในขณะที่ pH 4.5-4.0 จะไม่มีการผลิตสารลดแรงตึงผิว ดังนั้น เมื่อทำการวัดค่าแรงตึงผิว ของส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อจึงไม่สามารถลดค่าแรงตึงผิวได้เลย ทั้งส่วนน้ำใสที่ไม่ได้ทำการเจือจาง และที่ทำการเจือจาง 100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 25

3. 2. 2.2 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้บัฟเฟอร์

เมื่อทำการทดลองปรับ ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้น ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7 ด้วยกรดหรือด่าง ดังรูปที่ 26 (ก) พบว่า ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ จะลดต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 31.6 มิลลินิวตัน/เมตร เมื่อทำการเจือจางส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ 100 เท่า ทำการวัดค่าแรงตึงผิว พบว่าจะมีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 49.5-56.0 มิลลินิวตัน/เมตร ค่าความเป็นกรด- ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 6.2 - 7.7 เนื่องจากการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นด้วยกรด-ด่างนั้น ยากต่อการรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างให้คงที่ได้ จึงทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวควบคุม ให้อยู่ที่ 7.0 ทำการทดสอบค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใส ทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่าค่าแรงตึงผิวลดลงต่ำสุด ในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 30.1 มิลลินิวตัน/เมตร และมีค่าคงที่ตลอดการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 26 (ข) เมื่อทำการเจือจางส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ 100 เท่า ทำการวัดค่าแรงตึงผิว พบว่าจะมีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 49.4 - 50.8 มิลลินิวตัน/เมตร ค่าความเป็นกรด- ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองอยู่ในช่วง 6.4 - 6.9 เปรียบเทียบวิธีการปรับค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธีการเติมกรด หรือ ด่าง กับการปรับค่าความเป็นกรด - ด่างด้วยบัฟเฟอร์ พบว่าวิธีการปรับค่าความเป็นกรด - ด่างด้วยบัฟเฟอร์ให้ผลการทดลองที่ดีกว่า และสามารถควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างได้ดี



รูปที่ 25 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *B. licheniformis F2.2* เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่กำหนดสูตร ตามภาคผนวก ก หมายเลข 9 ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 4.0-9.0 โดยเพิ่มทีละ 0.5 ในขวดแก้วทรงกรวย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที วิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวตามวิธีการในข้อ 2.9



รูปที่ 26 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, การเจริญของเชื้อ, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกำหนดสูตร ตามภาคผนวก ก หมายเลข 9 ในขวดแก้วทรงกรวย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการเขย่า 200 รอบ/นาที วิเคราะห์ความสามารถในการลดแรงตึงผิว ตามวิธีการในข้อ 2.9 (ก) เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 7.0 ด้วยกรดหรือด่าง (ข) ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 7.0 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3. 2 .2. 3 การหาค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *Bacillus licheniformis* F2. 2

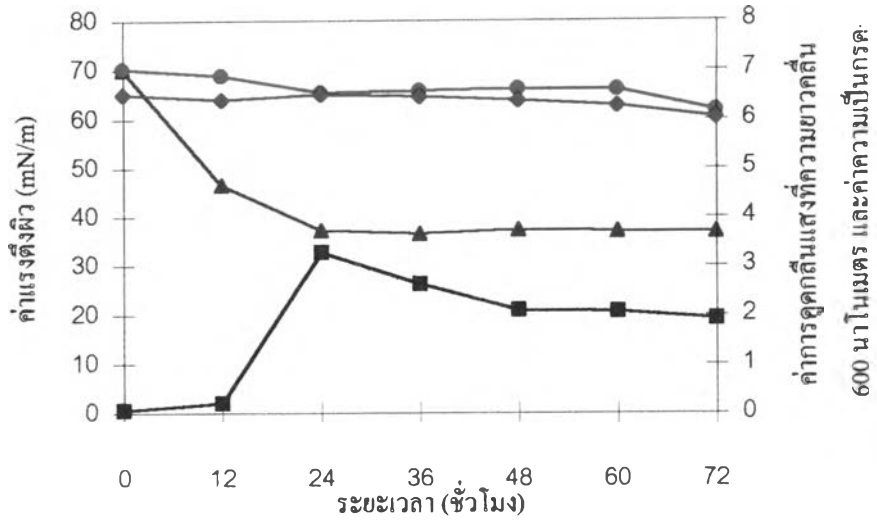
จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรระดับความเป็นกรด - ด่าง ของบัฟเฟอร์ ในช่วง 6.5 - 9.0 โดยค่าความเป็นกรด - ด่าง 6.5 - 8.0 ใช้ 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวควบคุม ส่วนค่าความเป็นกรด - ด่าง 8.5 - 9.0 ใช้ 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ เป็น บัฟเฟอร์ พบว่าที่ค่าความเป็นกรด - ด่าง 8.0 เหมาะสมที่สุด ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จาก *Bacillus licheniformis* F2. 2 โดยค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 29 มิลลินิวตัน/เมตร เมื่อทำการเจือจางส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 42.8 มิลลินิวตัน/เมตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 27. 1 - 27. 3 และตารางที่ 6 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 ในการเพาะเลี้ยง

3. 2. 2.4 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

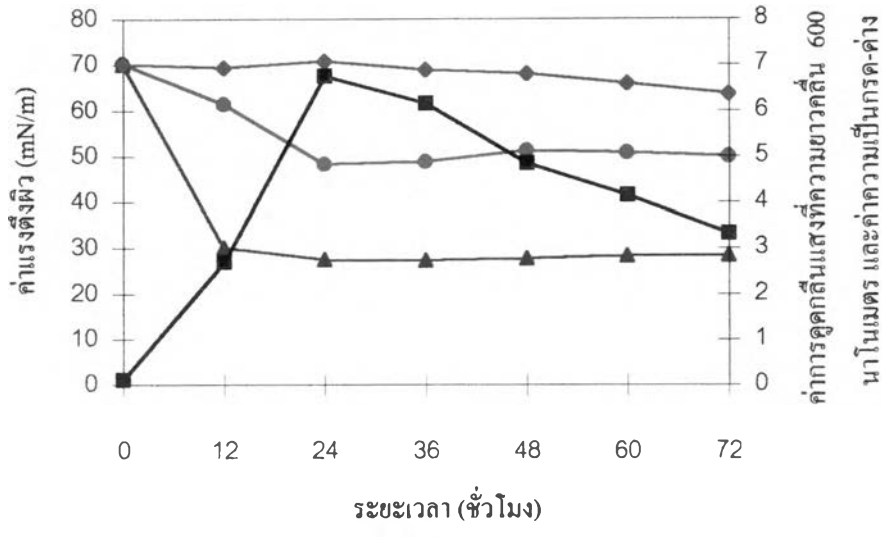
จากการทดลองที่ผ่านมา ใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ เป็น 100 มิลลิโม - ลาร์ เป็นค่าที่เลือกสุ่มขึ้นมา ซึ่งอาจไม่ใช่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ที่เหมาะสม โดยแปรปริมาณตั้งแต่ 25 - 200 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 28 พบว่าที่ความเข้มข้น 75, 100 และ 125 มิลลิโมลาร์ ให้ผลการลดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่น มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นด้วยเหตุผลทางความประหยัด จึงเลือกความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ 75 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. 2. 2.5 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่กำหนดสูตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ อุณหภูมิในช่วง 20 - 45^{0}ซ เมื่อทำการวัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ทำการเจือจาง 100 เท่า พบว่าที่ อุณหภูมิ 30^{0}ซ อุณหภูมิห้อง ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน โดยที่ อุณหภูมิ



(ก)



(ข)

—▲— ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

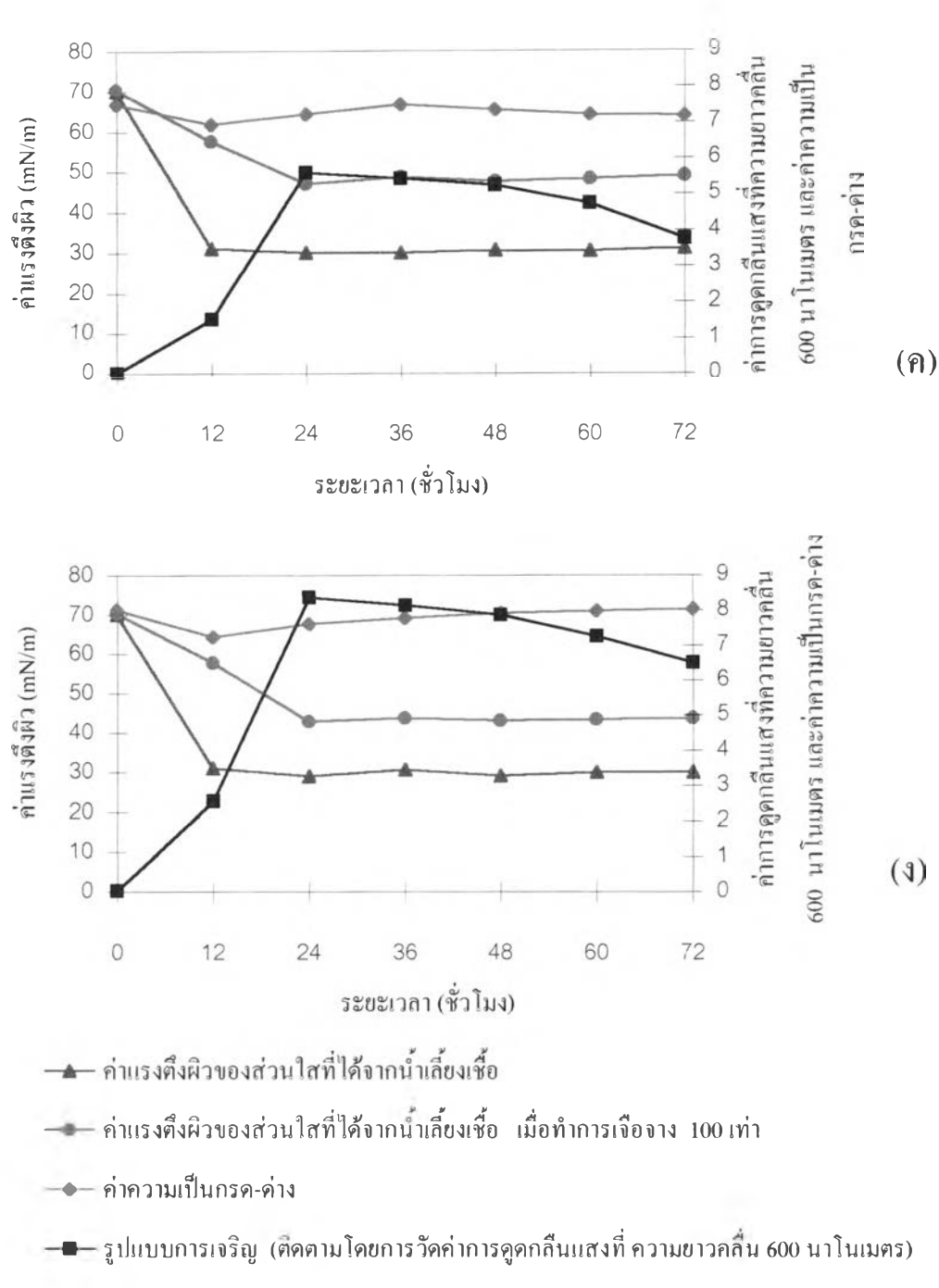
—●— ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า

—●— ค่าความเป็นกรด-ด่าง

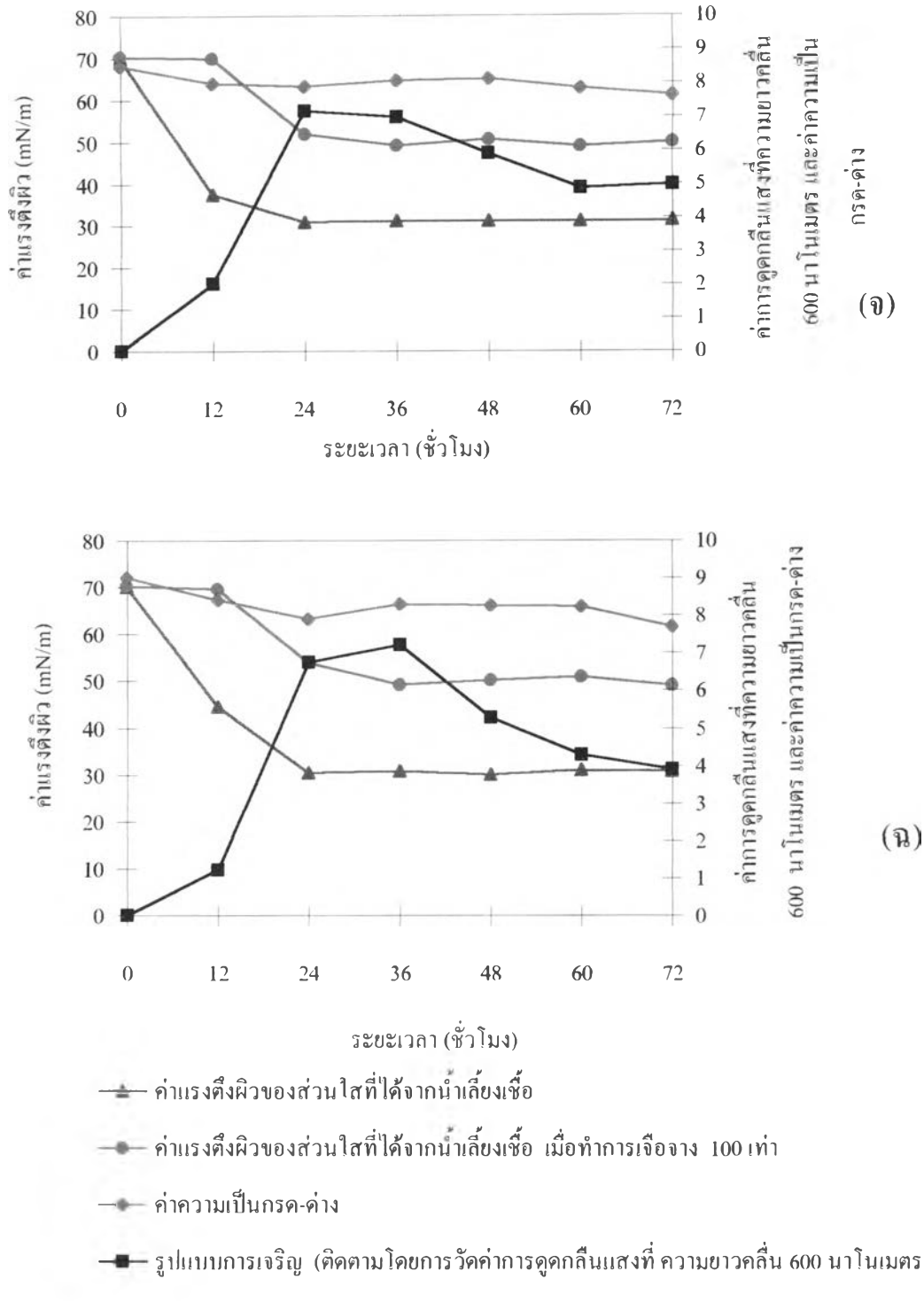
—■— รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

