

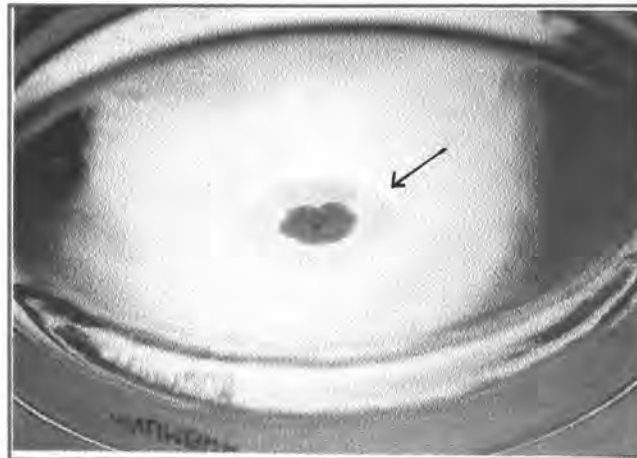
### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

##### 3.1.1 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพบนอาหารวุ้น

ทำการทดสอบจากตัวอย่างน้ำทะเล ดิน และอาหารที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ เพื่อความสามารถในการกระจายน้ำมันดิบ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NB และอาหาร YM ที่มีน้ำมันดิบ ปริมาณ 20  $\mu$ l แฝปกคลุมอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารอย่างสม่ำเสมอ หลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30  $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 – 7 วัน สังเกตโคโคไนด์ที่มีบริเวณใสรอบๆโคโคไนด์ ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 20 จากเชื้อทั้งหมด 108 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากตัวอย่าง 19 ตัวอย่าง สามารถได้เชื้อที่ให้บริเวณใส 30 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 5



รูปที่ 20 ลักษณะการกระจายตัวของน้ำมันดิบของเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ โดยวิธีเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่มีน้ำมันดิบแฝปกคลุมอยู่ และบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชม.

ตารางที่ 5 ผลสรุปการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ (สายพันธุ์)	จำนวนเชื้อที่มีบริเวณ ไฮรอปๆโคโลนี
น้ำทะเลและน้ำเค็มต่างๆ	5	72	16
อาหารจากตลาดคลองเตย	7	19	7
อาหารจากตลาดนัดจตุฬาฯ	2	5	1
อาหารจากจังหวัดอ่างทอง	5	12	6
รวม	19	108	30

### 3.1.2 การคัดเลือกเชื้อเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ตามวิธีในข้อ 3.1.1 27 สายพันธุ์ เนื่องจากเมื่อศึกษา ลักษณะโคโลนีและการย้อมติดสีแกรมของเชื้อ 30 สายพันธุ์ พบว่ามีเชื้อ 3 ชนิดที่มีลักษณะคล้ายกันมาก จึงตัดออก ในอาหารเหลว YM เพื่อให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ภาวะขวดเขย่า อัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) เป็นเวลา 24 ชม. นำส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าแรงตึงผิว(ดังแสดงในตารางที่ 6) พบว่าในจำนวนนี้มีอยู่ 12 สายพันธุ์ ที่ให้ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดี โดยพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงที่มีค่ามากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ซึ่งคำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การลดลง (\%Reduction)} = \frac{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น} - \text{ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้}}{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น}} \times 100$$

ซึ่งที่เปอร์เซ็นต์การลดลง 30 เปอร์เซ็นต์นี้ เมื่อกลับไปพิจารณาค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ มีค่าประมาณ 30 mN/m ซึ่งเป็นค่าแรงตึงผิวที่ต่ำสุดที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถลดแรงตึงผิวได้ (Desai และ Banat, 1997)

ตารางที่ 6 ค่าแรงตึงผิว และค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่คัด  
เลือกได้ 27 สายพันธุ์ ในอาหาร YM ที่ภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง  
( $30 \pm 2^{\circ}$ ซ) เป็นเวลา 24 ชม.

สายพันธุ์	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	เปอร์เซ็นต์ การลดลง	สายพันธุ์	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	เปอร์เซ็นต์ การลดลง
No.41	46.3	2.1	KD1	28.5	39.7
No.42	29.6	37.4	KD2	34.6	26.8
No.43	39.6	16.3	KD3	29.9	36.8
A41	29.7	37.2	KD4	31.0	34.5
Co51	38.5	18.6	KG2	29.5	37.6
Co52	30.6	35.3	KG3	31.8	32.8
F71	41.0	13.3	KG4	46.6	1.5
TB12	44.0	7.0	CT1	34.3	27.5
TB13	47.0	0.6	AK1	56.5	-19.5
PJ1	34.3	27.5	AK2	32.0	33.3
PJ2	41.9	11.4	AK3	31.4	33.6
PJ3	35.0	26.0	AK4	36.0	23.9
PJ6	41.3	12.7	AH11	31.3	33.8
			AH21	31.6	33.2

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์การลดลง(%Reduction) =  $\frac{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น} - \text{ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้}}{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น}} \times 100$

ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้นของอาหารเหลว YM = 47.3 mN/m

จากตารางที่ 6 เลือกเชื้อที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปมาเลี้ยงในอาหาร YM + 3%NaCl ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของไฮเดียมคลอไรด์ในน้ำทะเลทั่วไป จากนั้นนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าแรงตึงผิว คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงและค่าการกระจายตัวของน้ำมัน

ตารางที่ 7 ค่าแรงตึงผิว เปอร์เซ็นต์การลดลง และค่าการกระจายตัวของน้ำมันของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ 12 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้ ในอาหาร YM+ 3%NaCl ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °ซ) ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

สายพันธุ์	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	เปอร์เซ็นต์การลดลง	ค่าการกระจายตัว ของน้ำมัน (cm <sup>2</sup> )
A41	28.8	29.9	19.6
No.42	29.6	29.3	12.6
Co52	29.0	29.3	5.0
KD1	35.5	13.4	3.8
KD3	35.5	13.4	1.6
KD4	30.5	15.6	3.1
AK2	31.0	24.4	3.5
AK3	31.0	24.4	4.5
KG2	31.5	23.1	6.1
KG3	30.5	25.6	2.3
AH11	30.0	26.8	4.2
AH21	30.5	25.6	0.8

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์การลดลง(%Reduction) =  $\frac{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น} - \text{ค่าแรงตึงผิวที่วัดได้}}{\text{ค่าแรงตึงผิวเริ่มต้น}} \times 100$

เมื่อค่าแรงตึงผิวเริ่มต้นของอาหารเหลว YM + 3 %NaCl = 41 mN/m

จากตารางที่ 7 เชื้อทั้ง 12 สายพันธุ์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวใกล้เคียงกันหลายสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การลดลง แต่เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่าเชื้อสายพันธุ์ A41 ให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ  $19.6 \text{ cm}^2$  ค่าแรงตึงผิว  $28.8 \text{ mN/m}$  และค่าเปอร์เซ็นต์การลดลง 29.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงนำเชื้อสายพันธุ์ A41 ไปจำแนกสกุลและศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

### 3.2 การจำแนกสกุลจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ตามอนุกรมวิธาน

#### 3.2.1 ผลการจำแนกสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ A41 ทางอนุกรมวิธาน

จากการจำแนกสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ A41 ทางอนุกรมวิธานตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) และ วิธีของ Persson และ Mollin (1987) พบว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ A41 มีลักษณะโคโคนีกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น มีสีเขียวรอบๆ โคโคนี ผิวเรียบเป็นมัน การย้อมสีติดสีแกรมลบ ไม่มีการสร้างสปอร์ รูปร่างเชื้อเป็นท่อนสั้นๆ มีขนาดกว้าง  $0.5 - 1.0$  ไมครอน ยาว  $2.5 - 4.0$  ไมครอน สามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารกึ่งเหลว การทดสอบที่ให้ผลบวก คือ การย่อยสลายเจลาติน การทดสอบการใช้ซิเตรท การรีดิวซ์ไนเตรท กิจกรรมเอนไซม์แคตาเลส การทดสอบออกซิเดส ส่วนการทดสอบที่ให้ผลลบ คือ การย่อยสลายแป้ง การเจริญบนอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) agar ให้ผลเป็นกลางทั้งส่วนเอียงและส่วนล่าง (neutral/neutral) ไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $\text{H}_2\text{S}$ ) ไม่สร้างกาซ การเจริญบนอาหาร MacCONKEY agar เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ ซึ่งแสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก non-lactose fermentor ผลการทดลองได้แสดงไว้ดังตารางที่ 8 สำหรับการให้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ นั้น ได้แสดงไว้ตารางที่ 9 ซึ่งจะเห็นว่าทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ A41 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 357 (สายพันธุ์เทียบเคียง) ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกันกับ *Pseudomonas aeruginosa* อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) และ Laboratory Exercises in microbiology (Wistreich and Lechtman, 1988)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบเพื่อการจำแนกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ A41

การทดสอบ	แบคทีเรียสายพันธุ์ A41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TISTR 357	<i>Pseudomonas</i> sp. (ตาม Bergey's, 1994)
ลักษณะโคโลนี	สีขาว มีสีเขียวรอบๆ โคโลนี ขอบเรียบ กลม ผิวเป็นมัน	สีขาวขุ่น ขอบเรียบ กลม ผิวเป็นมัน	สีขาวขุ่น ขอบเรียบ กลม ผิวเป็นมัน บางสายพันธุ์สร้างเม็ดสี รอบๆโคโลนี
การย้อมติดสีแกรม	Gm-	Gm-	Gm-
การสร้างสปอร์	-	-	-
รูปร่างและขนาดของ เซลล์	ท่อนสั้น มีขนาดใหญ่ กว้าง 0.5-1.0 ไมครอน ยาว 2.5-4.0 ไมครอน	ท่อนสั้น กว้าง 0.5-1.0 ไมครอน ยาว 2.5-4.0 ไมครอน	ท่อนสั้น กว้าง 0.5-1.0 ไมครอน ยาว 1.0-4.0 ไมครอน
Motility	+	+	+
Growth at 50 °C	+	+	4-50 °C
Gelatin liquefaction	+	+	+
Triple sugar iron (TSI)	Neutral / Neutral No H <sub>2</sub> S , no gas	Neutral /Neutral No H <sub>2</sub> S , no gas	Neutral / Neutral No H <sub>2</sub> S , no gas
MacCONKEY agar	Lactose-	Lactose-	Lactose-
Catalase test	+	+	+
Oxidase test	+	+	+
Citrate test	+	+	+
Nitrate test	+	+	+
Starch hydrolysis	-	-	-

- : negative      + : positive

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียสายพันธุ์ A41

แหล่งคาร์บอน	แบคทีเรียสายพันธุ์ A41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TISTR 357	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ตามเบอร์รี่ (1994)
Glucose	+	+	+
Rhamnose	-	-	-
Galactose	+	+	-
Lactose	-	-	-
Maltose	-	-	-
Fructose	+	+	+
Sucrose	-	-	-
Mannose	+	+	-
Cellubiose	-	-	-
Arabinose	+	+	-
Xylose	+	+	-
Mannitol	-	-	+
Sorbitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Glycerol	+	+	+

- : negative + : positive

จากการจำแนกสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์ A41 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ A41 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* ซึ่งผลการทดสอบของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ A41 ได้ผลใกล้เคียงกับสายพันธุ์เทียบเคียง คือ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 357 และ *Pseudomonas aeruginosa* ตามหลักการจำแนกเชื้อตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt และคณะ, 1994) ดังนั้นต่อไปนี้จะเรียกแบคทีเรียสายพันธุ์ A41 ว่า *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41

### 3.3 ชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41

จากการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหาร NB และ NB+3%NaCl LB และ LB+3%NaCl อาหารเหลวกำหนดสูตร (defined medium, DM) และ DM +3%NaCl และ YM และ YM+ 3%NaCl เลี้ยงเชื้อในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °C) เป็นเวลา 24 ชม. นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปตรวจวัดการเจริญและแยกส่วนน้ำใสไปวัดประสิทธิภาพในการผลิตสารลดแรงตึงผิว ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10

จากผลการทดลองตารางที่ 10 เมื่อพิจารณาค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600}$ ) พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เจริญได้ดีในอาหารเหลวกำหนดสูตร อาหาร LB และอาหาร YM ซึ่งมีค่า  $OD_{600}$  เท่ากับ 5.4, 4.5 และ 3.6 ตามลำดับ แต่มีการเจริญน้อยในอาหาร NB การเจริญในอาหารแต่ละชนิดที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์จะต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงและค่าการกระจายตัวของน้ำมัน พบว่า มีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกำหนดสูตร ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การลดลง 35.5 เปอร์เซ็นต์ และค่าการกระจายตัวของน้ำมัน  $28.3 \text{ cm}^2$  ดังนั้น จึงเลือกอาหารเหลวกำหนดสูตร เพื่อศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ต่อไป



ตารางที่ 10 ผลการเจริญของ *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 พีเอช ค่าแรงตึงผิว เเปอร์เซ็นต์การลดลง และค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °ซ) เป็นเวลา 24 ชม.