รูปที่ 27.1 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, การเจริญของเชื้อ, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 (ก) เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 6.5 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (ข) ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 7.0 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

วพ
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 1796
วันที่ 17 ส.ค. 2544



รูปที่ 27.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, การเจริญของเชื้อ, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 (ค) เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 7.5 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ง) ควบคุม ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์



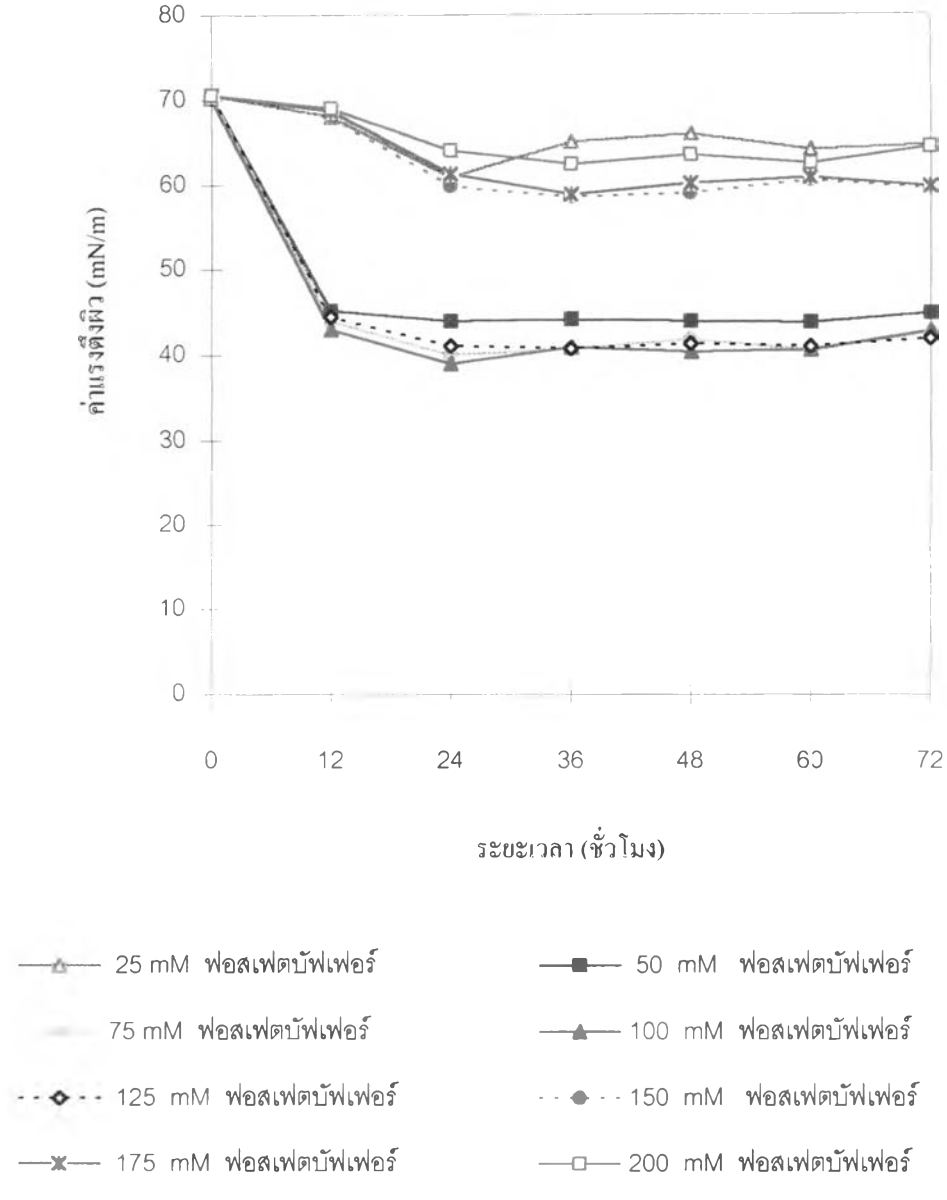
รูปที่ 27.3 แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, การเจริญของเชื้อ, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้ จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้ จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26
(จ) เมื่อควบคุม ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.5 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (ฉ) เมื่อควบคุม ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 9.0 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์

ตารางที่ 6 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 ท่า โดยเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรตามวิธีการทดลองในข้อ 2.11 ทำการวัดค่าแรงตึงผิว ที่ 24 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 2. 9

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (มิลลินิวตันต่อเมตร)
6.5	65.4
7.0	48.2
7.5	47.0
8.0	42.8
8.5	51.9
9.0	53.8

ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6.5-8.0 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 8.5-9.0 ด้วย 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์



รูปที่ 28 ผลของความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 ต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 วิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ตามวิธีการในข้อ 2.9

30^0ซ ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด สามารถลดแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่นได้ต่ำที่สุดเท่ากับ 43.4 มิลลินิวตัน ต่อเมตร และให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุดเท่ากับ 27 หน่วย ดังแสดงในรูปที่ 29

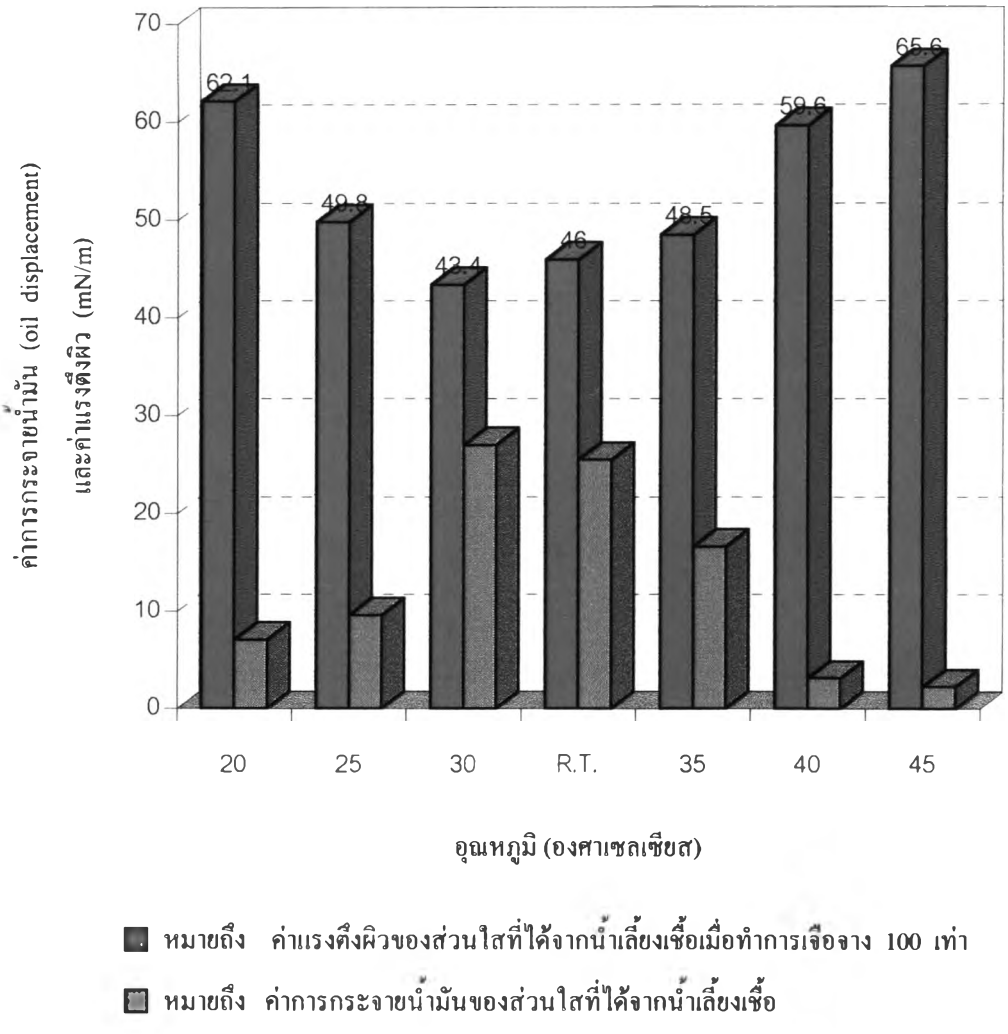
3. 2. 2.6 อัตราการเขย่าเซลล์เพาะเลี้ยงต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อเลี้ยง *Bacillus licheniformis* F2. 2 ในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร (ภาคผนวก ก. หมายเลข 10) แปรผันความเร็วรอบการเขย่าที่ 100, 150, 200, 250 และ 300 รอบ/นาที ตามลำดับ พบว่าอัตราการเขย่าที่ 150, 250 และ 300 รอบ/นาที ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน โดยที่ 250 รอบ/นาที ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสหลังการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า มีค่าต่ำที่สุด เท่ากับ 39 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด เท่ากับ 33.2 หน่วย ดังแสดงในรูปที่ 30

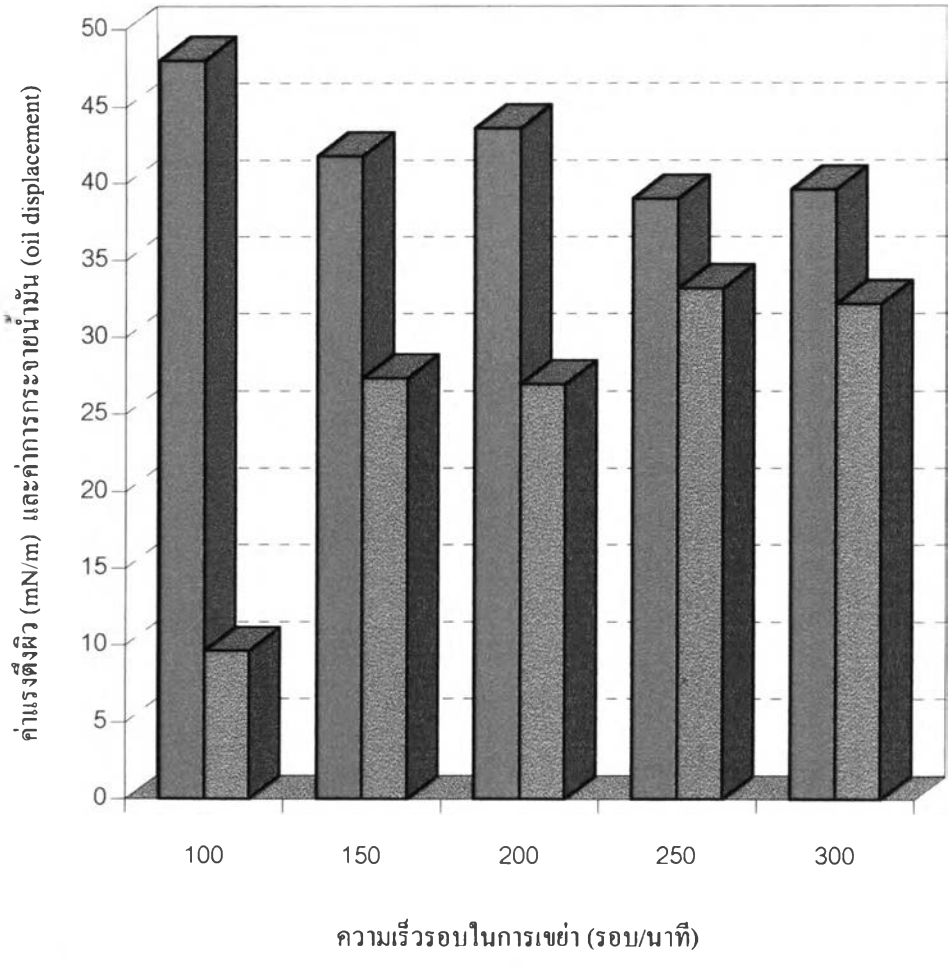
3. 3 <u>องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u>