อาหารก่อนการเลี้ยงเชื้อ			อาหารหลังการเลี้ยงเชื้อ				
ชนิดอาหาร	พีเอช	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	พีเอชสุดท้าย	OD <sub>600</sub>	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	เปอร์เซ็นต์การลดลง	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm <sup>2</sup> )
DM	6.9	45	6.2	5.4	29	35.5	28.3
DM+3% NaCl	6.5	47	6.8	5.0	32	31.9	3.1
LB	6.6	42	5.5	4.5	30	28.6	28.3
LB+3% NaCl	6.4	40	5.4	4.0	30	25.0	3.1
NB	6.9	40	8.5	1.0	38	5.0	1.6
NB+3% NaCl	6.7	39	8.9	1.7	38	2.6	1.0
YM	6.4	40	4.4	3.6	31	22.5	19.6
YM+3% NaCl	6.0	40	4.9	3.4	32	20	1.8

#### 3.4 ผลการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี TLC

เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 ในอาหารเหลว กำหนดสูตรที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน(ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5)มาทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีข้อ 2.6.1 และวิเคราะห์ด้วยวิธีTLC ปรากฏว่า แยกสารบริสุทธิ์บางส่วนได้เป็น 4 ส่วน ที่มีค่า R<sub>f</sub> (Retardation fraction)เท่ากับ 0.33 0.53 0.83และ 0.92 ซึ่งให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายตัวของน้ำมันลดหลั่นลงไปตามลำดับ โดยจุดที่ให้ค่า R<sub>f</sub> ต่ำสุด ให้ค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุด และมีความสัมพันธ์สวนทางกันระหว่างค่า R<sub>f</sub> และสมบัติการกระจายตัวของน้ำมัน เมื่อเปรียบเทียบกับเซอร์แฟกตินซึ่งมีค่า R<sub>f</sub> 0.48 จะเห็นว่ามีค่าแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเซอร์แฟกติน

เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์คนละสกุล จึงทำให้มีค่า  $R_f$  ต่างกัน (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่า  $R_f$  ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ

Fraction	$R_f$ values	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน( $cm^2$ )
เซอร์แฟกติน	0.48	113.1
1	0.33	176.7
2	0.53	15.9
3	0.83	3.1
4	0.92	0.8

### 3.5 ผลการวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC และHPLC-MS

เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำบริสุทธิ์บางส่วนและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี TLC (preparative TLC) ได้สารบริสุทธิ์ที่มีค่า  $R_f$  ต่างกัน 5 ส่วน ได้แก่ 0.37 0.59 0.83 0.88 และ 0.95 ได้สารปริมาณ 1.0 6.0 16.6 39.0 และ 26.5 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีสมบัติการกระจายตัวของน้ำมันต่างๆกันไป (ตารางที่ 12)จากนั้นนำสารบริสุทธิ์แต่ละส่วนนี้มาวิเคราะห์ด้วย HPLC แต่ส่วนที่ 1 ไม่ได้วิเคราะห์เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยเกินไป สำหรับผลการวิเคราะห์ส่วนที่ 2 ด้วย HPLC พบว่ามี 4 ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบการกระจายน้ำมันเป็นบวก ซึ่งมีค่า RT (Retention time)เท่ากับ 20.09 24.44 27.62 และ 28.98 เมื่อนำแต่ละลำดับส่วนไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS พบว่า มีค่ามวลต่อประจุ ( $m/z$ )เท่ากับ 982 572 974 1494 และ 1322 ตามลำดับ สำหรับส่วนที่ 3 และ 4 ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.83 และ 0.88 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันมาก เมื่อนำไปวิเคราะห์โดย HPLC พบว่าส่วนที่ 3 มีลำดับส่วนที่ให้ผลบวกในการทดสอบสมบัติการกระจายตัวของน้ำมัน มีค่า RT เท่ากับ 20.3 และ 22.1 ส่วนที่ 4 มีลำดับส่วนที่ให้ผลบวกในการทดสอบสมบัติการกระจายตัวของน้ำมัน มีค่า RT เท่ากับ 20.2 และ 22.2 และเมื่อนำแต่ละ RT ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-MS พบว่า มีค่ามวลต่อประจุ ( $m/z$ )เท่ากับ 600 และ 772 เท่ากัน แสดงว่า ส่วนที่ 3 และส่วนที่ 4 เป็นสารตัวเดียวกัน ส่วนที่ 75 มีลำดับส่วนที่ให้ผลบวกในการทดสอบสมบัติการกระจายตัวของน้ำมัน มีค่า  $R_f$  สูงที่สุดเท่า

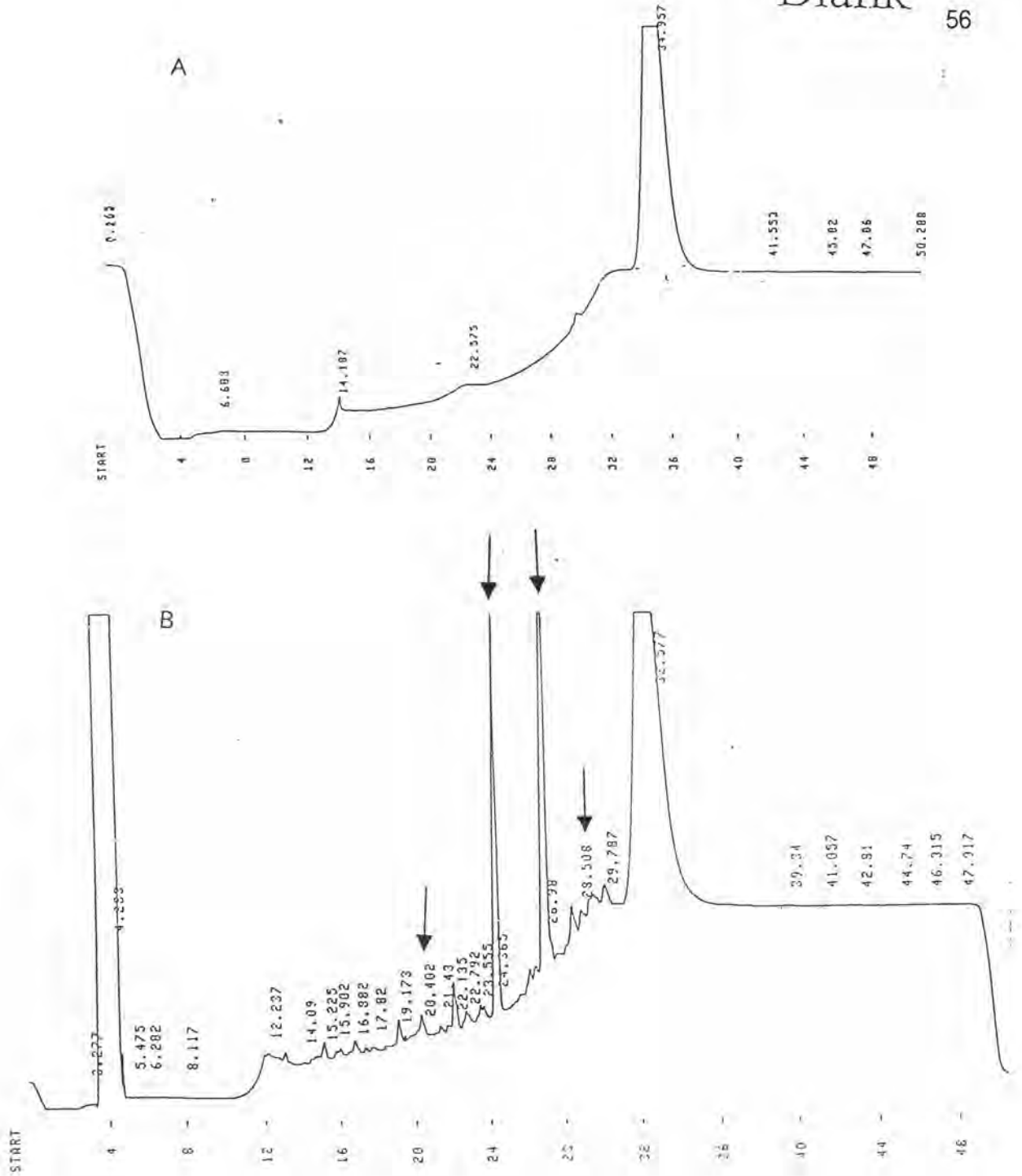
กับ 0.95 เมื่อนำไปวิเคราะห์โดย HPLC พบว่า มีลำดับส่วนที่ให้ผลบวกในการทดสอบสมบัติการกระจายตัวของน้ำมัน มีค่า RT เท่ากับ 22.1 และเมื่อนำไปวิเคราะห์ HPLC-MS พบว่ามีค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 1034 ค่ามวลต่อประจุแสดงในตารางที่ 12 รูปโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และ HPLC-MS แสดงในรูปที่ 21 ถึง 26 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 ค่ามวลต่อประจุของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ที่ทำบริสุทธิ์ แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-MS

Fraction	R <sub>f</sub>	ปริมาณ (มก.)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm <sup>2</sup> )	RTที่ให้ผลบวก	m/z
1	0.37	1.0	-	-	-
2	0.59	6.0	72.4*	20.09 24.48 27.62 28-28.5	982 572 974,1494 1322
3	0.83	1.66.0	4.97**	20.3 22.1	600 772
4	0.88	39.0	6.6**	20.4 22.2	600 774
75	0.95	2.65	9.0**	22.1	1034

\* ส่วนที่ 2 ละลายใน 10 % อะซิโตนไนโตรที่ ก่อนแล้วนำไปทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน

\*\* ส่วนที่ 3, 4 และ 5 ละลายใน 100 % อะซิโตนไนโตรที่ และเจือจางเป็น 10 % อะซิโตนไนโตรที่ โดยการเติมน้ำกลั่นก่อนแล้วนำไปทดสอบการกระจายตัวของน้ำมัน



รูปที่ 21 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp.

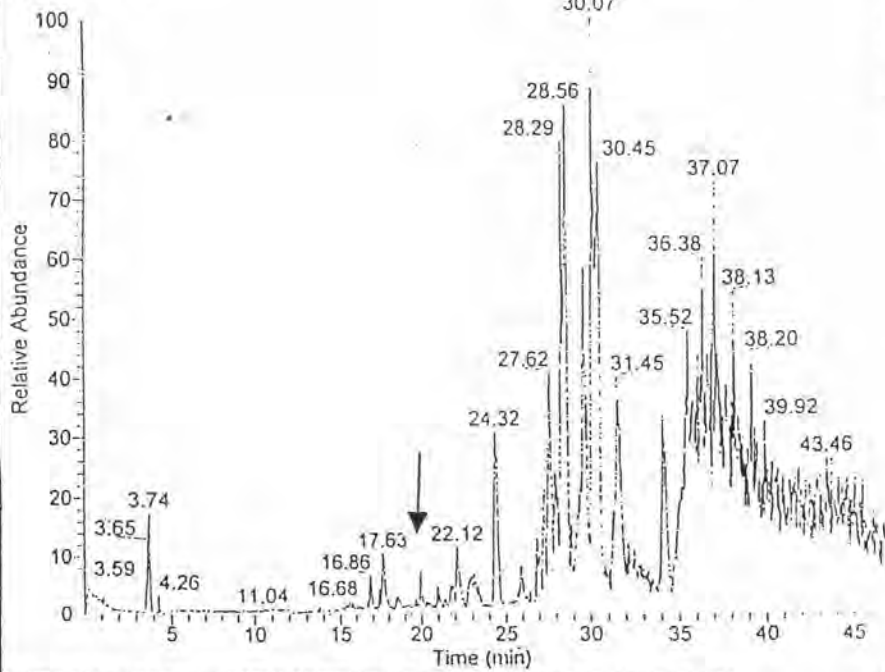
สายพันธุ์ A41 ที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC

A blank

B ส่วนที่ 2

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวก

RT: 0.00 - 47.10

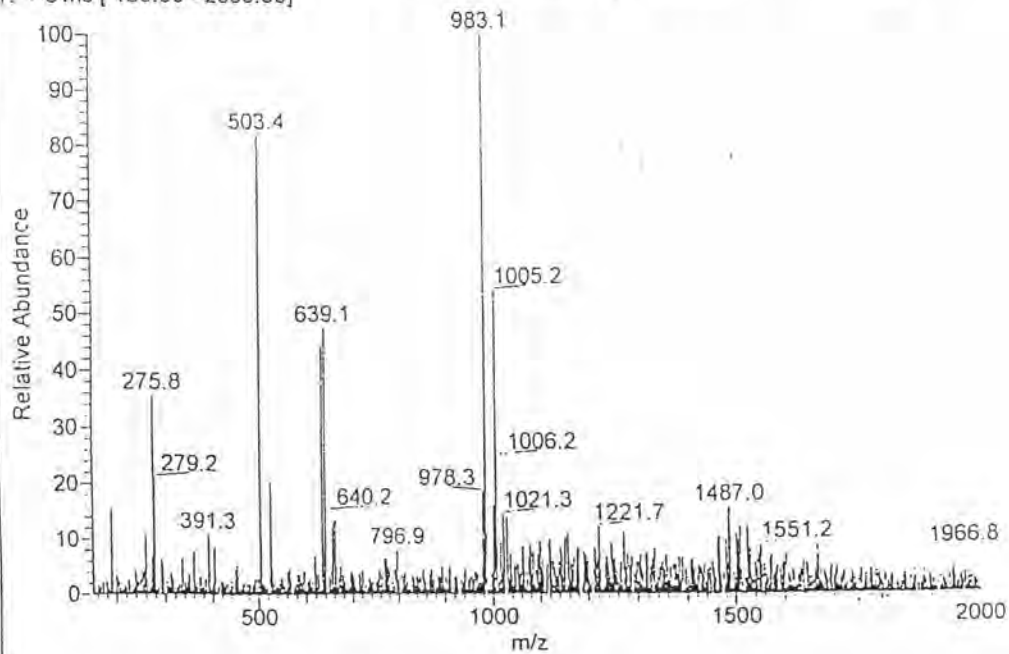


NL:  
8.99E6  
Base Peak

(a)

S#: 815-828 RT: 19.80-20.09 AV: 14 SB: 41 2.28-3.25 NL: 2.64E5  
T: + c ms [ 150.00 - 2000.00]

(b)



รูปที่ 22 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp.

สายพันธุ์ A41 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-MS

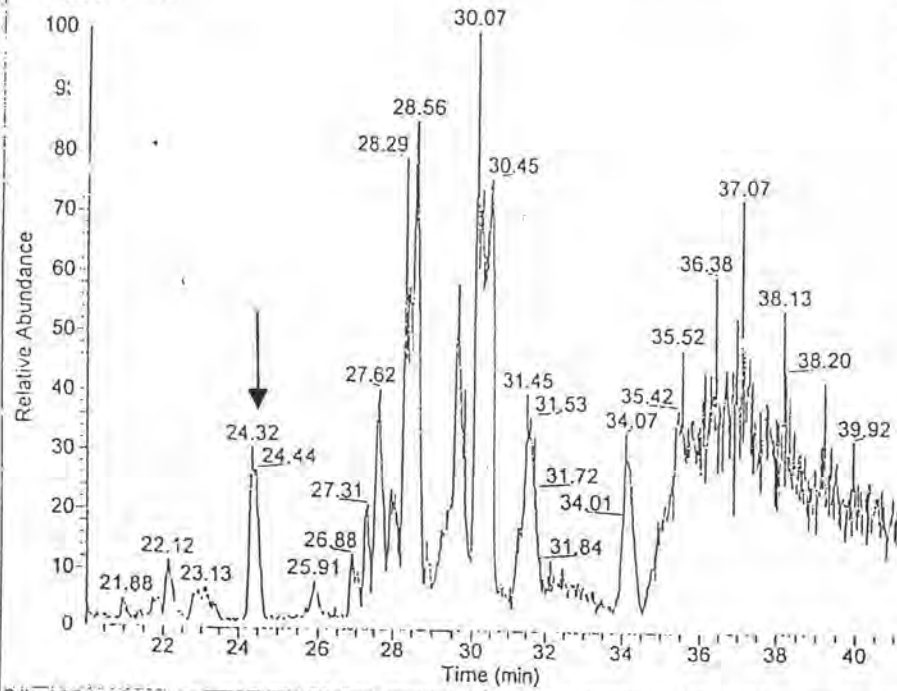
(a) ค่า retention time (RT) ของลำดับส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ ส่วนที่ 2 ด้วย HPLC

(b) Mass spectrum ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 20.09

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวกและนำไปวิเคราะห์ด้วย MS

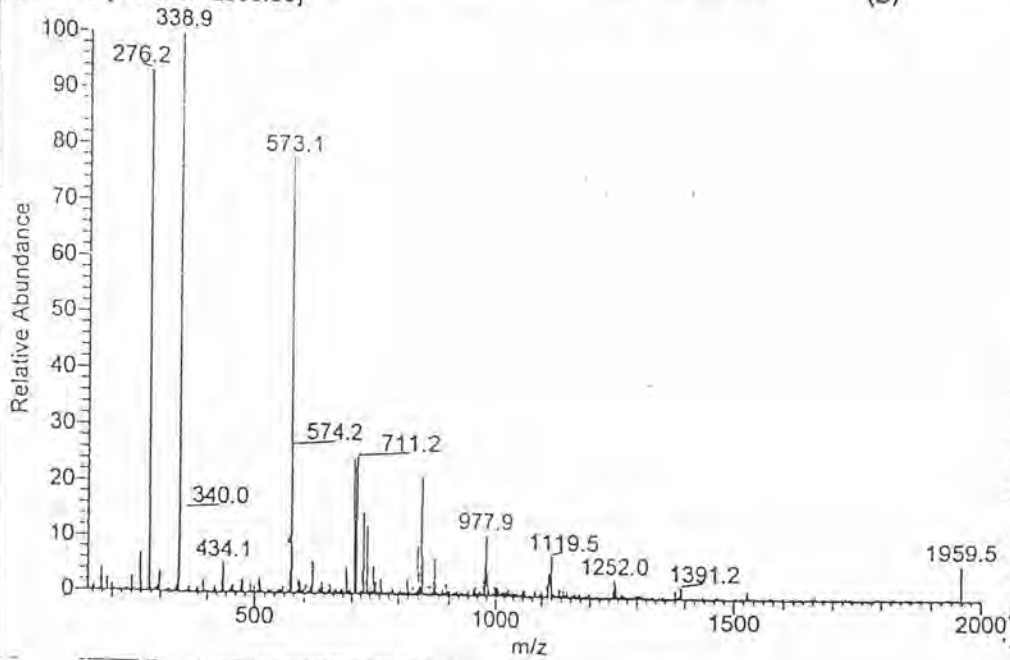
RT: 20.03 - 41.11

NL: 8.99E6 58  
Base Peak  
(a)



S#: 1001-1011 RT: 24.28-24.48 AV: 11 SB: 41 2.28-3.25 NL: 2.24E6  
T: + c ms [ 150.00 - 2000.00]

(b)



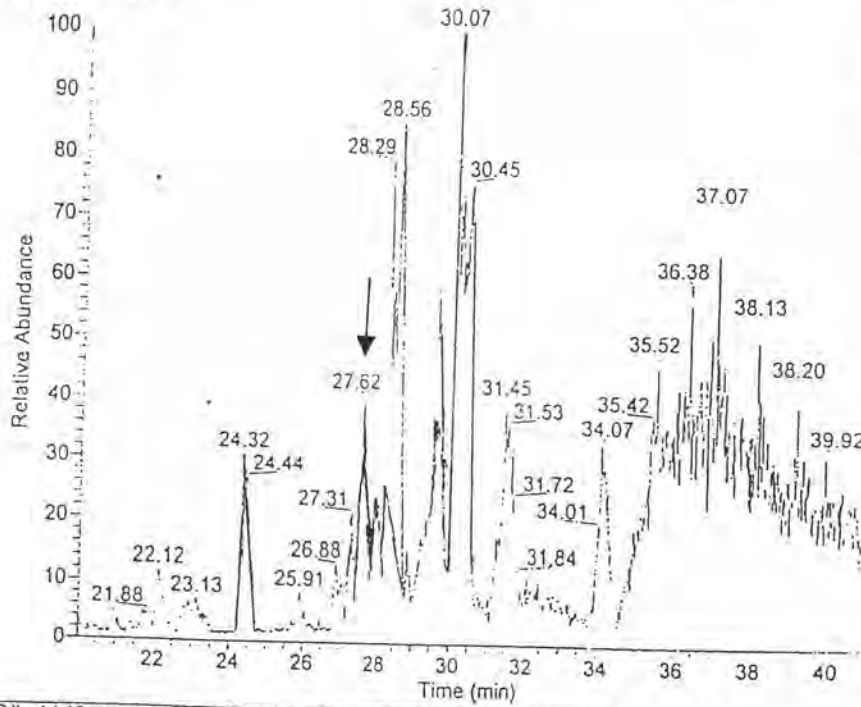
รูปที่ 22 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-MS (ต่อ)

(a) ค่า retention time (RT) ของลำดับส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนที่ 2 ด้วย HPLC

(b) Mass spectrum ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 24.48

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวกและนำไปวิเคราะห์ด้วย MS

RT: 20.03 - 41.11



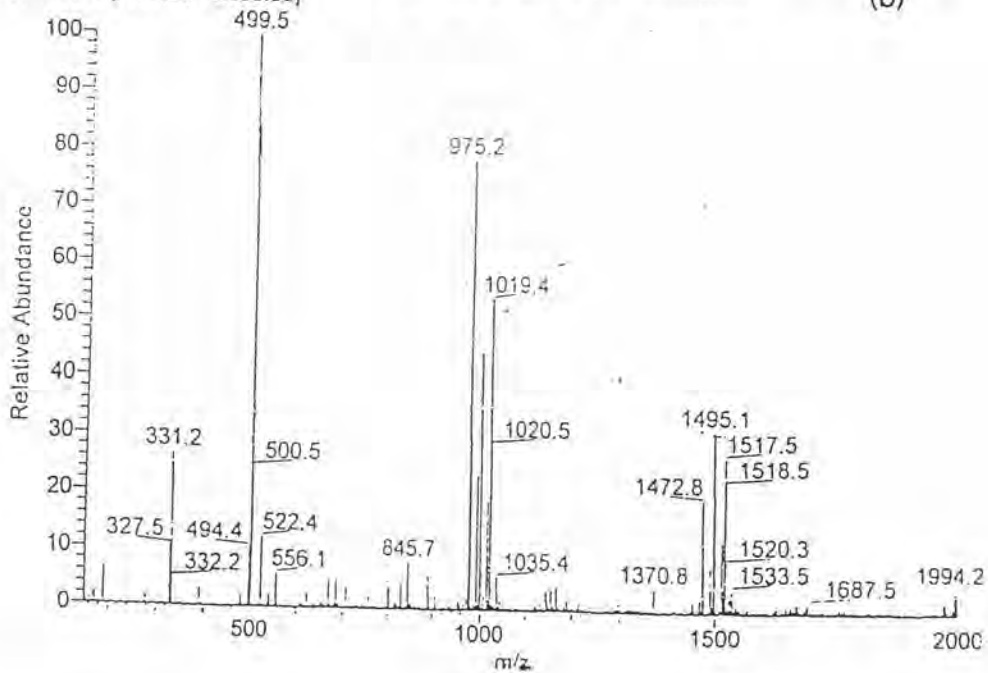
NL: 8.99E6  
Base Peak

(a)

S#: 1143-1154 RT: 27.48-27.69 AV: 12 SB: 41 2.28-3.25 NL: 2.67E6

T: + c ms [ 150.00 - 2000.00]

(b)



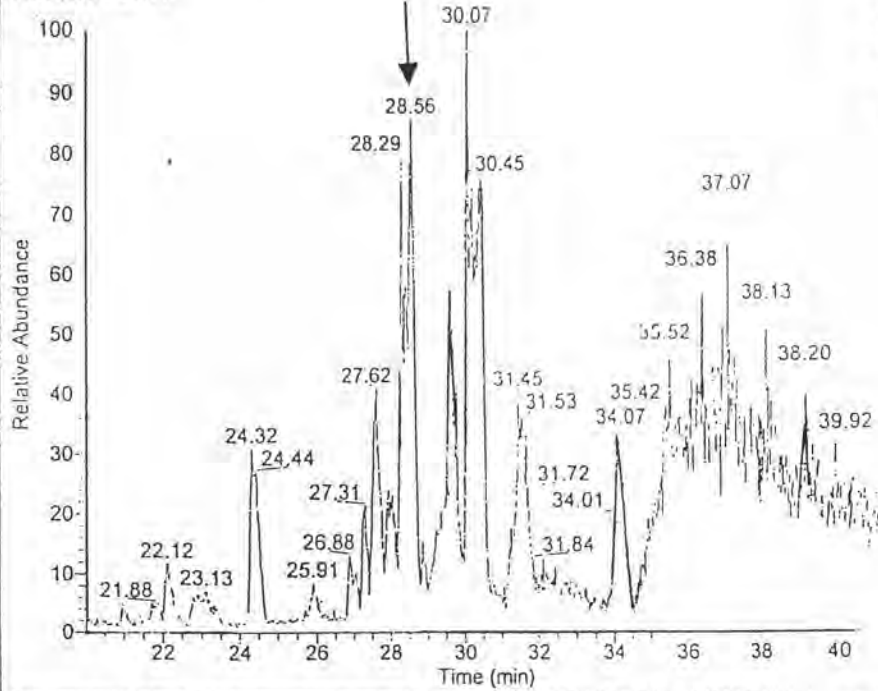
รูปที่ 22 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-MS (ต่อ)

(a) ค่า retention time (RT) ของลำดับส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ ส่วนที่ 2 ด้วย HPLC

(b) Mass spectrum ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 27.69

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวกและนำไปวิเคราะห์ด้วย MS

RT: 20.03 - 41.11

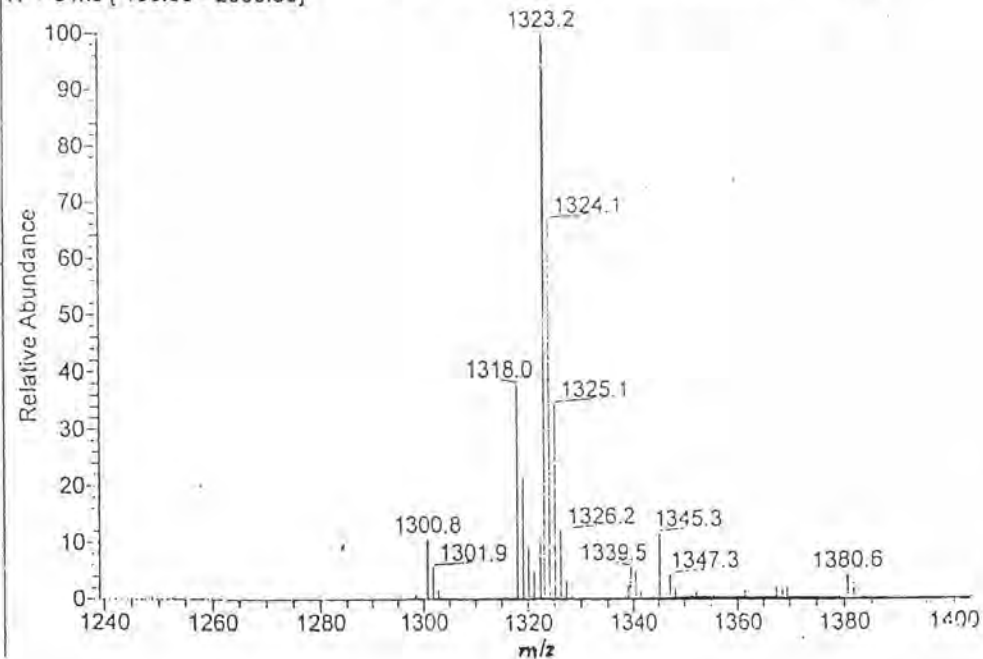
NL:  
8.99E6  
Base Peak

60

(a)

S#: 1177-1203 RT: 28.17-28.67 AV: 27 SB: 41 2.28-3.25 NL: 4.59E6

(b)



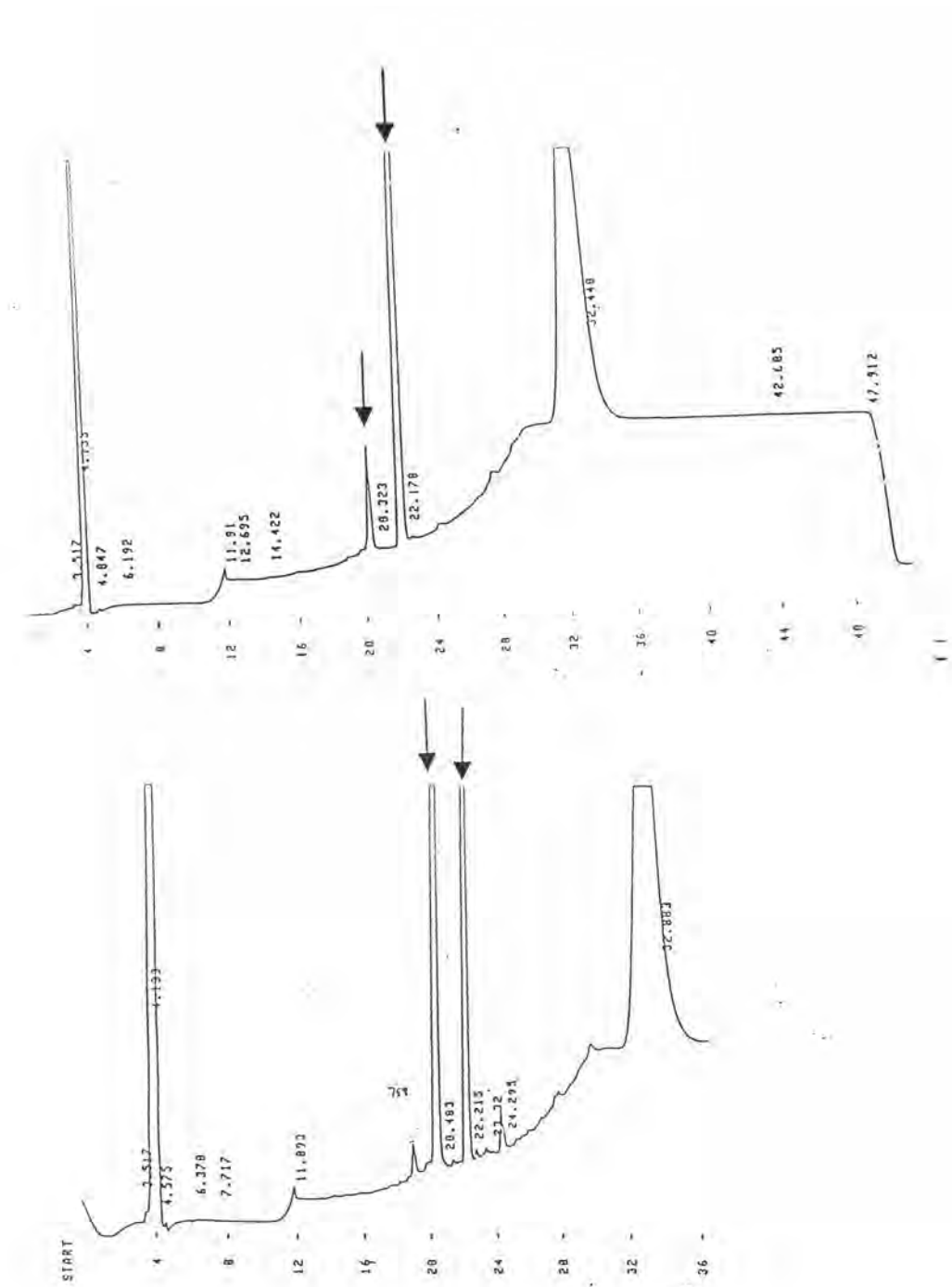
รูปที่ 22 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-MS (ต่อ)