3. 3. 1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

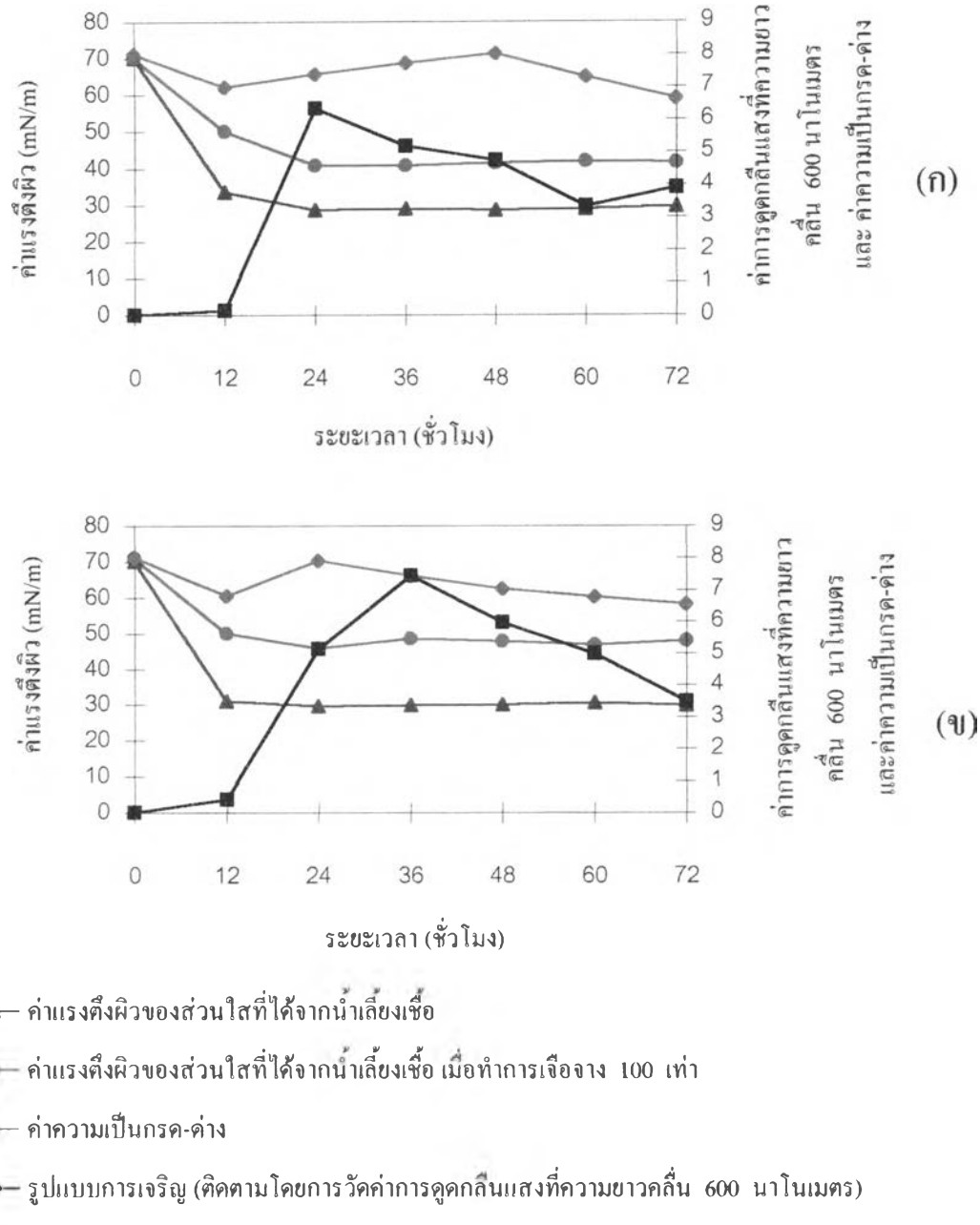
ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน ได้แก่ กลูโคส น้ำตาลทราย กลีเซอรอล และ แป้ง ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ วัดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เจือจาง 100 เท่า ทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่า กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ให้ประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวได้ดีที่สุด โดยค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เจือจาง 100 เท่า มีค่าเท่ากับ 40.8 มิลลินิวตันต่อเมตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 31.1, 31.2 และ 32 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Cooper และคณะ (1981) พบว่า กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการ ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จากนั้นทำการศึกษา หาปริมาณของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทำการแปรผันปริมาณกลูโคส ตั้งแต่ 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร พบว่ากลูโคสที่ 20 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด แสดงดังรูปที่ 33 แต่เนื่องจากกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีราคาค่อนข้างแพง และ ความคิดที่ต้องการจะลดต้นทุนการผลิต



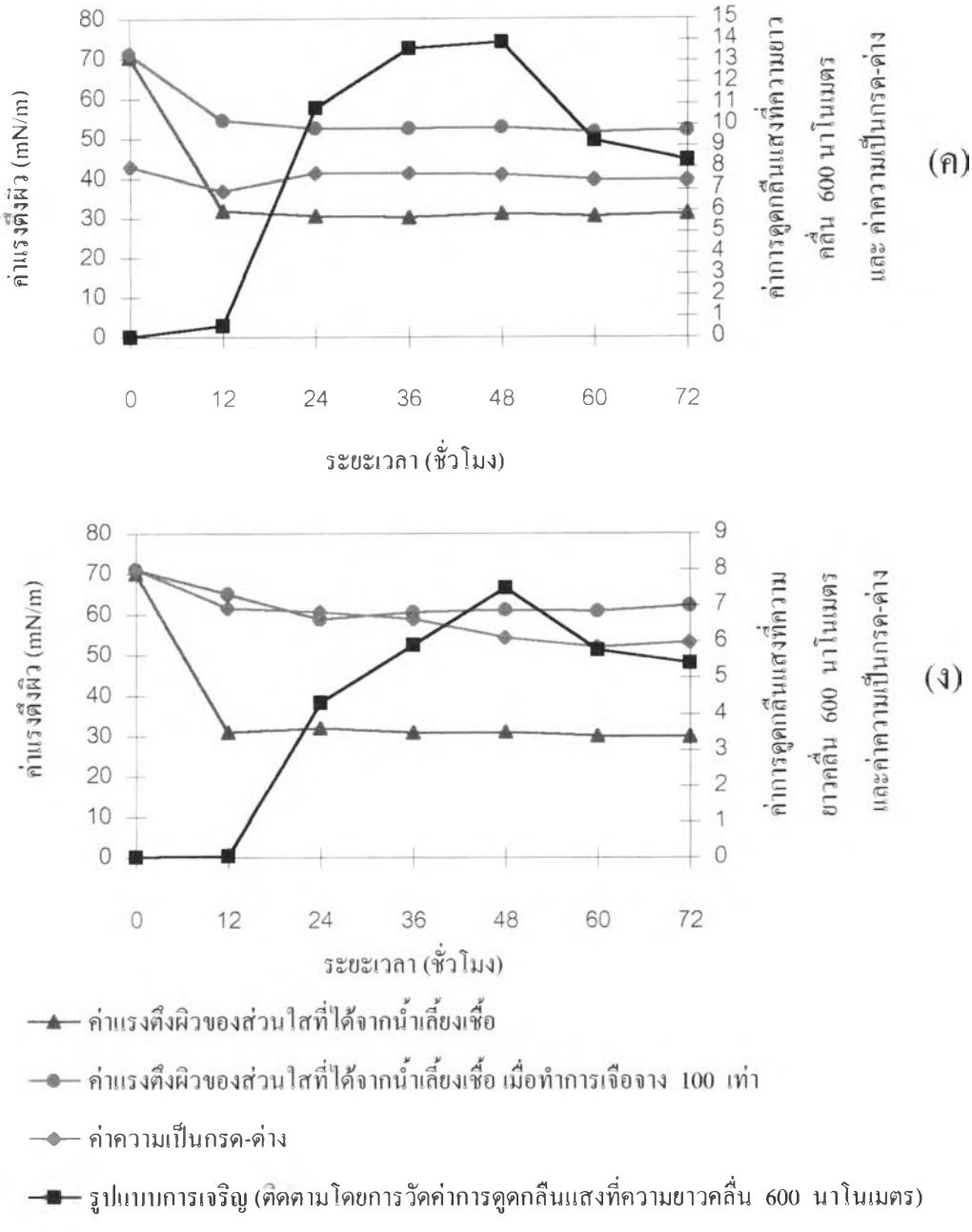
รูปที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า และค่าการกระจายน้ำมันโดย *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบ ดังกล่าวภายใต้รูปที่ 39 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และผันแปรอุณหภูมิในการเลี้ยงดังระบุในรูป ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ และ การวัดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 26 ส่วนการทดสอบการกระจายน้ำมัน ทำตามวิธีในข้อ 2.10



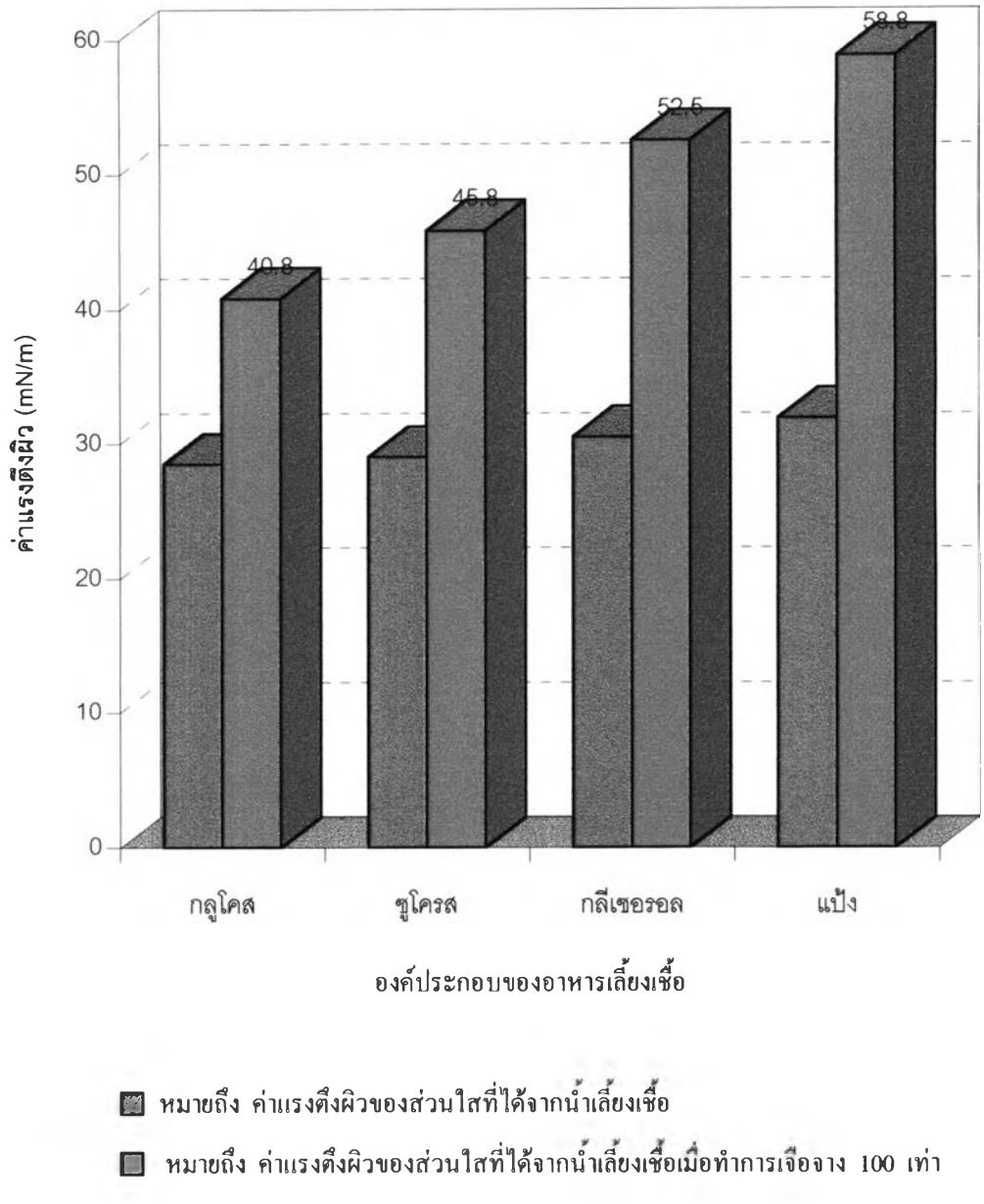
รูปที่ 30 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า และค่าการกระจายน้ำมัน โดย *B. licheniformis* F2.2
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังกล่าวภายใต้รูปที่ 39 ภาวะในการเลี้ยง การวัดค่าแรงตึงผิว และการทดสอบการกระจายน้ำมัน ทำตามวิธีดังระบุในรูปที่ 29



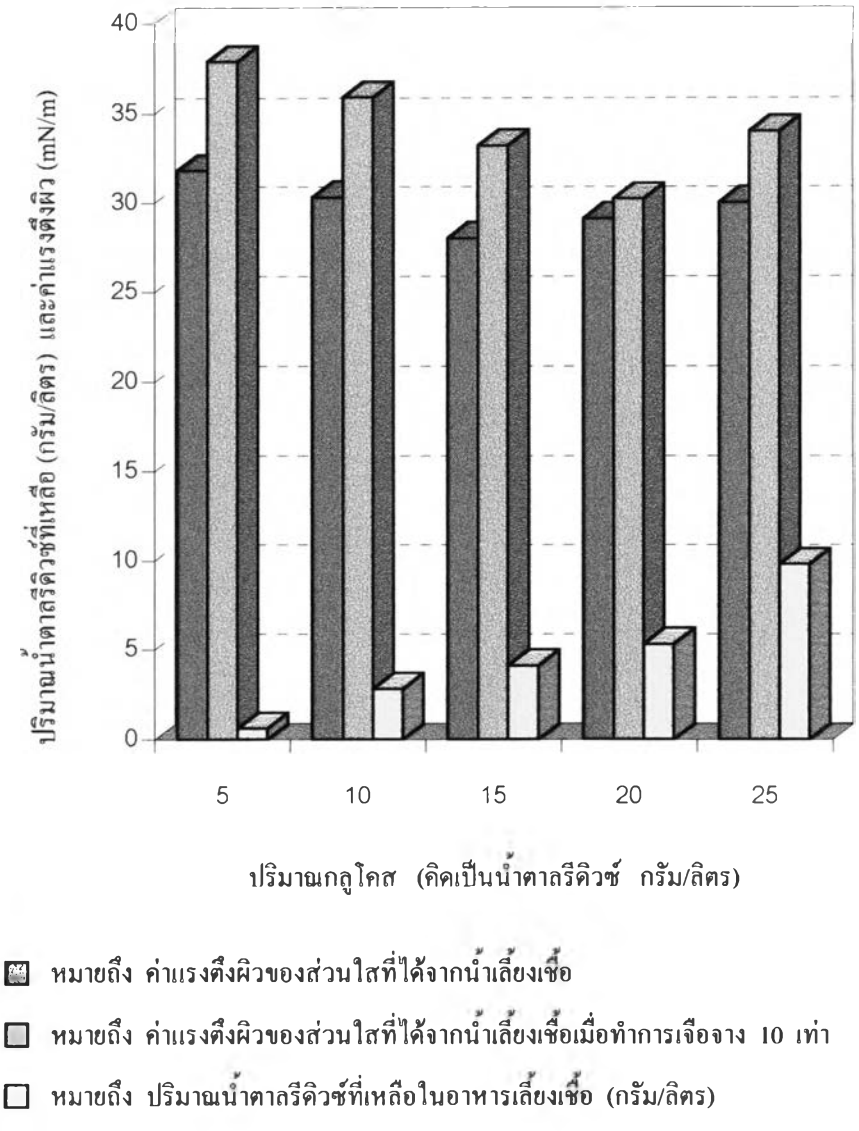
รูปที่ 31.1 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังระบุภายใต้ รูปที่ 26 (ก) เมื่อใช้กลูโคส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน (ข) เมื่อใช้ซูโครส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 31.2 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 26 (ค) เมื่อใช้กลีเซอรอล 2 % เป็นแหล่งคาร์บอน (ง) เมื่อใช้แป้ง 2 % เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 32 **ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้น้ำการเลี้ยงเชื้อ** โดย *B. licheniformis* F2.2
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีองค์ประกอบอาหารชนิดอื่น ๆ ภาวะในการเลี้ยง และวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 28 **ยกเว้นผันแปรแหล่งคาร์บอนดังระบุในรูป**



รูปที่ 33 ผลของปริมาณกลูโคสต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *B. licheniformis* F2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 26 ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ ทำตามวิธีการในข้อ 2.8

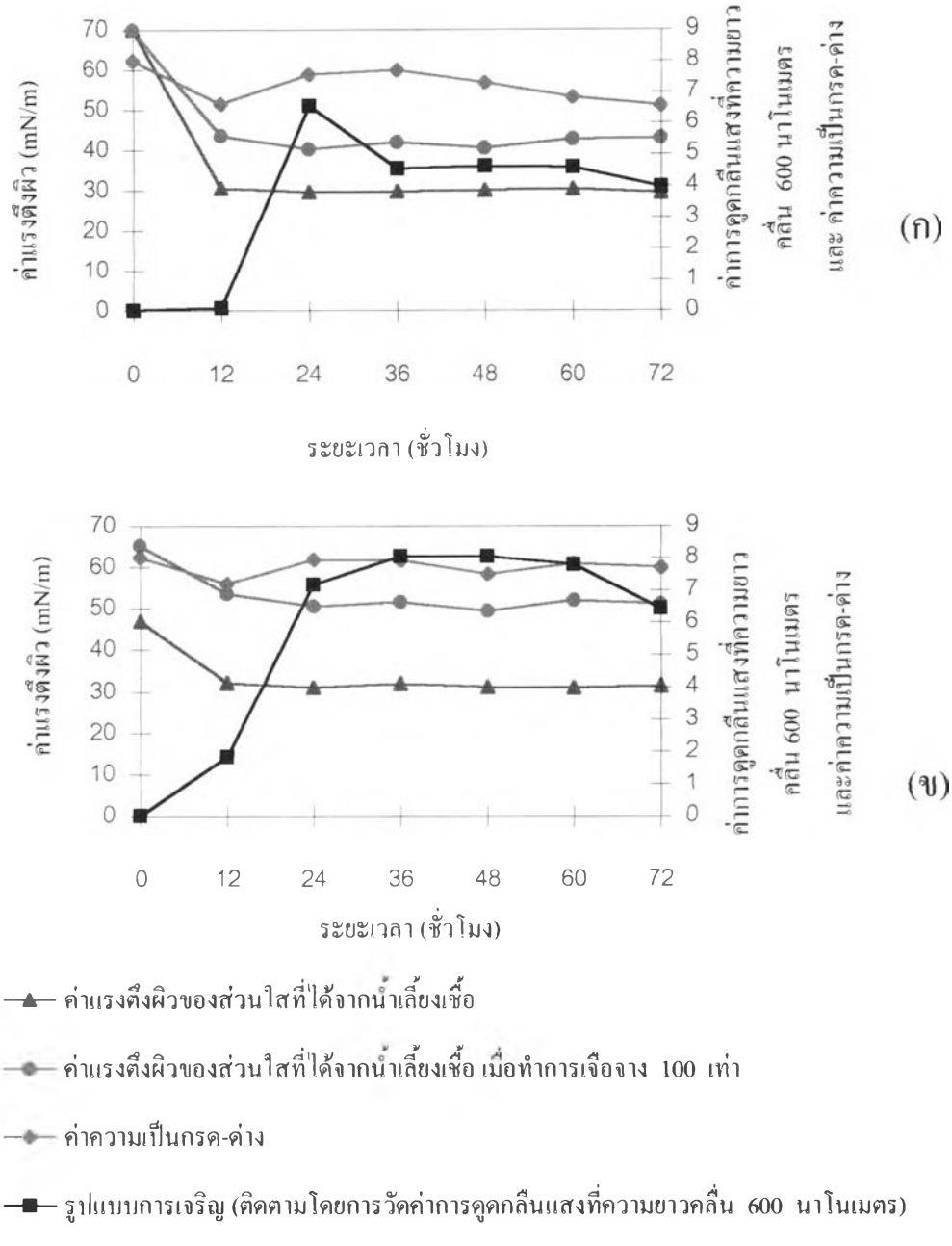
ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงต้องการหา แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และหาได้ง่าย เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้กลูโคส

3. 3. 2 ชนิด และปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน ชนิดที่หาได้ง่าย และ ราคาถูก ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2. 2

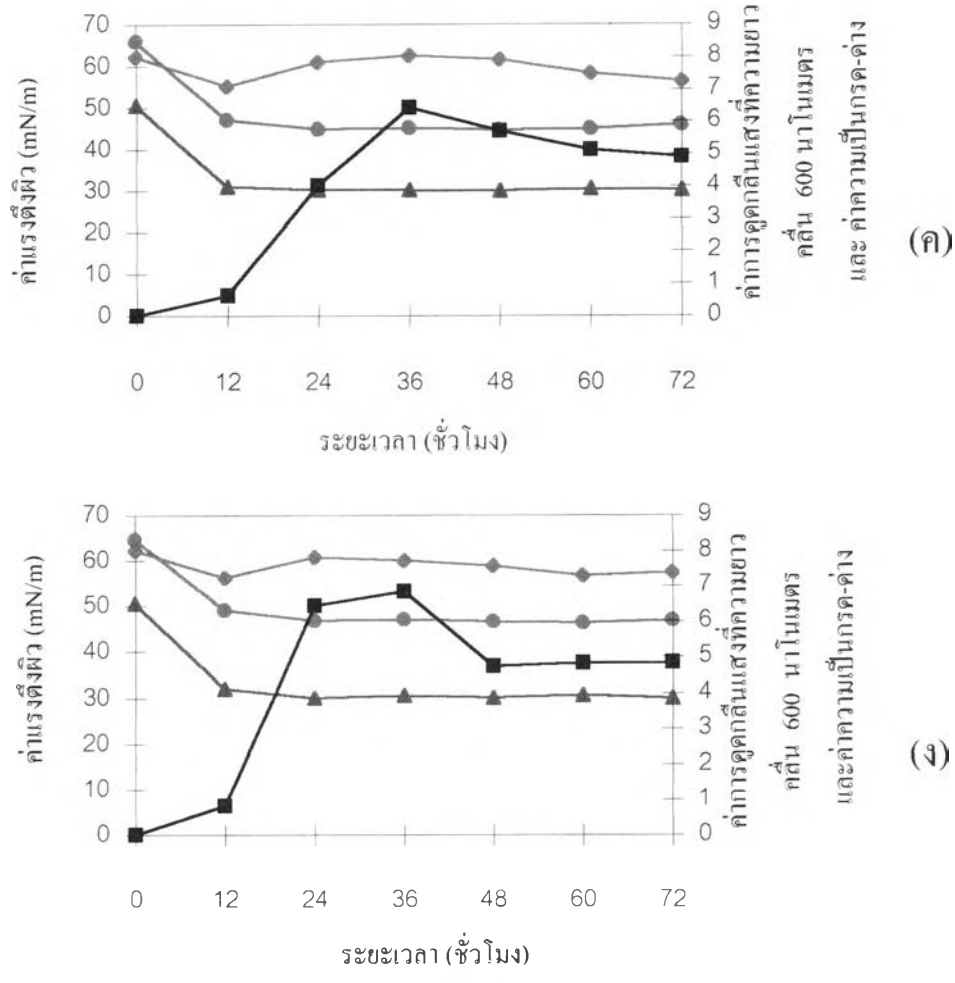
ได้ทดลองนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และ รำข้าว มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทดแทนการใช้กลูโคส ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Bacillus licheniformis* F2. 2 พบว่า ไฮโดรไลเสทจาก ฟางข้าว ให้ประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิว ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 7 และฟางข้าวหาได้ง่าย และสะดวกกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้ ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูก ใช้ในการทดลองต่อไป จากการแปรผันปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสท ฟางข้าว ตั้งแต่ 5 , 10 , 15 , 20 และ 25 กรัม/ลิตร พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสท จาก ฟางข้าว 20 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด โดยจะลดค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เจือจาง 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่น ได้เท่ากับ 44.7 มิลลินิวตันต่อเมตร ผลดังแสดงในรูปที่ 35 ดังนั้นในขั้นต่อไปจึงใช้ไฮโดรไลเสท จาก ฟางข้าว 20 กรัม/ลิตร (คิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์) เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2. 2

3. 3. 3 แหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ F2. 2

จากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขวดเขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮโดรไลเสทจากฟางข้าว 20 กรัม/ลิตร (คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สาร ได้แก่ กากถั่วเหลืองที่ย่อยแล้ว (soybean hydrolysate , SBH) กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยแล้ว และ แหล่งไนโตรเจน ชนิดอนินทรีย์สาร ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และ โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ในอาหารที่กำหนดสูตร (ภาคผนวก ก. หมาย