(a) ค่า retention time (RT) ของลำดับส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ ส่วนที่ 2 ด้วย HPLC

(b) Mass spectrum ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 28.56

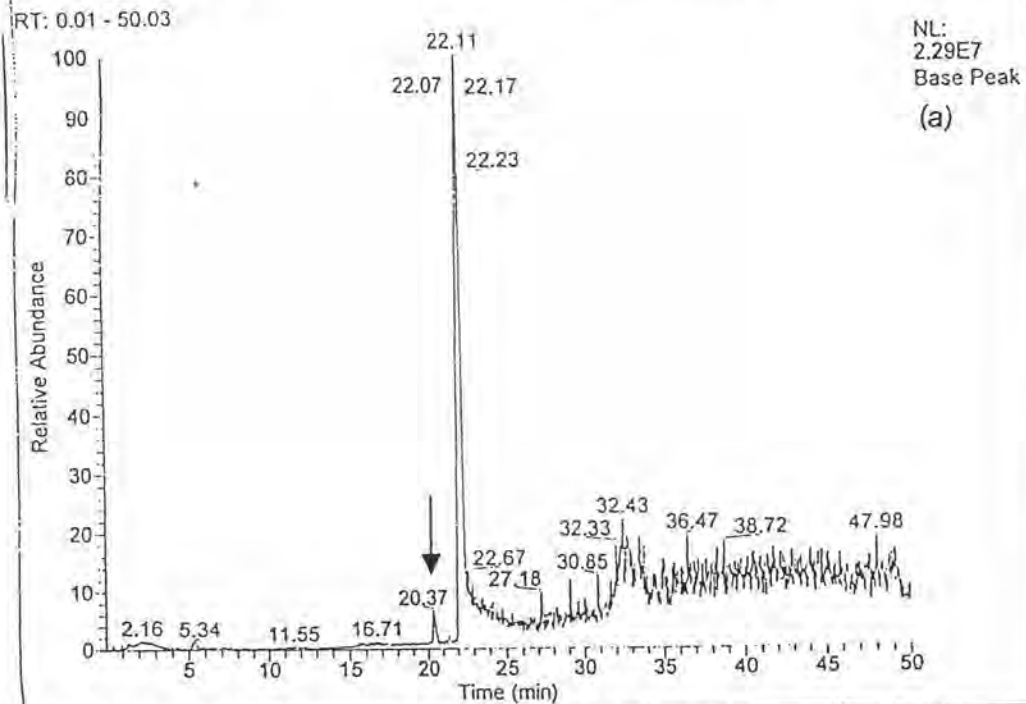
→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวกและนำไปวิเคราะห์ด้วย MS





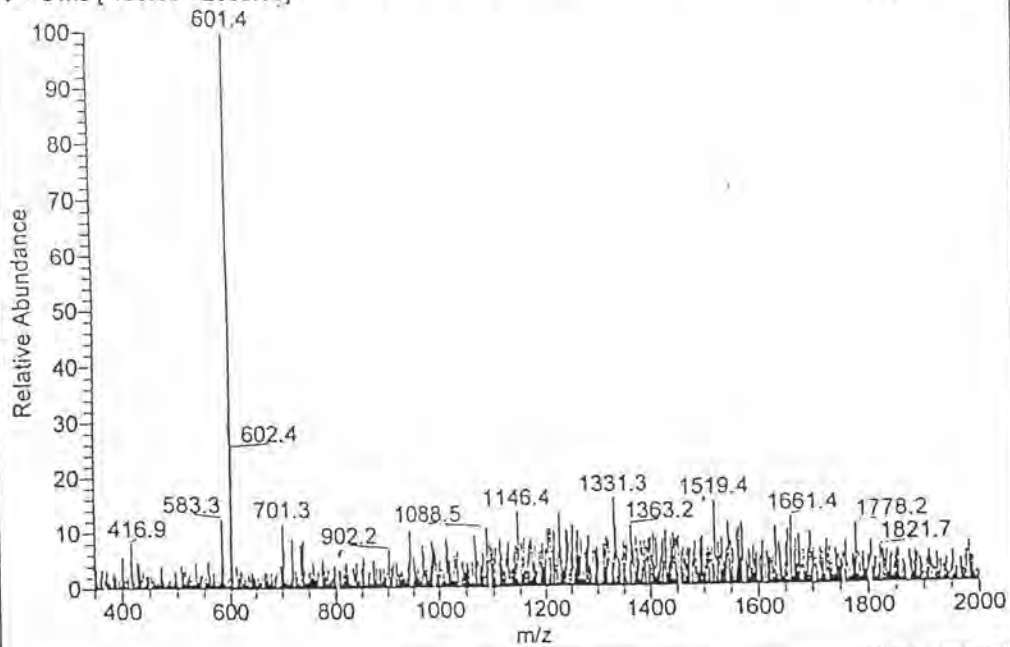
รูปที่ 23 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ของส่วนที่ 3 และ 4 ที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวก



S#: 835-858 RT: 20.19-20.70 AV: 24 SB: 41 2.26-3.24 NL: 1.71E5  
T: + c ms [ 150.00 - 2000.00]

(b)

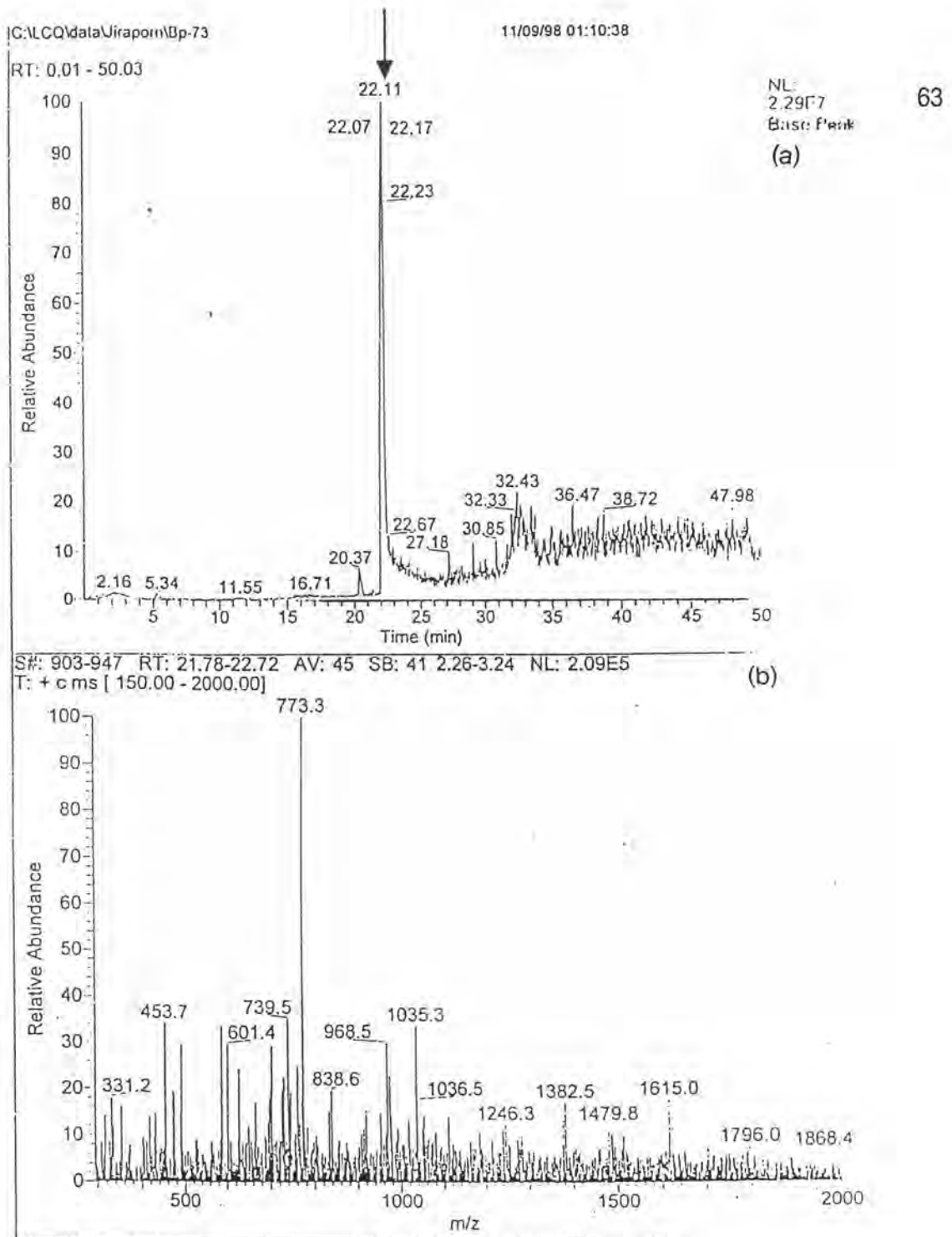


รูปที่ 24 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-MS

(a) ค่า retention time (RT) ของลำดับส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนที่ 3 และ 4 ด้วย HPLC

(b) Mass spectrum ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 20.3

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวกและนำไปวิเคราะห์ด้วย MS

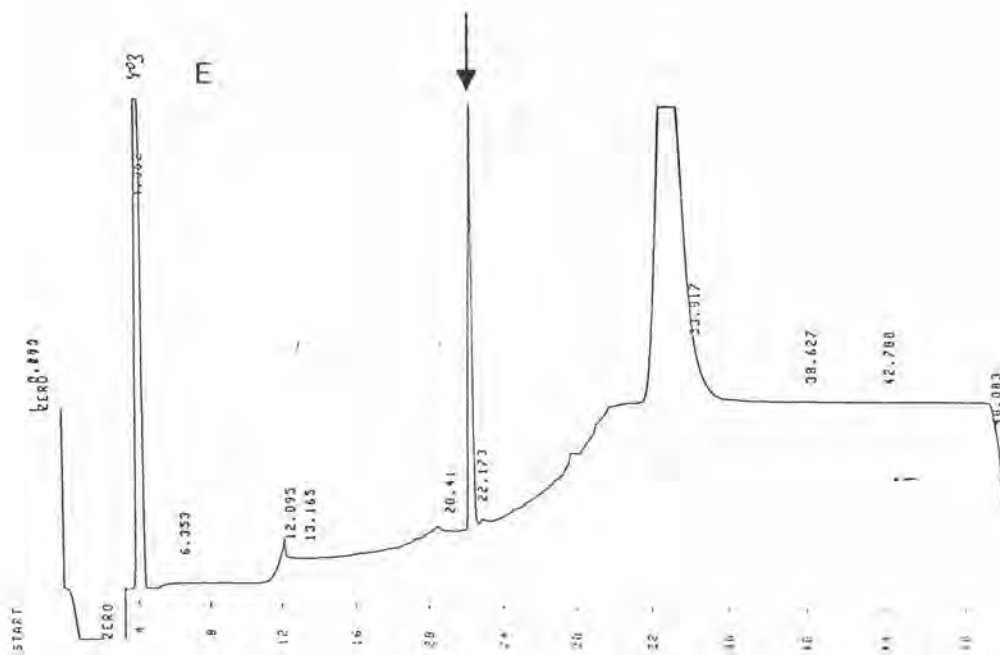


รูปที่ 24 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-MS (ต่อ)

(a) ค่า retention time (RT) ของลำดับส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนที่ 3 และ 4 ด้วย HPLC

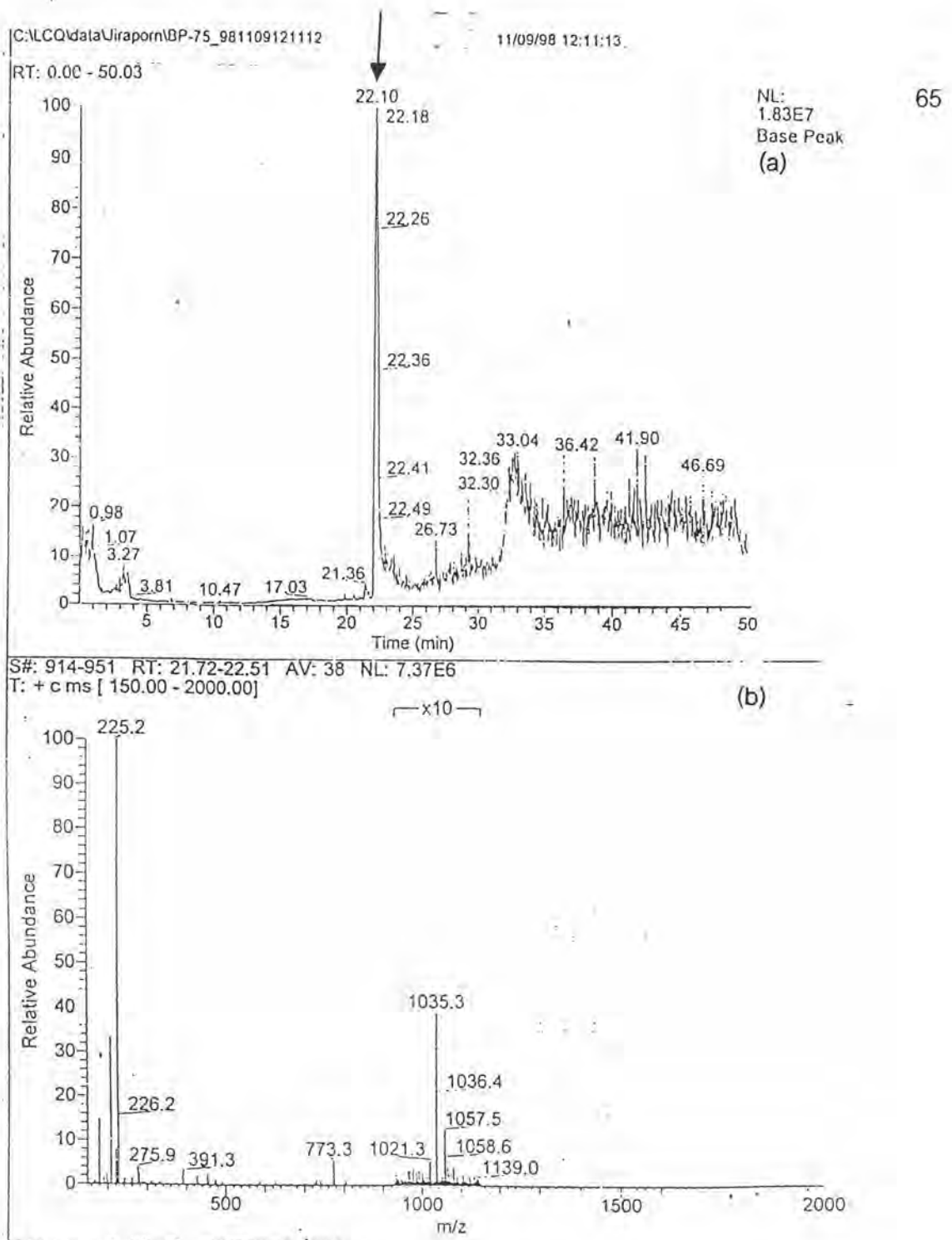
(b) Mass spectrum ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 22.2