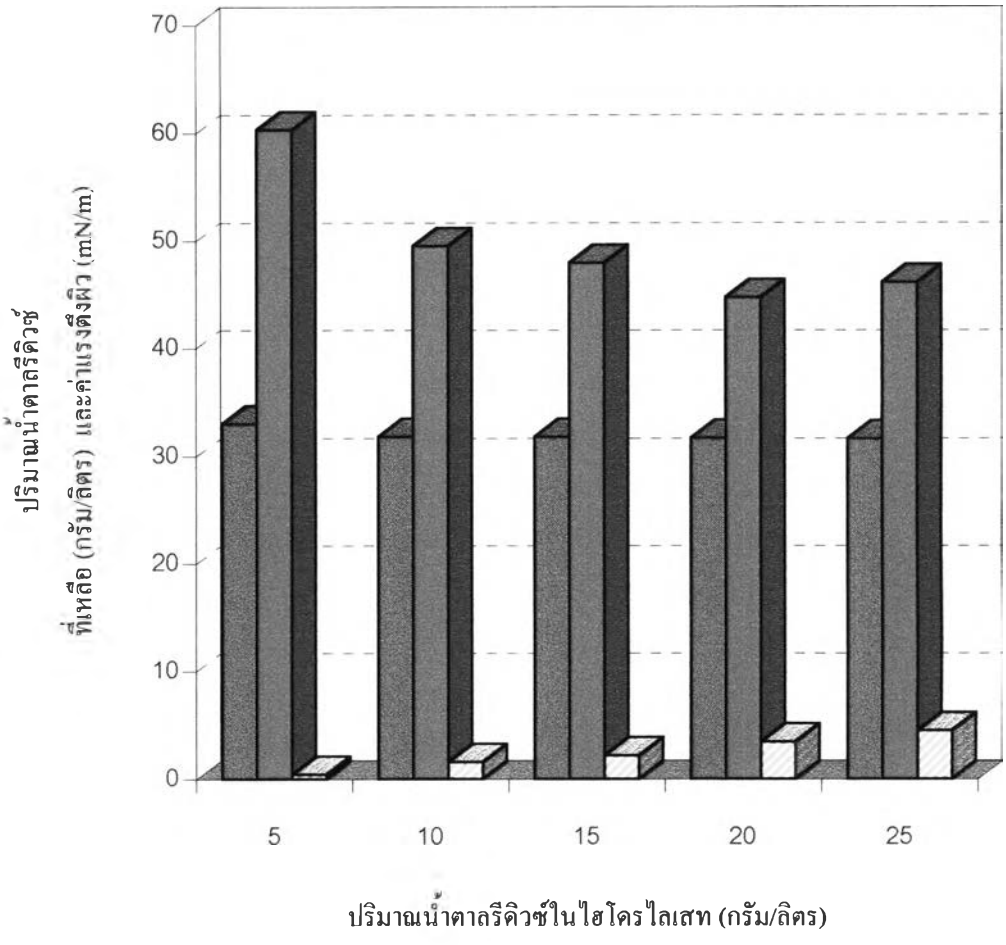
รูปที่ 34.1 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 26 (ก) เมื่อใช้กลูโคส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน (ข) เมื่อใช้ไฮโดรไลเสทรำข้าว 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 34.2 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 26 (ค) เมื่อใช้ไฮโดรไลเสทฟางข้าว 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) เป็นแหล่งคาร์บอน (ง) เมื่อใช้ไฮโดรไลเสทชานอ้อย 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ทดแทนกลูโคสต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวกำหนดสูตร ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.11 ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำการวัดค่าแรงตึงผิว ที่ 24 ชั่วโมง ตามวิธีการในข้อ 2. 9

แหล่งคาร์บอน (คิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 2 %)	% การลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่การเจือจาง 100 เท่า
กลูโคส	42.57
รำข้าว	22.43
ฟางข้าว	32.12
ชานอ้อย	27.50

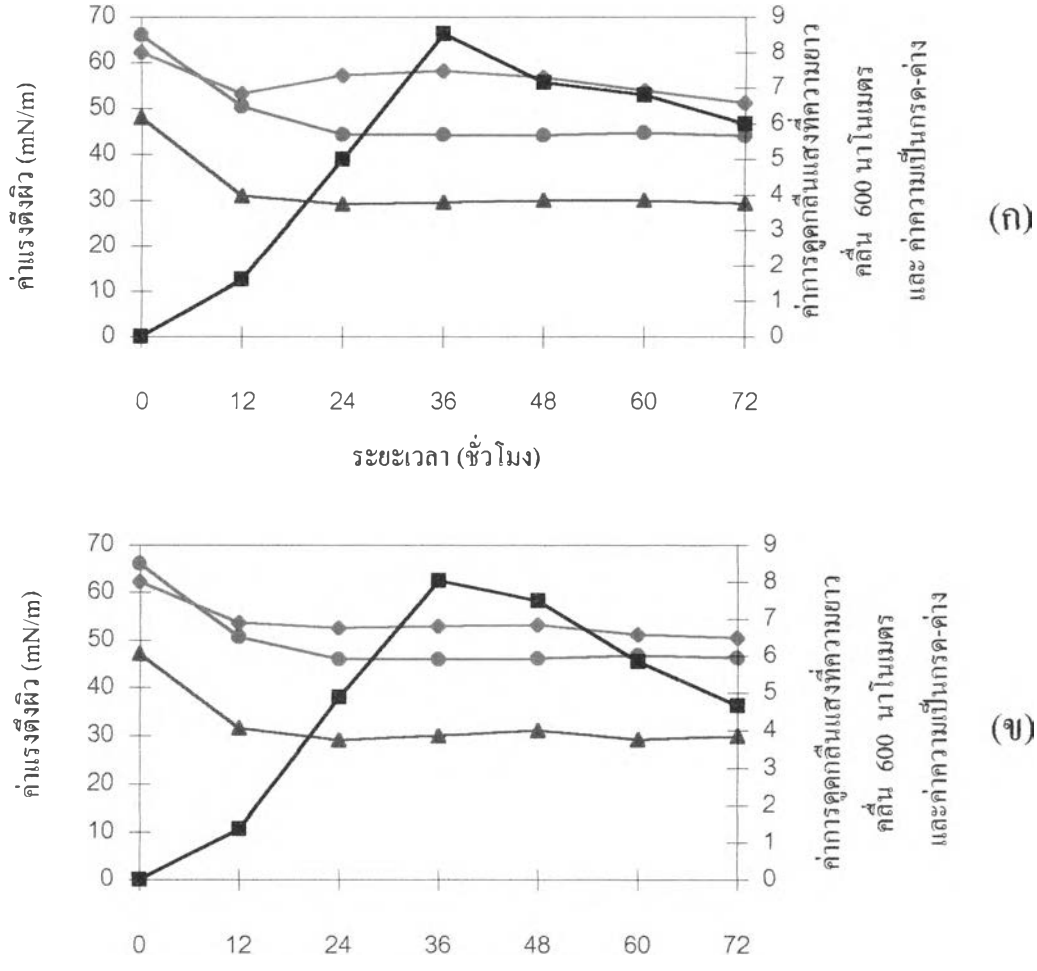


รูปที่ 35 ผลของปริมาณของไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *B. licheniformis* F2.2 เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 26 ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ ทำตามวิธีการในข้อ 2.8

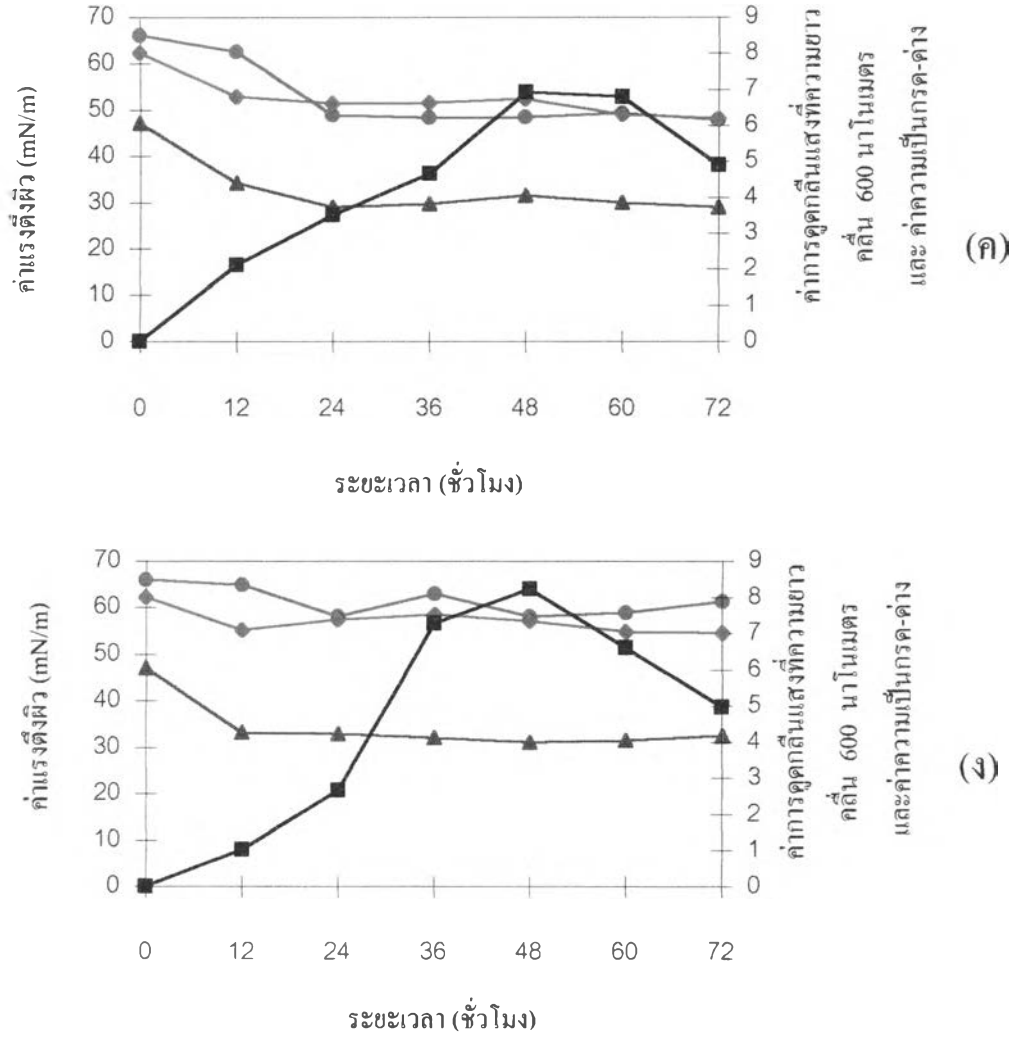
เลข 9) โดยจัดให้ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนทุกแหล่ง เท่ากับปริมาณไนโตรเจนใน แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.85 กรัม/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปแบบการเจริญ และการผลิตสารลดแรงตึงผิว แสดงดังในรูปที่ 36.1 - 36.3 จากผลการทดลองพบว่า การใช้ soybean hydrolysate และ กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยแล้วเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้ผลการลดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสได้น้อยมาก ในขณะที่แอมโมเนียมไนเตรท จะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยลดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ทำการเจือจาง 100 เท่า ลงต่ำที่สุด เท่ากับ 44.3 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด เท่ากับ 22.15 หน่วย ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 สอดคล้องกับผลการทดลองของ Roubin และคณะ (1989) พบว่า แอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดย *Bacillus subtilis* และ เมื่อทำการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท ตั้งแต่ 0.5 , 1 , 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1750, 0.3498, 0.6996, 1.3992, 2.0988, 2.7984 และ 3.4979 กรัม/ลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ พบว่า แอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.6996 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสม โดยลดค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ ที่ทำการเจือจาง 100 เท่า ลงได้เท่ากับ 42.1 มิลลินิวตันต่อเมตร และให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงที่สุด เท่ากับ 27.3 หน่วย ดังรูปที่ 37

3. 3. 4 แหล่งเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ในการศึกษาเพื่อหา แหล่งแร่ที่จำเป็น และ ปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกำหนดสูตร ที่ดึงเอาแร่ต่าง ๆ ออกทีละตัว ได้แก่ ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 .7H_2O$) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 . 7H_2O$) และ แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . H_2O$) พบว่า การขาดแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . H_2O$) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อ ปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตได้ โดยจะทำให้ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของเซลล์เพาะเลี้ยง ที่เจือจาง 100 เท่า มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 53.1 มิลลินิวตันต่อเมตร ดังแสดงในรูปที่ 38 เมื่อแปรผันปริมาณแมงกานีสซัลเฟต ตั้งแต่ 1.71 , 3.42 และ 5.13 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า แมงกานีสซัลเฟต ที่ 1.71 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ดังรูปที่ 39



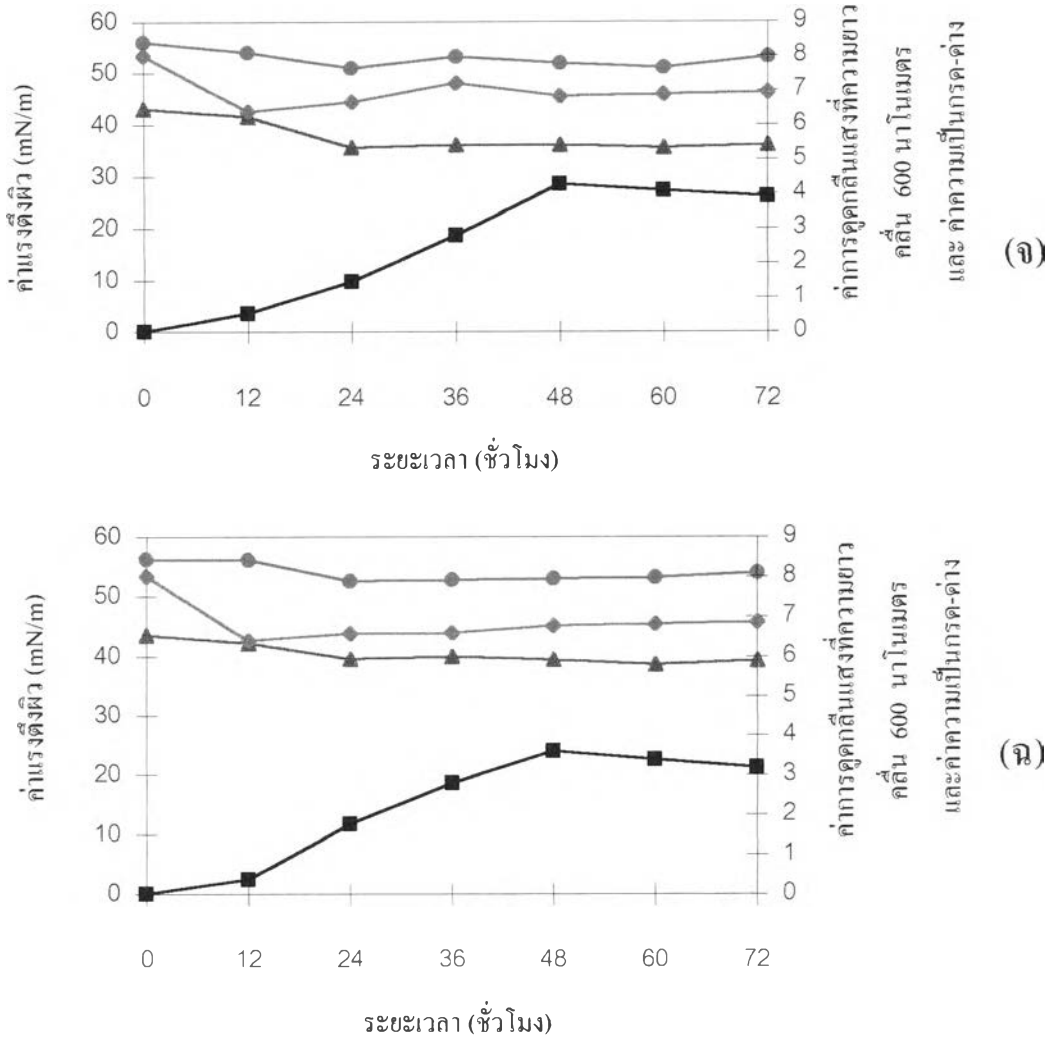
รูปที่ 36.1 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2
เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มี 2 % ไฮโดรไลเสทของฟางข้าว (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) เป็นแหล่งคาร์บอน มีไนโตรเจนปริมาณ 0.85 กรัมต่อลิตร ปรับภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ภาวะในการเลี้ยง และวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26
(ก) เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท (ข) เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต



รูปที่ 36.2 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มี 2 % ไฮโดรไลเสทของฟางข้าว (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) เป็นแหล่งคาร์บอน มีไนโตรเจนปริมาณ 0.85 กรัมต่อลิตร ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ภาวะในการเลี้ยง และ การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26

(ค) เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (ง) เมื่อใช้โซเดียมไนเตรท

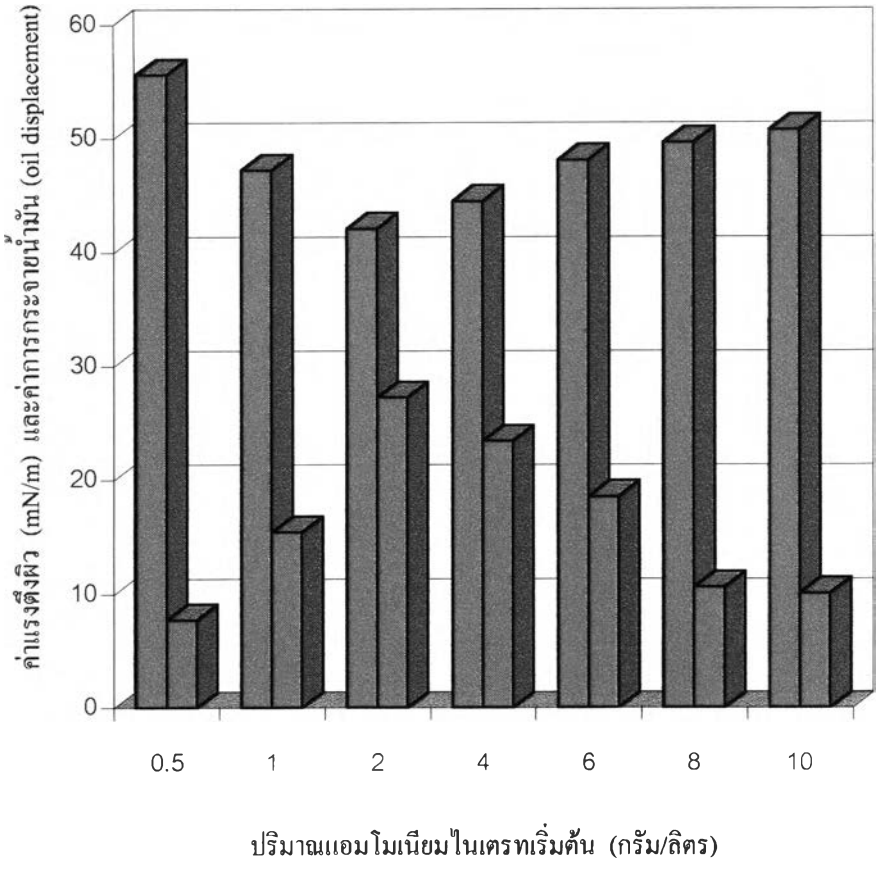


รูปที่ 36.3 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า โดย *B. licheniformis* F2.2

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มี 2% ไฮโดรไลเสทของฟางข้าว (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) เป็นแหล่งคาร์บอน มีไนโตรเจนปริมาณ 0.85 กรัมต่อลิตร ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ภาวะในการเลี้ยง และ การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังกล่าวภายใต้รูปที่ 26 (จ) เมื่อใช้กากถั่วเหลือง (ฉ) เมื่อใช้กากเมล็ดฝ้าย

ตารางที่ 8 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าการกระจายน้ำมัน โดย *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ ในอาหารเหลวกำหนดสูตร ที่มี 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) ไฮโดรไลเสทของฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเริ่มต้นที่ 8.0 ด้วย 75 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ภาวะในการเลี้ยงวิธีการทดลองในข้อ 2.11 วิเคราะห์ ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว 24 ชั่วโมง ทำตามวิธีการในข้อ 2.9

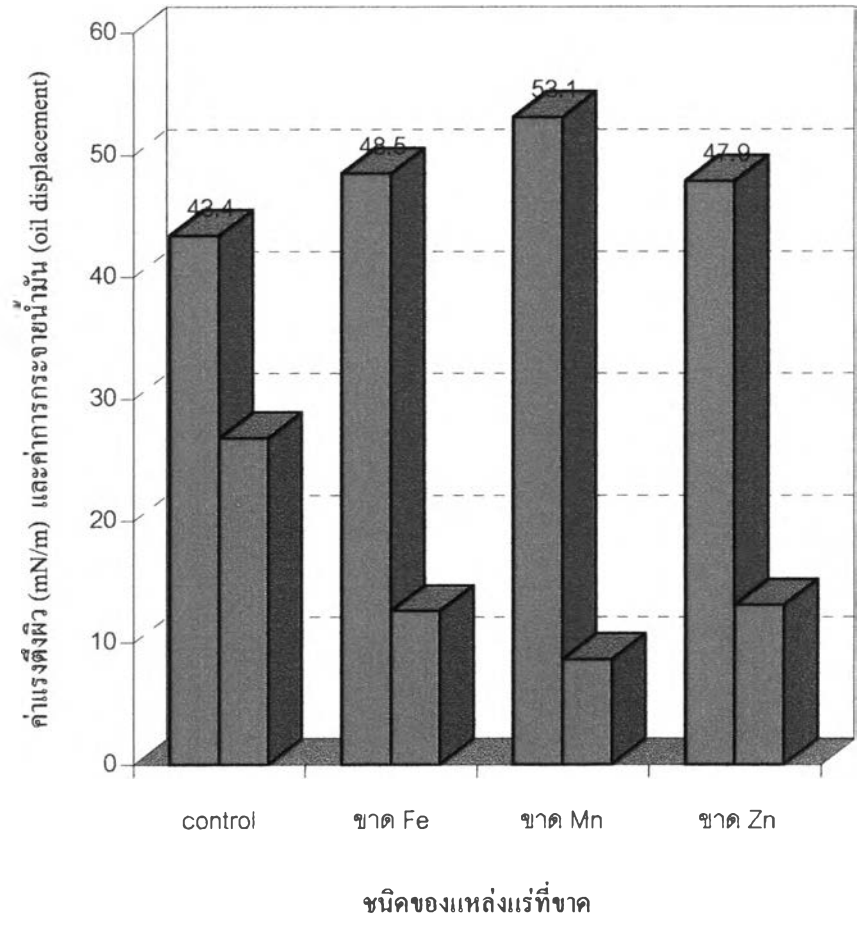
แหล่งไนโตรเจน (ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 0.085 %)	% การลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่การเจือจาง 100 เท่า	ค่าการกระจายน้ำมัน (หน่วย)
NH_4NO_3	32.27	23.75
$(NH_4)_2SO_4$	30.30	20.83
NH_4Cl	25.91	15.21
$NaNO_3$	16.52	6.16
SBH	9.11	6.97
กากเมล็ดฝ้าย	6.41	6.88



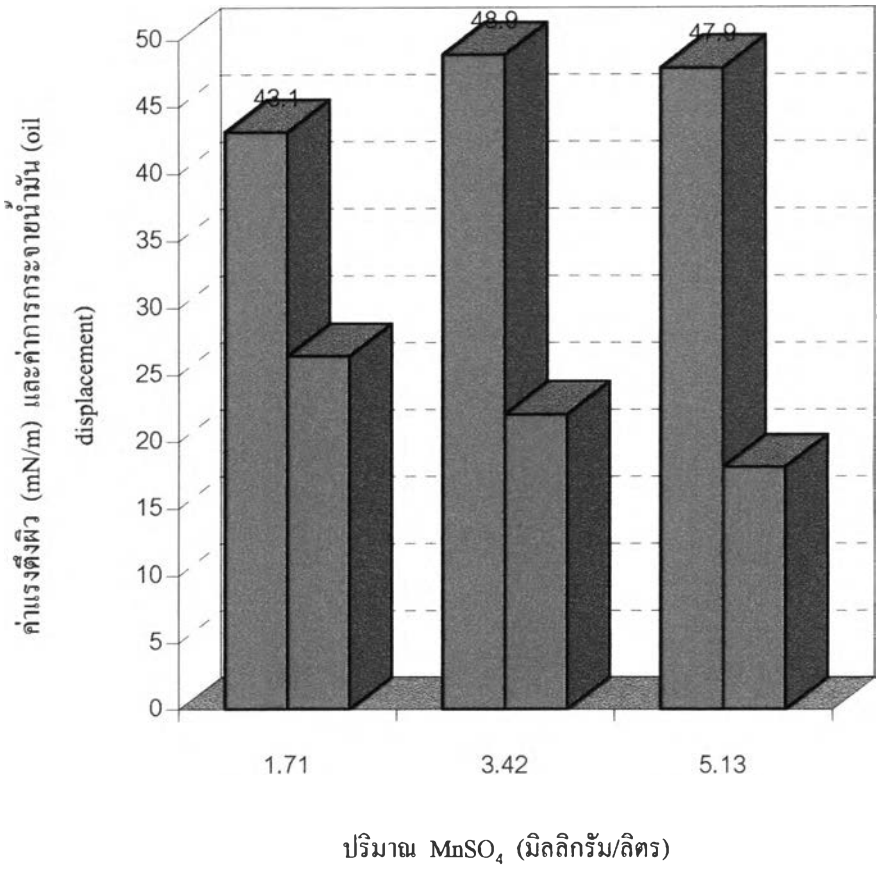
■ หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า

■ หมายถึง ค่าการกระจายน้ำมัน (oil displacement) ของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 37 ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าการกระจายน้ำมัน โดย *B. licheniformis* F2.2 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 36.1 (ก) แต่แปรปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทดังระบุในรูป ส่วนการทดสอบการกระจายน้ำมันทำตามวิธีการในข้อ 2.9



รูปที่ 38 ผลของแหล่งแร่ชนิดต่าง ๆ ต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าการกระจายน้ำมัน ของ *B. licheniformis* F2.2 เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มี 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์) ไฮโดรไลเสทของฟางข้าว เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2 % NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว และการทดสอบการกระจายน้ำมัน ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 37



รูปที่ 39 ผลของปริมาณแมงกานีสซัลเฟตต่อการลดลงของค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าการกระจายน้ำมัน โดย *B. licheniformis* F2.2 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 38 แต่แปรปริมาณแมงกานีสซัลเฟตดังระบุในรูป ส่วนการทดสอบการกระจายน้ำมัน ทำตามวิธีการในข้อ 2.10

โดยลดค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสของเซลล์เพาะเลี้ยง ที่เจือจาง 100 เท่า ลงเหลือ 43.1 มิลลินิวตัน ต่อเมตร