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวกและนำไปวิเคราะห์ด้วย MS



รูปที่ 25 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ของส่วนที่ 5 วิเคราะห์โดยวิธี HPLC

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวก



รูปที่ 26 โครมาโตแกรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-MS

(a) ค่า retention time (RT) ของลำดับส่วนที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนที่ 5 ด้วย HPLC

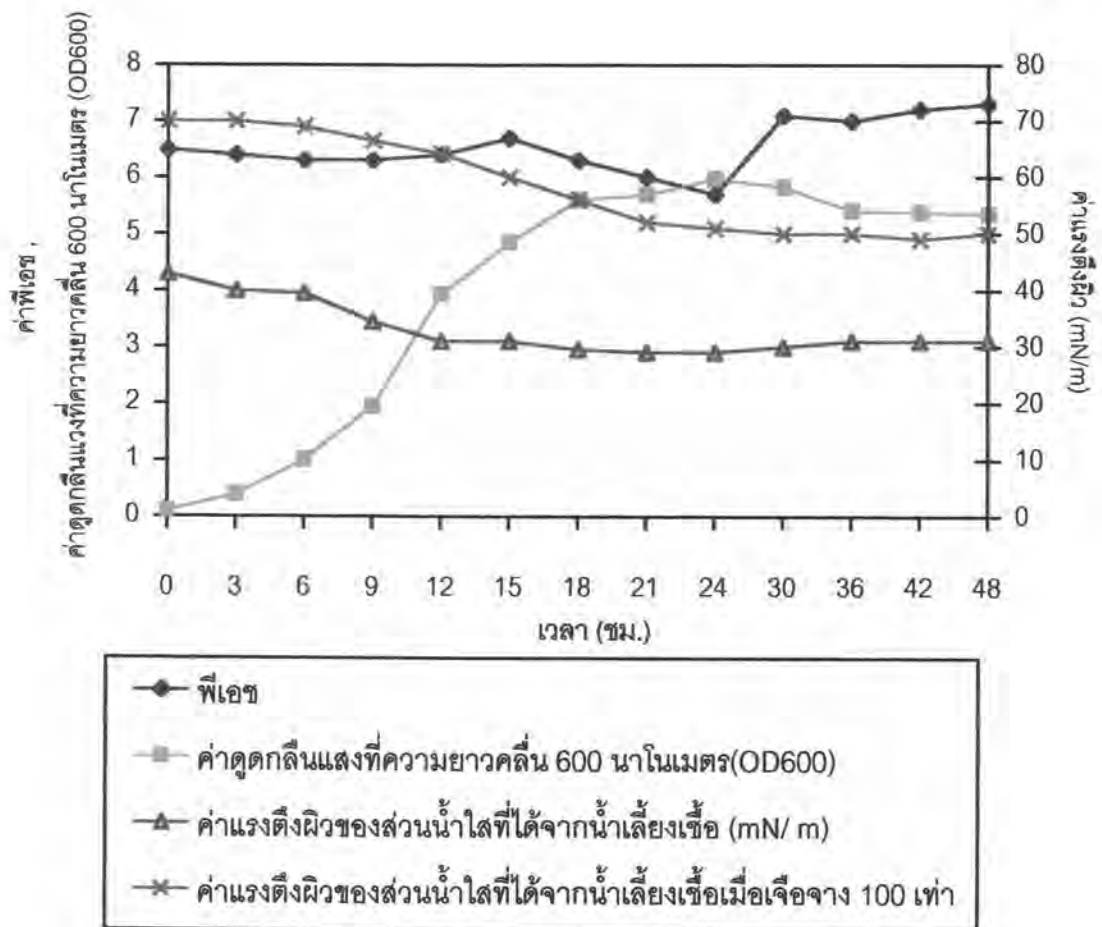
(b) Mass spectrum ของลำดับส่วนที่มีค่า RT เท่ากับ 22.1

→ ลำดับส่วนที่ให้ผลการทดสอบสมบัติการกระจายน้ำมันเป็นผลบวกและนำไปวิเคราะห์ด้วย MS

จากการวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 พบว่า เป็นสารที่น่าสนใจที่จะศึกษาการผลิตต่อไป โดยศึกษาหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

### 3.6 รูปแบบการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในอาหารเหลวกำหนดสูตร

เมื่อเลี้ยง *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร(ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) ที่ภาวะการเลี้ยงเชื้อในข้อ 2.3.2 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชม. ในช่วงเวลา 24 ชม. แรก และทุก 6 ชม. ในเวลาต่อมา จนครบเวลา 48 ชม. จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 น. โนเมตร และค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อนำส่วนน้ำใสไปวัดค่าแรงตึงผิวและค่าแรงตึงผิวเมื่อเจือจางส่วนน้ำใส 100 เท่า พบว่าเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะทวีคูณ ในช่วงเวลาที่ 3 จากนั้นเข้าสู่ระยะที่เชื้อมีการเจริญคงที่ ในช่วงเวลาที่ 24 สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ในช่วงช่วงเวลาที่ 0 ถึง 15 มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 6.2 – 6.8 และเริ่มลดลงจนมีค่าต่ำสุด เท่ากับ 5.7 ในช่วงเวลาที่ 24 และเริ่มสูงขึ้นและคงที่ในช่วงเวลาที่ต่อมา ที่พีเอชประมาณ 7.0 ในขณะที่ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อและค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อเจือจาง 100 เท่า เริ่มมีค่าลดลงตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 3 จนเริ่มมีค่าแรงตึงผิวต่ำสุดและคงที่ เท่ากับ 29.0 mN/m และ 51.0 mN/m ตามลำดับ ในช่วงเวลาที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 27 จากรูปแบบการเจริญและประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เชื้อมีการเจริญสูงสุด ( $OD_{600} = 5.9$ ) และมีค่าแรงตึงผิวได้ต่ำสุด ในช่วงเวลาที่ 24 ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใส เท่ากับ 29.0 mN/m และค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใส เมื่อเจือจาง 100 เท่า 51.0 mN/m จึงเลือกเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 27 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การเจริญของเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเจือจาง 100 เท่า ของ *Pseudomonas sp.* สายพันธุ์ A41

### 3.7 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 3.7.1 ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อเลี้ยง *Pseudomonas sp.* สายพันธุ์ A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส (ซูโครสมิตรผล) และน้ำมันปาล์ม ปริมาณ 2 % w/v และมีแอมโมเนียมไนเตรท 0.4 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ภาวะในข้อ 2.3 พบว่า น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคส และซูโครส ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13 โดยมีค่า  $CMC^{-1}$  เท่ากับ 33.3 คิดเป็น 1.3 เท่าของค่า  $CMC^{-1}$  เมื่อใช้

กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ค่า การกระจายตัวของน้ำมัน เท่ากับ  $86.2 \text{ cm}^2$  และเมื่อแปร ปริมาณน้ำมันปาล์มเป็น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 %w/v เลี้ยงเชื้อในภาวะเช่นเดิม พบว่า ปริมาณน้ำมันปาล์มที่เหมาะสม คือ 2 %w/v (ตารางที่ 14) โดยมีค่า  $\text{CMC}^{-1}$  สูงสุดเท่ากับ 56 และค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุดเท่ากับ  $113.1 \text{ cm}^2$  ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงใช้น้ำมันปาล์ม ปริมาณ 2 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 13 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกำหนดสูตร(ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิห้อง( $30 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

แหล่งคาร์บอน (2%w/v)	พีเอช		OD <sub>600</sub>	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)		CMC <sup>-1</sup>	ค่า การ กระจายตัวของ น้ำมัน (cm <sup>2</sup> )
	เริ่มต้น	สุดท้าย		เริ่มต้น	สุดท้าย		
กลูโคส	6.8	6.0	4.9	45	29.5	25	38.7
ซูโครส	6.9	6.9	0.4	44	38.3	-	0.5
น้ำมันปาล์ม	6.9	6.9	5.8	48	30.2	33.3	86.2

ตารางที่ 14 ผลของปริมาณน้ำมันปาล์มต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกำหนดสูตร(ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) หลังจาก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง( $30 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ภาวะขวดเขย่าที่อัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

%w/v น้ำมันปาล์ม	พีเอช สุดท้าย	น้ำหนักเซลล์ แห้ง(g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	CMC <sup>-1</sup>	ค่าการเจายน้ำมัน (cm <sup>2</sup> )
0.5	7.6	3.3	30	-	8.1
1.0	6.9	3.8	30	33	71.9
1.5	6.9	3.6	30	50	95.0
2.0	6.9	3.7	30	56	113.1
2.5	6.9	4.2	30	50	68.4



### 3.7.2 ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย

#### *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41

จากการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้อาหารเหลวกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปลาปริมาณ 2 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอน แปรชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 4 ชนิด ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรทที่ 0.4 %w/v ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.14 %w/v เลี้ยงเชื้อในภาวะตามข้อ 2.3.2 พบว่า แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 30.1 mN/m มีค่า  $CMC^{-1}$  สูงสุด เท่ากับ 43 และค่าการกระจายตัวของน้ำมันเท่ากับ 132.8 cm<sup>2</sup> (ตารางที่ 15) และเมื่อแปรปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท เป็น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 %w/v เทียบเท่ากับปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.35 0.70 1.05 1.40 และ 1.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า การใช้แอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 0.3 %w/v ให้ค่าแรงตึงผิวต่ำที่สุดเท่ากับ 29.7 mN/m ค่า  $CMC^{-1}$  และค่าการกระจายตัวของน้ำมันมีค่าสูงสุด เท่ากับ 80 และ 102.1 cm<sup>2</sup> ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงใช้แอมโมเนียมไนเตรท 0.3 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำมันปลา 2 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 15 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อมีน้ำมันปลา 2 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารเหลวกำหนดสูตร(ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(30±2 °ซ)ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

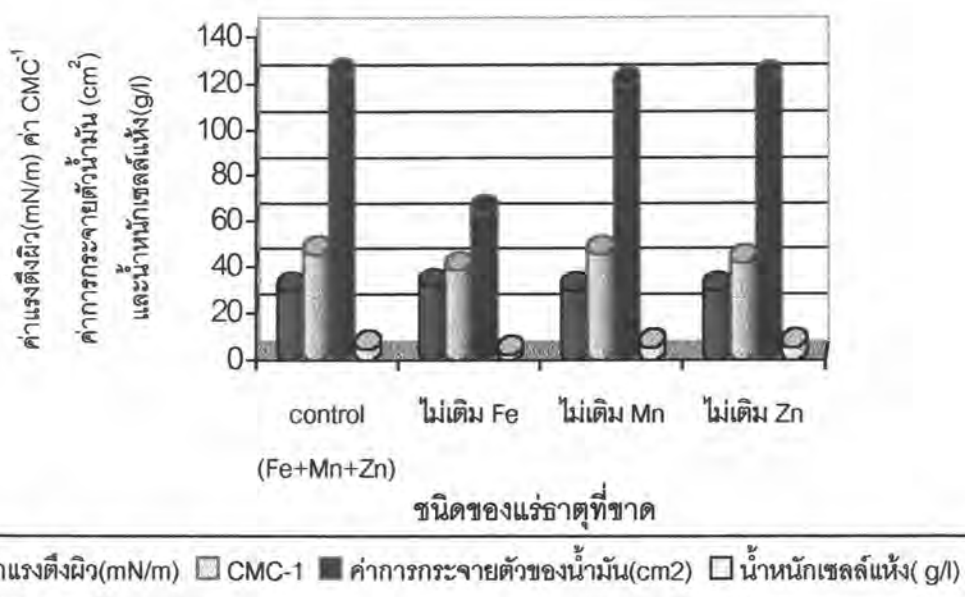
แหล่งไนโตรเจน (0.4 % w/v)	พีเอช		ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่า $CMC^{-1}$	ค่า การกระจายตัว ของน้ำมัน (cm <sup>2</sup> )
	เริ่มต้น	สุดท้าย			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6.8	6.8	30.1	43	132.8
NaNO <sub>3</sub>	6.9	8.5	30.3	40	120.1
NH <sub>4</sub> Cl	6.6	4.5	33.8	-	19.9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.7	4.9	33.6	-	40.2

ตารางที่ 16 ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรท ต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อน้ำมันปาล์ม 2%w/v เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว กำหนดสูตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °ซ) ในภาวะขวด เชย้าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

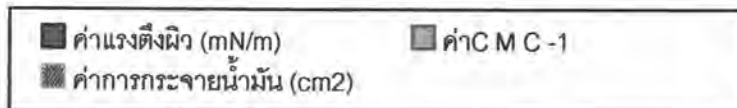
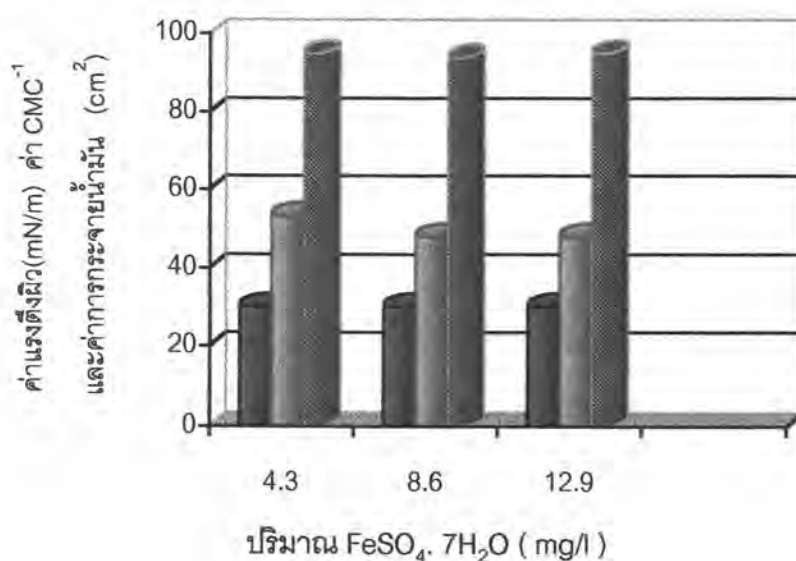
% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (%w/v)	พีเอช		ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่า CMC <sup>-1</sup>	ค่า การกระจายตัวของ น้ำมัน (cm <sup>2</sup> )
	เริ่มต้น	สุดท้าย			
0.1	7.1	6.8	29.5	44	70.3
0.2	6.8	6.8	29.7	48	122.2
0.3	6.9	6.8	29.5	53	134.5
0.4	6.9	6.8	29.6	45	114.5
0.5	6.7	6.9	29.5	40	107.1

### 3.7.3 แหล่งเกลือแร่ปริมาณน้อยที่จำเป็นต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อเลี้ยง *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารเหลวที่กำหนดสูตร ที่มีน้ำมันปาล์ม 2 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรท 0.3 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเว้นการเติมเกลือแร่ในสูตรครั้งละหนึ่งชนิด ได้แก่ เฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) แมงกานีสซัลเฟต (MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) และ ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) พบว่า เมื่อเว้นการเติมเฟอร์รัสซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีค่าแรงตึงผิวมีค่าสูงที่สุด 31.3 mN/m ค่า CMC<sup>-1</sup> 38.5 เท่า และค่าการกระจายตัวของน้ำมันต่ำที่สุด เท่ากับ 38.5 เท่า และ 63.2 cm<sup>2</sup> ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 28 และเมื่อแปรปริมาณ เฟอร์รัสซัลเฟต ตั้งแต่ 4.3 (1 เท่า) 8.6 (2 เท่า) และ 12.9 (3 เท่า) mg/l ตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเฟอร์รัสซัลเฟต ผลผลิตที่ได้ก็มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน คือ ส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 30 mN/m ค่า CMC<sup>-1</sup> อยู่ในช่วง 48 – 53 และค่า การกระจายตัวของน้ำมัน 88 – 95 cm<sup>2</sup> ดังนั้น ปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟตที่เหมาะสมคือ 4.3 mg/l ดังแสดงในรูปที่ 29



รูปที่ 28 ผลของแหล่งแร่ชนิดต่างๆต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปาล์ม 2.0 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมไนเตรท 0.3 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง( $30 \pm 2$  °ซ) ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.



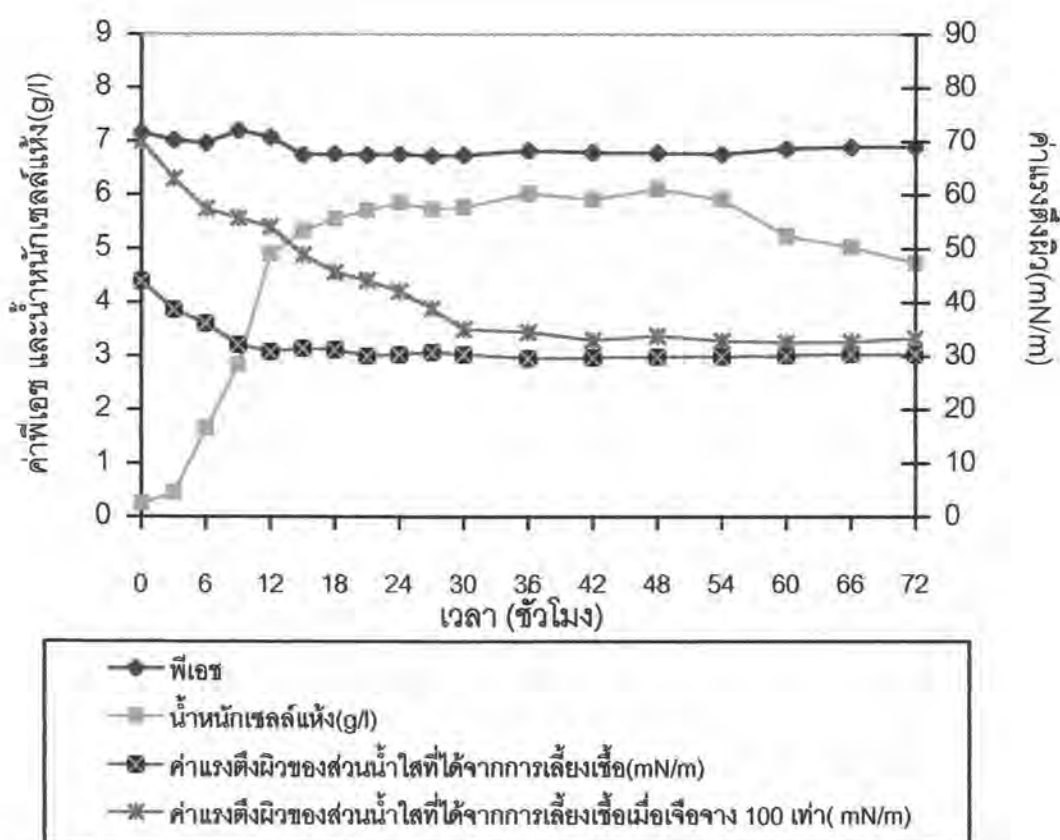
รูปที่ 29 ผลของปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟตต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปาล์ม 2.0 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมไนเตรท 0.3 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °ซ) ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

ดังนั้นการศึกษาค่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 พบว่า ใช้อาหารกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปาล์ม 2.0 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรท 0.3 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่มีการเติมเฟอร์รัสซัลเฟต 4.3 mg/l เป็นองค์ประกอบ(ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °ซ) ในภาวะขวดเขย่าที่อัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.

### 3.8.ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

#### 3.8.1 ระยะเวลาที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) เป็นเวลา 72 ชม. ติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวทุก 3 ชม. ในช่วงเวลา 24 ชม.แรก และ 6 ชม.ในเวลาต่อมา จนครบ 72 ชม.ผลแสดงดังรูปที่ 30 พบว่า เชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะทวีคูณในช่วงที่ 3 จากนั้นเข้าสู่ระยะที่มีการเจริญสูงสุดและคงที่ในช่วงที่ 24 เริ่มผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพตั้งแต่วันที่เวลา 6 ชม.เมื่อพิจารณาค่าลดแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อเจือจาง 100 เท่า ซึ่งมีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 35.0 mN/m ที่เวลา 30 ชม. ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่ 30 ชม.เป็นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



รูปที่ 30 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การเจริญ ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อเจือจาง 100 เท่า ของ *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 นาที อุณหภูมิห้อง( $30 \pm 2$  °C) เป็นเวลา 72 ชม.

### 3.8.2 อายุและปริมาณหัวเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

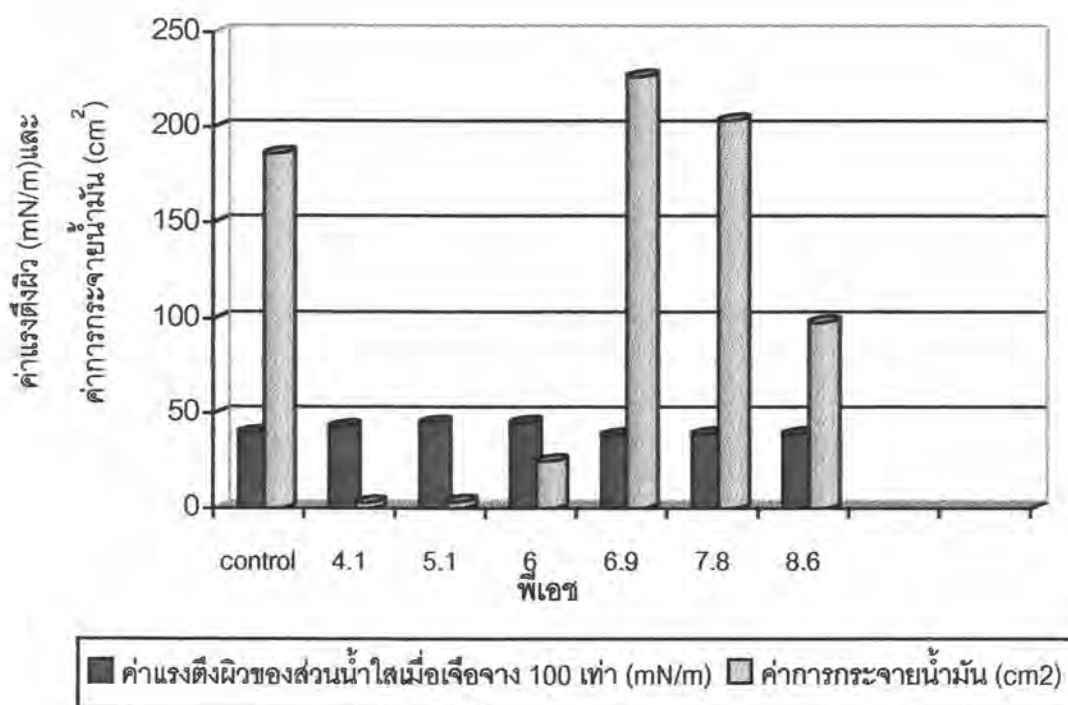
จากการเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ที่มีอายุ 6, 15, และ 30 ชม. พร้อมกับแปรปริมาณของหัวเชื้อแต่ละอายุ เป็น 1, 4, และ 8 %v/v ในการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) และเลี้ยงเชื้อในภาวะตามวิธีในข้อ 2.3. พบว่า หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ที่ปริมาณ 8 %v/v ให้การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ดีที่สุด โดยมีค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสต่ำสุดเท่ากับ 29.8 mN/m ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำใสเมื่อเจือจาง 100 เท่า 37.2 mN/m และค่าการกระจายตัวของน้ำมัน 270.2 cm<sup>2</sup> (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ผลของอายุและปริมาณหัวเชื้อต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรท 0.3 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 ชม.

อายุ(ชม.)	ปริมาณหัวเชื้อ(% v/v)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่าแรงตึงผิวเมื่อเจือจาง 100 เท่า(mN/m)	ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน (cm <sup>2</sup> )
6	1	30.6	47	88.6
	4	30.3	41.5	106.3
	8	30.3	38.5	120.4
15	1	30	40.1	193.4
	4(control)	29.9	39.3	249.4
	8	29.8	37.2	270.2
30	1	29.5	39	226.5
	4	30.3	38	199.5
	8	31	39	201.0

### 3.8.3 ค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) ที่มีการควบคุมค่าพีเอชเริ่มต้นด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ พบว่า ที่พีเอช 6.9 ซึ่งควบคุมโดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ให้ผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพดีที่สุด โดยค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลต่ำสุด 29.0 mN/m ค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเจือจาง 100 เท่า มีค่าต่ำสุด 38.6 mN/m และค่าการกระจายตัวของน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 226.8 cm<sup>2</sup> (รูปที่ 31 และตารางที่ 18)



รูปที่ 31 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อค่าแรงตึงผิว ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 ชม.

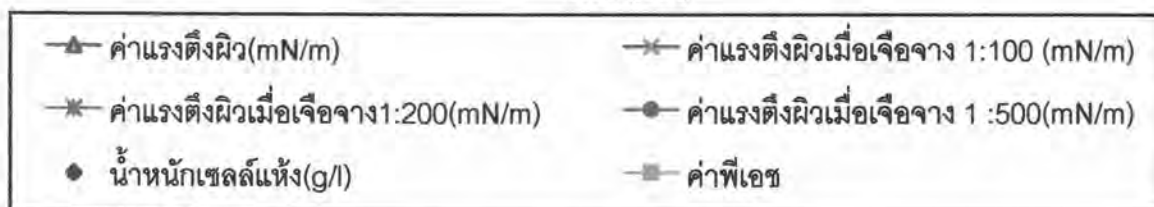
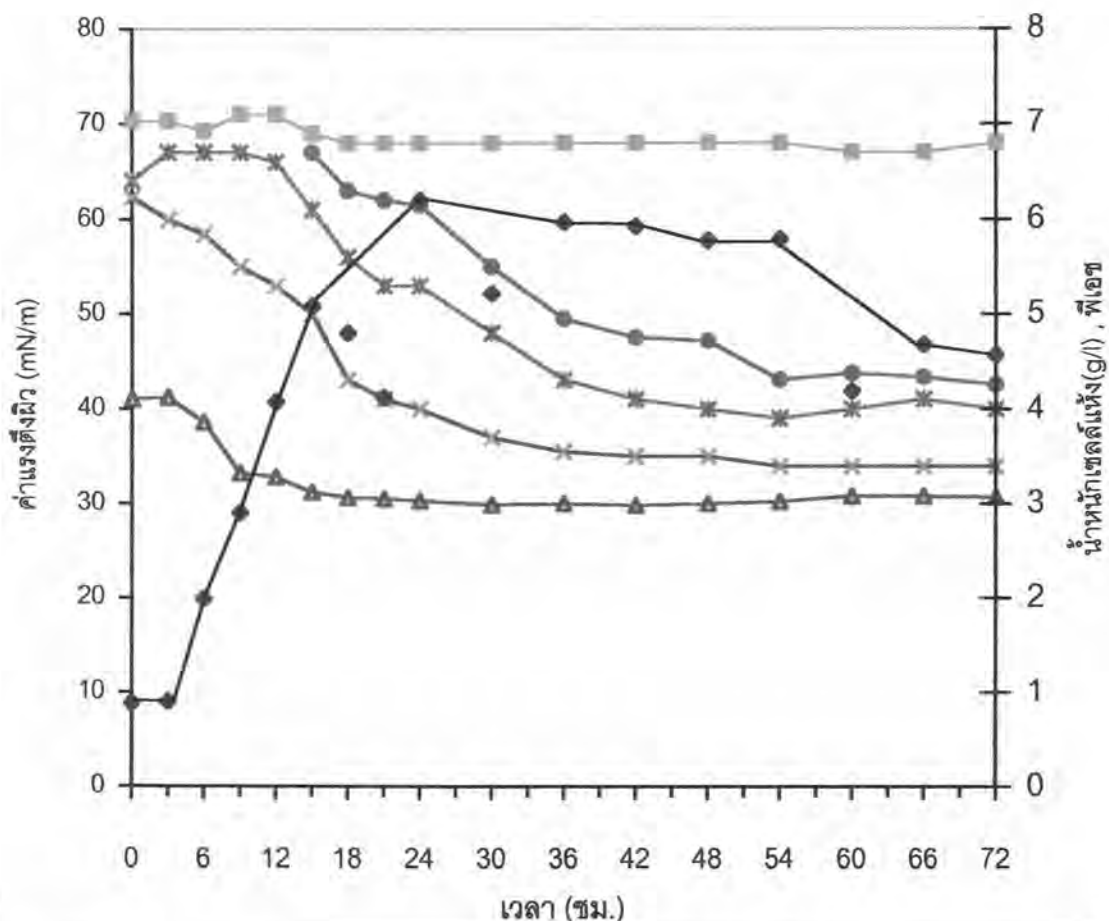
ตารางที่ 18 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อเตรียมหัวเชื้ออายุ 15 ชม. มีปริมาณ 8 %v/v ในอาหารกำหนดสูตรที่มีน้ำมันปาล์ม 2 %w/v เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรท 0.3 %w/v เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °ซ) ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 ชม.