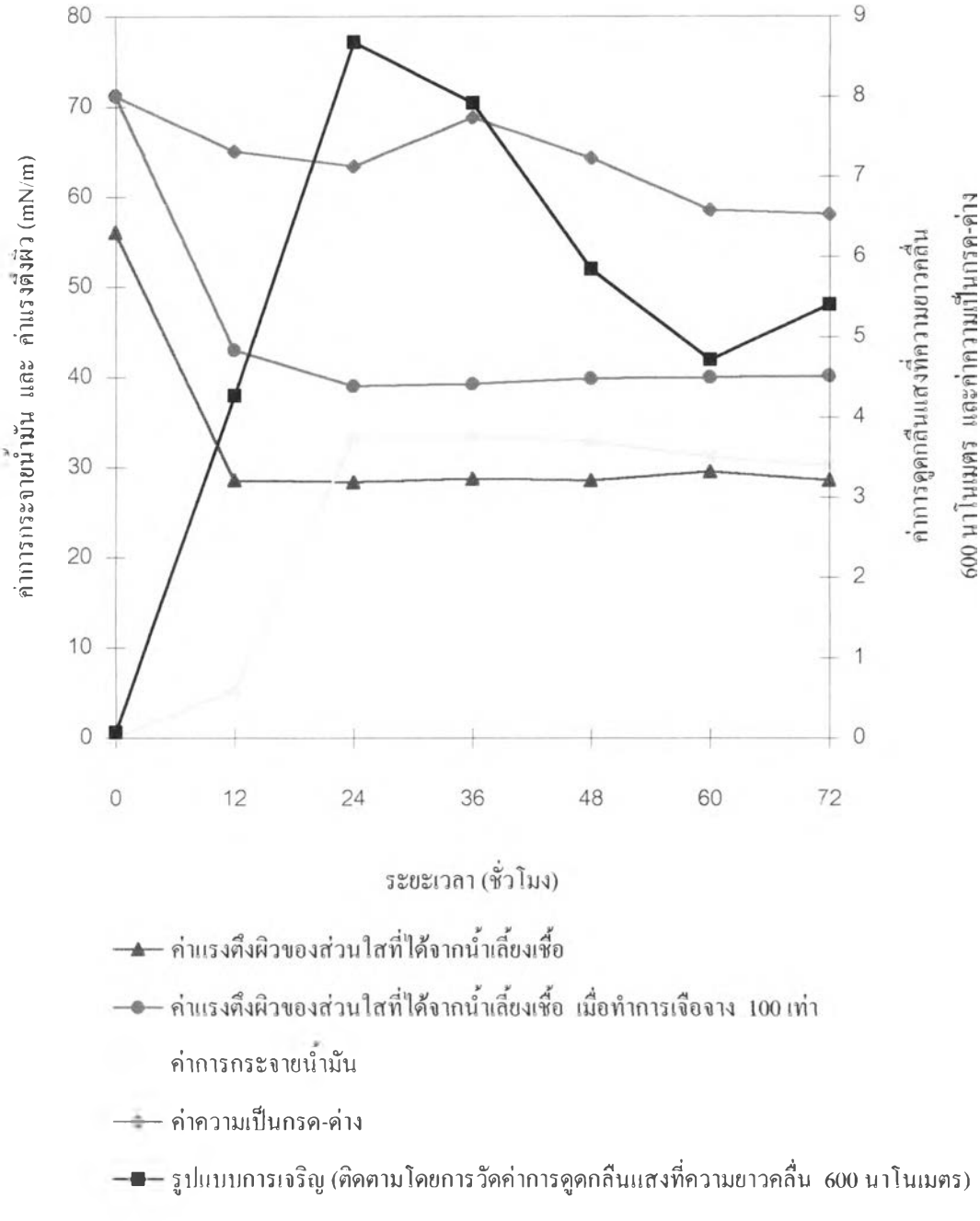
หลังจากที่ได้ภาวะที่เหมาะสมในเบื้องต้นแล้ว ได้ทำการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Bacillus licheniformis* F2. 2 ผลดังแสดงในรูปที่ 40 พบว่าสามารถทำให้ส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่เจือจาง 100 เท่า มีค่าแรงตึงผิว เท่ากับ 39.3 มิลลินิวตัน/เมตร และ ให้ค่าการกระจายน้ำมันสูงสุด ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 33.71 หน่วย

3. 4 สมบัติเบื้องต้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* F2. 2

3. 4. 1 ศึกษาความสามารถในการเกิดอีมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดอีมัลชั่นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการนำส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ผสมกับน้ำมันก๊าด แล้วนำไปปั่นผสม (vortex) เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2. 2 สามารถเกิดอีมัลชั่นกับน้ำมันก๊าดได้ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 41

รูปที่ 41 แสดงลักษณะอีมัลชั่น ที่เกิดจากการผสมของน้ำเลี้ยงเชื้อ กับน้ำมันก๊าด



รูปที่ 40 แสดงรูปแบบการเจริญ,การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า และ ค่าการกระจายน้ำมัน โดย *B. licheniformis* F2.2 ในภาวะที่เหมาะสม

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีภาวะในการเลี้ยง การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว และการทดสอบการกระจายน้ำมัน ทำตามวิธีดังระบุภายใต้รูปที่ 39

3.4.2 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

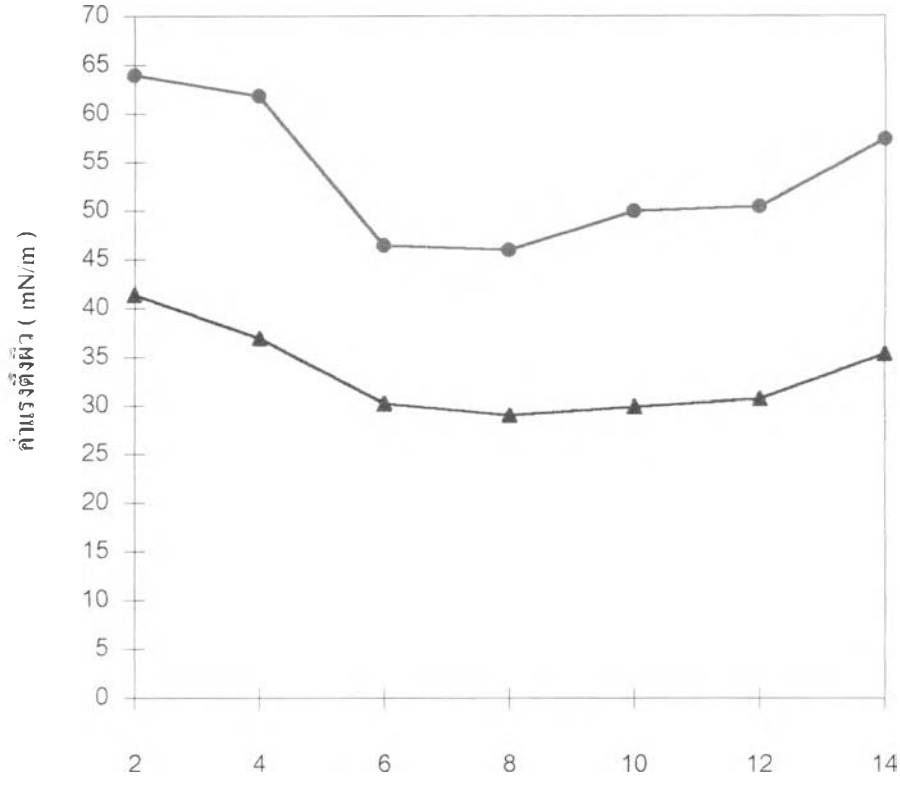
ทำการทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ต่อความเป็นกรด-ด่าง โดย นำส่วนใสที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง มาปรับค่า ความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 2 - 14 พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงกว้าง คือ 6 - 12 โดยถ้าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำ หรือ สูงกว่านี้ จะทำให้ประสิทธิภาพ ในการลดค่าแรงตึงผิวลดลงอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 42

3.4.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิ ต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทดลองเก็บสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไว้ที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ กัน ได้แก่ อุณหภูมิ 0^0ซ , 4^0ซ และ อุณหภูมิห้อง ติดตามวัดค่าแรงตึงผิวส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า โดยวัดผลทุก ๆ 10 วัน เป็นเวลา 100 วัน พบว่า ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 0^0ซ , 4^0ซ และ อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 43 สำหรับการทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่อุณหภูมิสูง โดยทำการบ่ม ส่วนน้ำใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 55 , 80 และ 100 องศาเซลเซียส ทำการติดตามผลด้วยการวัดค่าแรงตึงผิว ทุก ๆ 30 นาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง โดยที่ อุณหภูมิ 55^0ซ , 80^0ซ ส่วนใสของอาหารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ยังคงมีความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวอยู่จนถึง 5 ชั่วโมง ส่วนที่ 100^0ซ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสของอาหารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อจะ เริ่มมีค่าสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ของการบ่ม และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 5 ความสามารถในการลดแรงตึงผิวจะลดลง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 44

3.4.4 การศึกษาผลของเปอร์เซนต์เกลือ (% NaCl) ต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

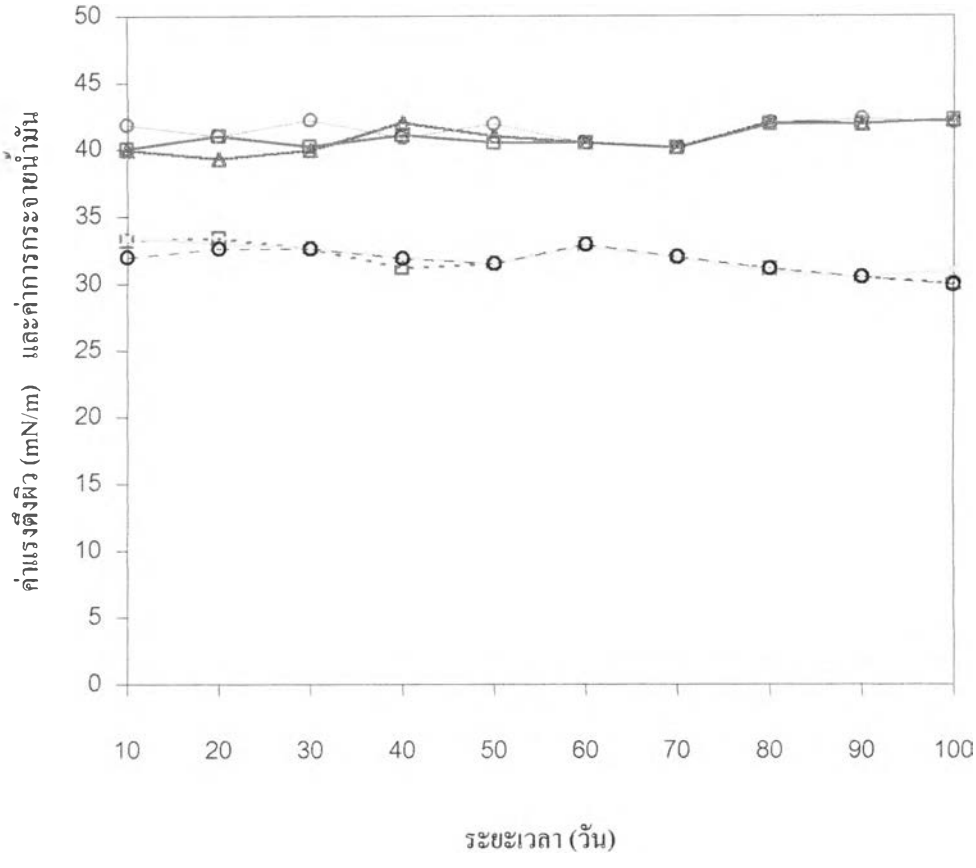
จากการนำส่วนใสของอาหารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ โดยแปรผันเปอร์เซนต์เกลือ (% NaCl) ต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-30 % พบว่าความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิวสูงขึ้น เมื่อ % NaCl เท่ากับ 5% (w/v) และจะเริ่มลดลง เมื่อ % NaCl สูงกว่า 10 % ผลแสดงดังรูปที่ 45



—▲— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

—●— หมายถึง ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเจือจาง 100 เท่า

รูปที่ 42 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *B. licheniformis* F2.2
ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 2.15.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีในข้อ 2.9



ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่การเจือจาง 100 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 0 ซ

ค่าการกระจายน้ำมัน เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 0 ซ

ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่การเจือจาง 100 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 ซ

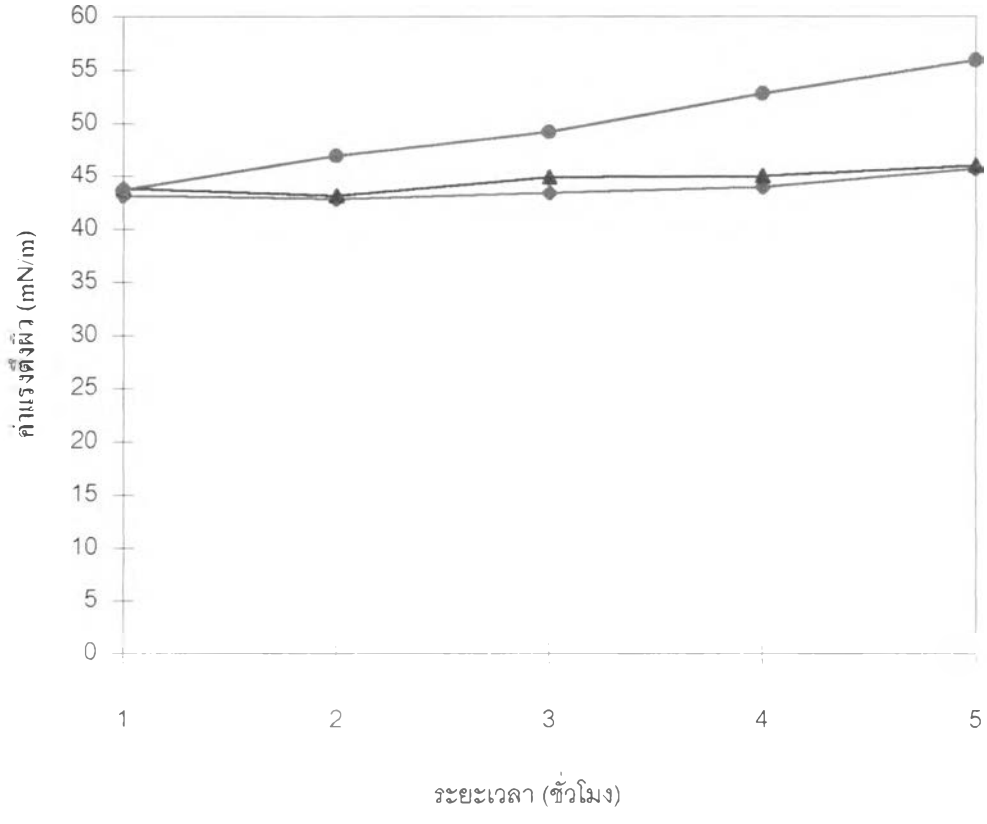
ค่าการกระจายน้ำมัน เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 ซ

ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่การเจือจาง 100 เท่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ ห้อง (30+2) ซ

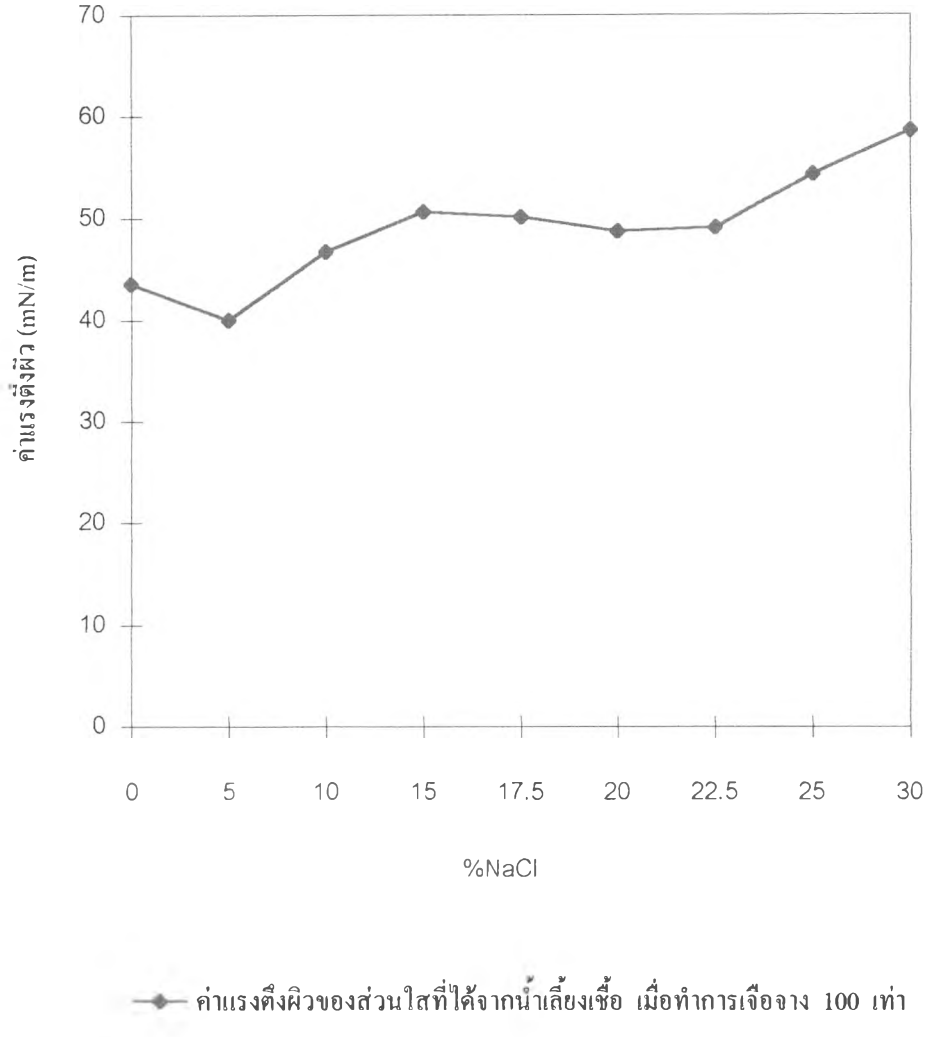
ค่าการกระจายน้ำมัน เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30+2) ซ

รูปที่ 43 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *B. licheniformis* F2.2 เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 0^0ซ, 4^0 ซ และอุณหภูมิห้อง ($30+2^0$) ซ

ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 2.15.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีในข้อ 2.9



รูปที่ 44 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *B. licheniformis* F2.2 ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 2.15.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีในข้อ 2.9



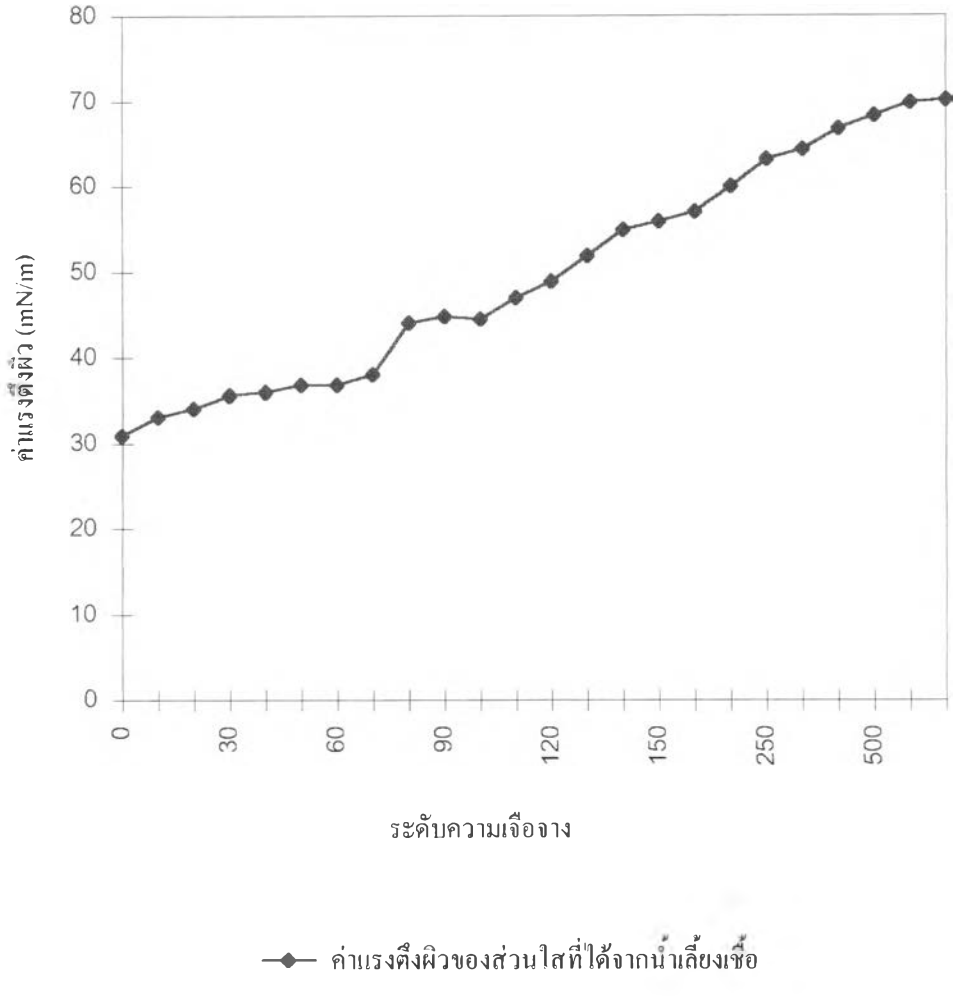
รูปที่ 45 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อความเสถียรของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *B. licheniformis* F2.2
ทำการทดลองดังบรรยายในบทที่ 2 ข้อ 2.15.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการลดค่าแรงตึงผิว ทำตามวิธีในข้อ 2.9

3. 4. 5 การศึกษาจุดวิกฤตของการเจือจางไมเซลล์ (critical micelle dilution, CMD)

จาก การศึกษาหาจุดวิกฤตของการเจือจางไมเซลล์ (CMD) โดยนำส่วนใส ของอาหารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ในภาวะที่เหมาะสมมาทำการเจือจาง แล้วทำการวัดค่าแรงตึงผิว พบว่า จุดวิกฤตของการเจือจาง ส่วนใสของอาหารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ ในภาวะที่เหมาะสม คือ ที่ค่า ความเจือจาง 80 เท่า ผลแสดงดังรูปที่ 46

3. 5 <u>การตรวจสอบ Profile ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ด้วยวิธี HPLC</u>

เมื่อทำการตรวจสอบ Profile ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 ด้วยวิธี HPLC นำลำดับส่วนที่เก็บได้มาทำการ ทดสอบค่าการกระจายน้ำมัน พบว่า จำนวนพีคที่ให้ผลทดสอบค่าการกระจายน้ำมันของ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 มีจำนวน 4 พีค ได้แก่ ที่ RT 31.98, RT 34.32, RT 35.12 และ RT 37.12 ดังตารางที่ 10 ในขณะที่ จำนวนพีคที่ให้ผลทดสอบค่าการกระจายน้ำมัน ของเซอแฟกติน มาตรฐาน มีจำนวน 4 พีค ได้แก่ ที่ RT 27.13, RT 27.93, RT 29.83, และ RT 31.09 ดังตารางที่ 9 และ เมื่อทำการเปรียบเทียบโครมาโตรแกรมที่ได้กับ สารละลายเซอแฟกตินมาตรฐาน พบ ว่า ลักษณะของโครมาโตรแกรม มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าสารลด แรงตึงผิวชีวภาพ ที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 น่าจะเป็นสารคนละชนิดกับ สารเซอแฟกติน มาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 47



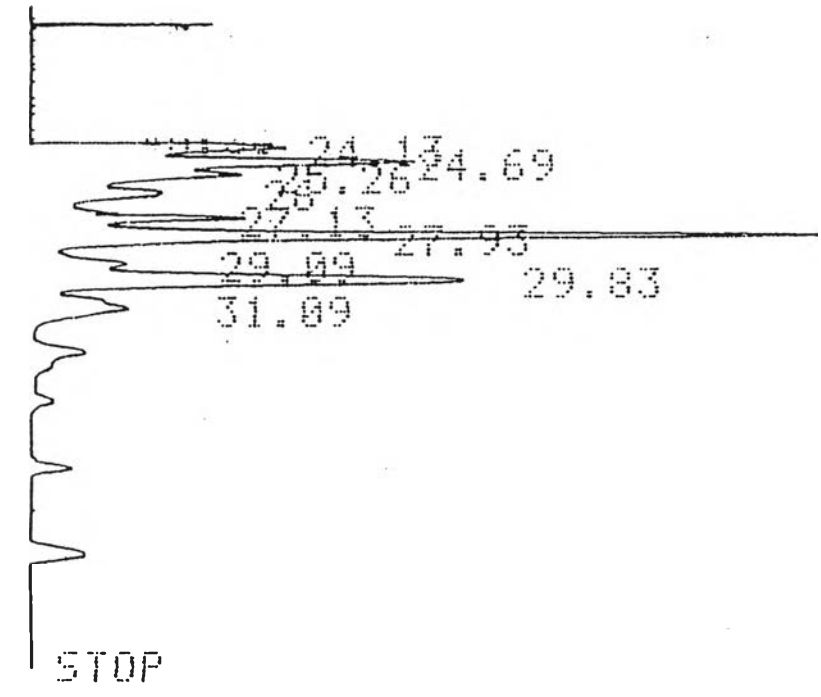
รูปที่ 46 ผลของการหาค่าจุดวิกฤตของความเจือจาง (critical micelle dilution, CMD) ของส่วนใสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดย *B. licheniformis* F2.2

ตารางที่ 9 แสดงลำดับส่วน (peak) ที่ให้ผลการทดสอบค่าการกระจายน้ำมันของเซอแฟกตินมาตรฐาน เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

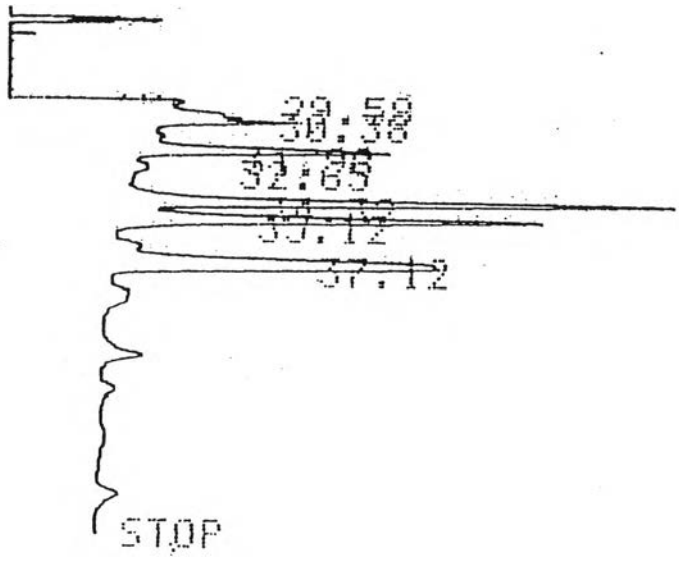
Retention time (RT)	Oil displacement (หน่วย)
27.13	0.7
27.93	2.84
29.83	3.80
31.09	1.33

ตารางที่ 10 แสดงลำดับส่วน (peak) ที่ให้ผลการทดสอบค่าการกระจายน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* F2.2 เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

Retention time (RT)	Oil displacement (หน่วย)
31.98	0.5
34.32	0.5
35.12	1.33
37.12	0.7



(A)



(B)

รูปที่ 47 โครมาโตรแกรมจากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ของสารมาตรฐานเซอแฟกติน (A) และโครมาโตรแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *B. licheniformis* F2.2 (B)