พีเอชเริ่มต้น	พีเอชสุดท้าย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ค่าแรงตึงผิว (mN/m)	ค่าแรงตึงผิวเมื่อเจือจาง 100 เท่า (mN/m)	ค่าการกระจายน้ำมัน (cm <sup>3</sup> )
6.9(control)	6.8	6.6	29.3	40.0	186.2
4.1	4.3	0.9	35.4	43.0	3.1
5.1	5.2	1.1	36.2	45.1	3.5
6.0	6.5	3.7	32.3	45.0	24.8
6.9	6.9	8.3	29.0	38.6	226.8
7.8	7.1	6.2	28.5	39.0	203.5
8.6	7.1	2.6	29.0	39.0	98.0

### 3.9 การเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในภาวะที่เหมาะสม

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) และปรับพีเอช 7.0 ด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ใช้หัวเชื้อ อายุ 15 ชม. ที่ปริมาณ 8 %v/v เป็นเวลา 72 ชม. ติดตามการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทุก 6 ชม. ในช่วงเวลา 24 ชม. แรก และทุก 12 ชม. ในเวลาต่อมา พบว่า เชื้อเริ่มมีการเจริญที่เวลา 30 ชม. เชื้อมีการเจริญสูงสุด และมีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีค่าแรงตึงผิวต่ำสุด 29.9 mN/m จึงเลือกเวลาที่ 30 ชม. เป็นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตให้ได้สูงสุด แต่หลังจากชั่วโมงที่ 30 เมื่อพิจารณาค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่มีการเจือจาง 100 200 และ 500 เท่า ยังมีค่าคงที่ โดยมีค่าแรงตึงผิวประมาณ 30 mN/m ดังนั้น เวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ ควรเป็นเวลา 30 ชม. ขึ้นไป





รูปที่ 32 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การเจริญของเชื้อ ค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ และค่าแรงตึงผิวของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อเจือจาง 100 200 และ 500 เท่า จาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อใช้หัวเชื้ออายุ 15 ชม. ที่ปริมาณ 8 %v/v ในอาหารกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว(ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) มีการควบคุมพีเอชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °ซ) ในภาวะขวดเขย่าอัตราเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชม.

### 3.10 สมบัติเบื้องต้นบางประการของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

จากการนำส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ในอาหารเหลวกำหนดสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) ในภาวะที่เหมาะสม มาศึกษาสมบัติบางประการ ได้แก่ ความเสถียรต่อพีเอช อุณหภูมิ 60 และ 100 °ซ ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 – 30 %w/v และความสามารถของส่วนน้ำไลในการก่อเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังนี้

#### 3.10.1 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อ พีเอชตั้งแต่ 2 – 12 พบว่าส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ มีความเสถียรต่อพีเอชในช่วงกว้าง คือ 2 – 8 โดยที่พีเอชมากกว่า 8 ทำให้ประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวลดลง เมื่อพิจารณาจากค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเจือจาง 100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 33

#### 3.10.2 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากการบ่มส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 60 และ 100 °ซ ติดตามผลโดยการวัดค่าแรงตึงผิว ทุก ๆ 30 นาที เป็นเวลา 5 ชม. พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 100 °ซ เป็นเวลา 5 ชม. โดยดูจากค่าแรงตึงผิวซึ่งมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลเมื่อเจือจาง 100 เท่า ก็เช่นเดียวกัน ดังแสดงใน รูปที่ 34 และ 35

#### 3.10.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อ ความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อนำส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ มาเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 0 3 5 8 10 15 20 25 และ 30 %w/v NaCl เมื่อพิจารณาค่าแรงตึงผิวของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อเจือจาง 100 เท่า พบว่า ส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีความเสถียรต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังมีค่าลดแรงตึงผิวที่ต่ำลง ดังแสดงในรูปที่ 35

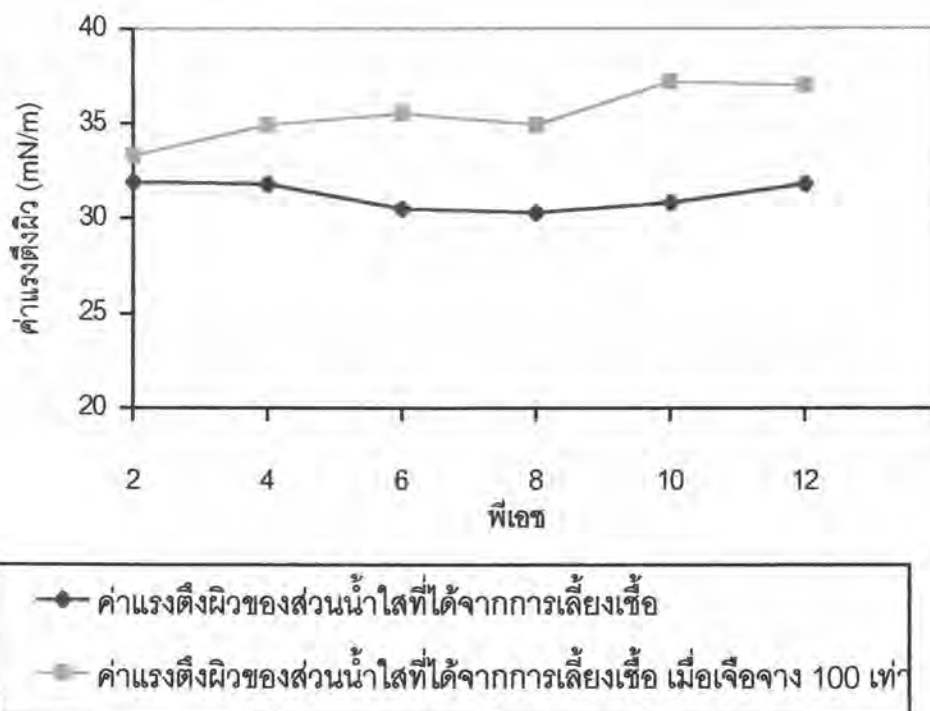
#### 3.10.4 ความสามารถในการก่อเกิดอิมัลชันของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

จากการนำส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อผสมกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ เป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม. และวัดส่วนที่เกิดเป็นอิมัลชันพบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 สามารถก่อเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

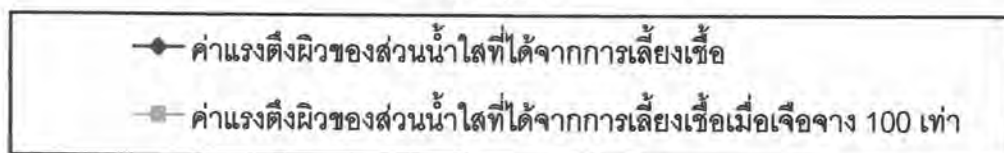
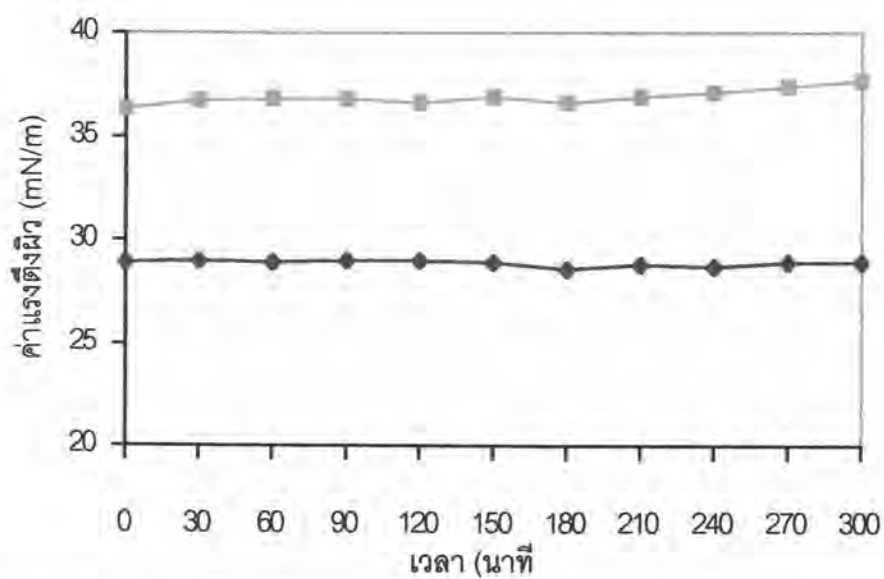
ชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกซาเดกเคน ไชโคลเฮกเซน ไอโซออกเทน เบนซีน ไชลีน ทอลูอีน เคโรซีน และน้ำมันพาราฟินได้ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดอิมัลชันแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 ต่อสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆและน้ำมันบางชนิด

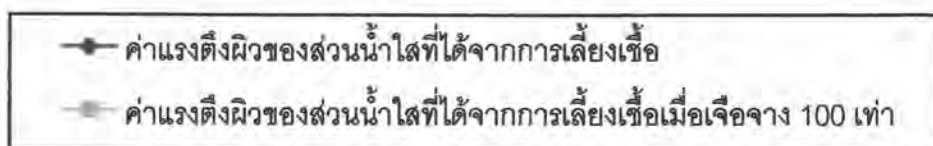
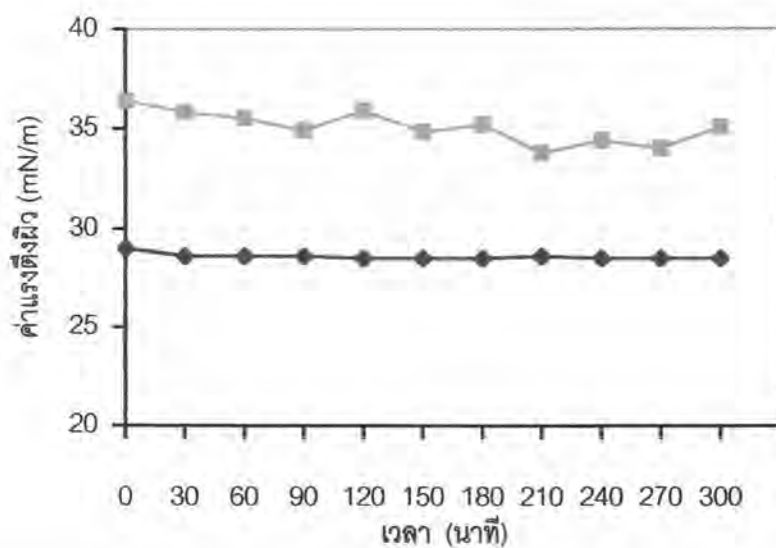
Hydrocarbon substrates	Emulsification Index(E24) (%)	Hydrocarbon substrates	Emulsification Index(E24) (%)
Alkane hydrocarbon		Aromatic hydrocarbon	
- n-hexadecane	62.7	- benzene	72.1
- cyclohexane	60.9	- xylene	46.1
- iso-octane	62.2	- toluene	67.0
Mixed hydrocarbon		Oil	
- kerosene	63.7	Olive oil	54.5
- paraffin oil	53.3	Crude oil	49.1



รูปที่ 33 ผลของค่าพีเอชต่อความเสถียรของส่วนน้ำใสที่ได้ จากการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ที่ค่าพีเอช 2 4 6 8 10 และ 12

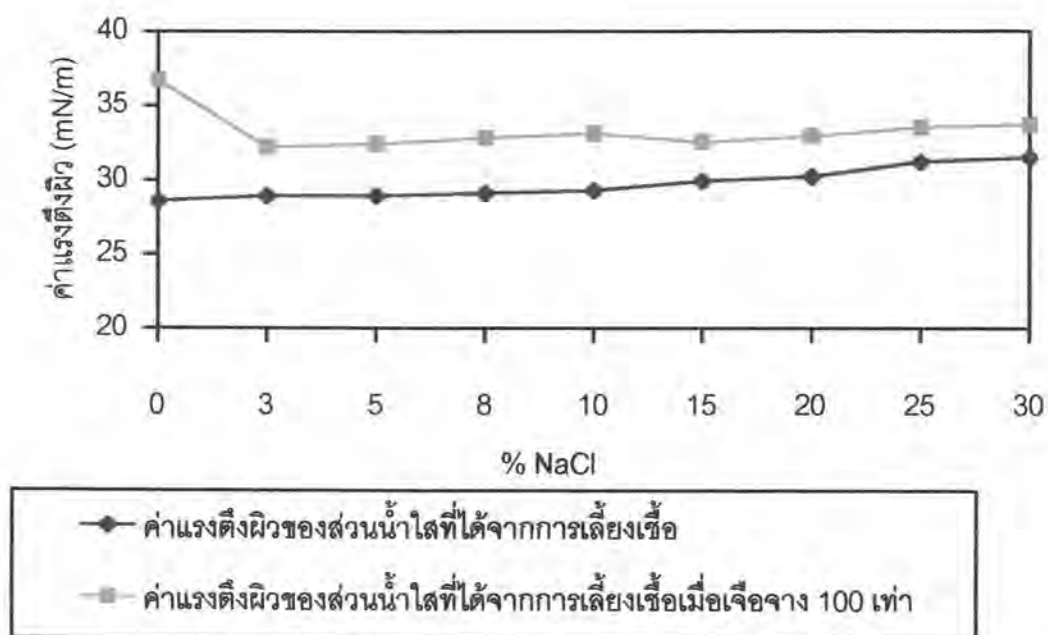


รูปที่ 34 ผลของอุณหภูมิ 60 °ซ ต่อความเสถียรของส่วนน้ำไลที่ได้ จากการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อบ่มส่วนน้ำไลในน้ำอุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 5 ชม.



รูปที่ 35 ผลของอุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  ต่อความเสถียรของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ

*Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อป้อนส่วนน้ำไลในน้ำอุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 ชม.



รูปที่ 36 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อความเสถียรของส่วนน้ำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อบ่มส่วนน้ำไลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 ชม.

### 3.11 สมบัติบางประการของสารบริสุทธิ์บางส่วน

นอกจากจะศึกษาสมบัติบางประการของส่วนนำไลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแล้ว ยังศึกษาสมบัติบางประการของสารบริสุทธิ์บางส่วนตามวิธีข้อ 2.6.1 โดยเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมแล้ว ซึ่งสารบริสุทธิ์บางส่วนมีความเข้มข้น 20 mg/l ผลกาทดลองแสดงดังนี้

#### 3.11.1 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการทดสอบความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อ พีเอชตั้งแต่ 2 - 12 พบว่า สารบริสุทธิ์บางส่วน มีความเสถียรต่อพีเอชในช่วงกว้าง คือ 2 - 10 โดยที่พีเอชมากกว่า 10 ทำให้ประสิทธิภาพในการลดค่าแรงตึงผิวลดลง เมื่อพิจารณาจากค่าแรงตึงผิวของสารละลายของสารบริสุทธิ์ เมื่อเจือจาง 100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 37

#### 3.11.2 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เมื่อป้อนสารละลายสารบริสุทธิ์บางส่วน ที่อุณหภูมิ 100 °ซ ติดตามผลโดยการวัดค่าแรงตึงผิว ทุก ๆ 30 นาที เป็นเวลา 5 ชม. พบว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 5 ชม. โดยดูจากค่าแรงตึงผิว ซึ่งมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 38

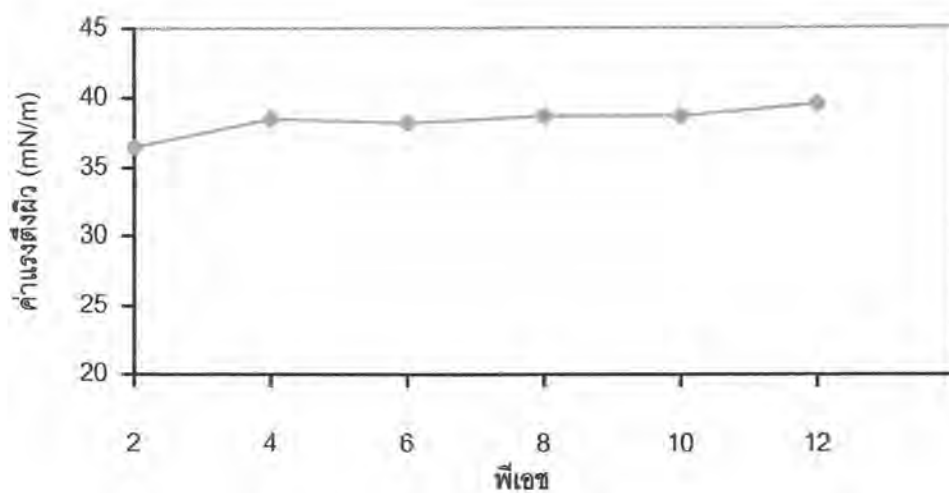
#### 3.11.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อความเสถียรของสารบริสุทธิ์บางส่วน

จากการนำสารละลายของสารบริสุทธิ์บางส่วน มาบ่มร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 0 3 5 8 10 15 20 25 และ 30 %w/v NaCl เมื่อพิจารณาค่าแรงตึงผิว พบว่า สารบริสุทธิ์บางส่วน ยังคงสามารถลดแรงตึงผิวได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 39

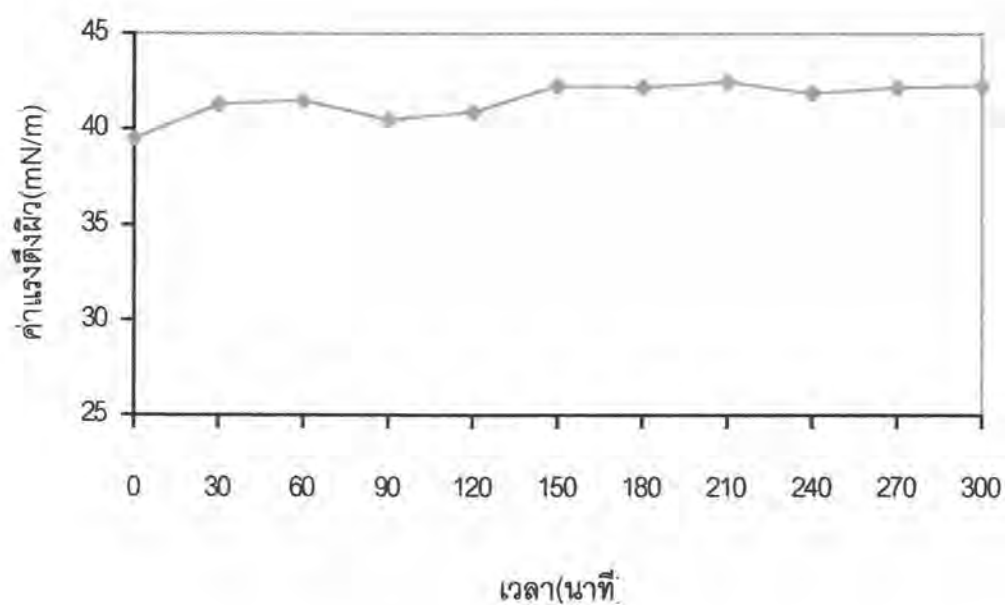
#### 3.11.7 ความสามารถในการก่อเกิดอิมัลชันของสารบริสุทธิ์บางส่วนกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

จากการนำสารบริสุทธิ์บางส่วนมาผสมกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม. และวัดส่วนที่เป็นอิมัลชันพบว่า สารบริสุทธิ์บางส่วนสามารถก่อเกิดอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆได้ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดอิมัลชันแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 20

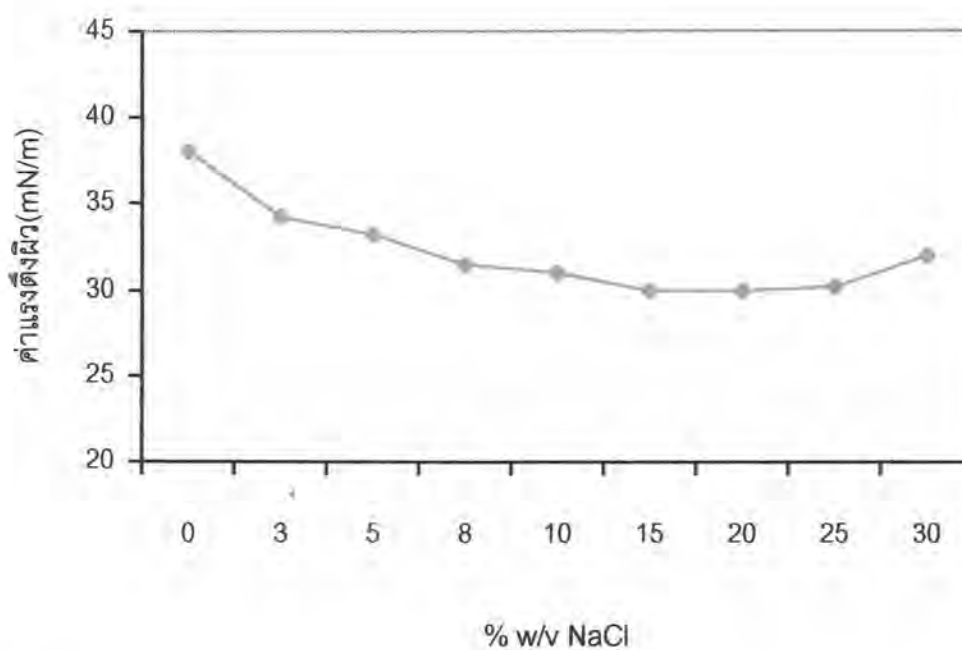




รูปที่ 37 ผลของค่าพีเอชต่อ ความเสถียรของสารบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อนำสารบริสุทธิ์มาปรับพีเอช ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ จนมีค่าพีเอชต่างๆ วัดค่าแรงตึงผิวหลังจากตั้งไว้เป็นเวลา 12 ชม.



รูปที่ 38 ผลของอุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  ต่อความเสถียรของสารบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อบ่มสารละลายของสารบริสุทธิ์บางส่วนในน้ำอุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 ชม.



รูปที่ 39 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อความตึงผิวของสารบริสุทธิ์บางส่วน ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41 เมื่อบ่มสารบริสุทธิ์บางส่วนกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 20 ความสามารถในการก่อเกิดอิมัลชันของสารบริสุทธิ์บางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A41

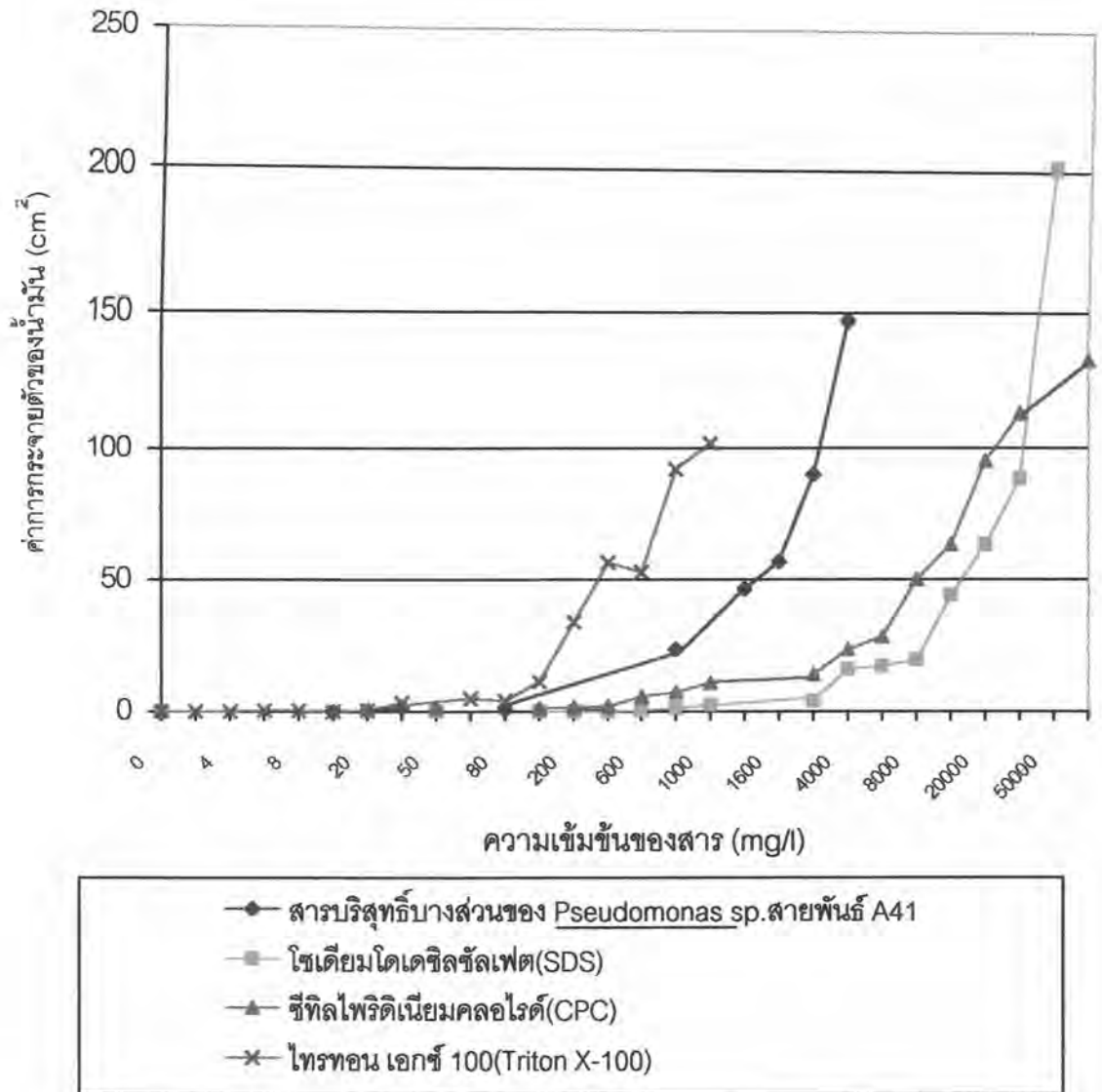
Hydrocarbon substrates	Emulsification Index(E24) (%)	Hydrocarbon substrates	Emulsification Index(E24) (%)
Alkane hydrocarbon		Aromatic hydrocarbon	
- n-hexadecane	63.6	- benzene	66.7
- cyclohexane	65.5	- xylene	62.5
		- toluene	68.1
Mixed hydrocarbon			
- kerosene	65.5		
- paraffin oil	59.3		

### 3.12 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะบางส่วนกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทางเคมี

จากการหาค่า CMC ของสารปฏิชีวนะบางส่วนและสารลดแรงตึงผิวทางเคมีด้วยวิธีของ Duvnjak , Cooper, และ Kosaric (1982) พบว่าสารปฏิชีวนะบางส่วนมีค่า CMC 240 mg/l ซึ่งมีค่ามากพอสมควรเมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวทางเคมี (ตารางที่ 21) และเมื่อเปรียบเทียบค่าการกระจายตัวของน้ำมันที่ความเข้มข้นของสารเท่ากัน ที่ 1000 mg/l พบว่า สารปฏิชีวนะบางส่วนของ *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 มีค่าการกระจายตัวของน้ำมันต่ำกว่าไตรทอนเอกซ์ 100 แต่มีค่าสูงกว่าโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต(SDS)และซีทิลไพริดิเนียม(CPC) ดังแสดงในรูปที่ 40

ตารางที่ 21 ค่า CMC ของสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว	ค่า CMC (mg/l)
<u>สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ</u>	
-สารปฏิชีวนะบางส่วนของ <i>Pseudomonas</i> sp.สายพันธุ์ A41	240
<u>สารลดแรงตึงผิวทางเคมี</u>	
-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	810
-ไตรทอน เอกซ์ 100 (Triton X-100)	120
-ซีทิลไพริดิเนียม คลอไรด์ (CPC)	100



รูปที่ 40 ค่า การกระจายตัวของน้ำมันของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ ได้แก่ สารบริสุทธิ์บางส่วน ของ *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ A41 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต(SDS) ซีทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (CPC) และ ไทรทอน เอกซ์ -100 (Triton X -100) ที่ความเข้มข้นต่างๆ