บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 ซึ่งเก็บรักษาไว้ใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำทะเลที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันจากทะเลสาบสงขลา (Maneerat *et al.,* 2005)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับการเตรียมเชื้อเริ่มต้น และเก็บรักษาเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 คือ Marine broth 2216 (Difco, USA)

3. สารเคมี

- *n*-tridecane บริษัท Nacalai Tesque Inc. (Tokyo, Japan)
- *n*-tretradecane บริษัท Nacalai Tesque Inc. (Tokyo, Japan)
- *n*-pentadecane บริษัท Nacalai Tesque Inc. (Tokyo, Japan)
- *n*-hexadecane บริษัท Nacalai Tesque Inc. (Tokyo, Japan)
- *n*-heptadecane บริษัท Nacalai Tesque Inc. (Tokyo, Japan)
- Benzene บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- Toluene บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- Xylene บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- Weathered crude oil (WCO) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Fusako Kawai, Research Institute for Bioresources, Okayama University ประเทศญี่ปุ่น
- Rhodamine บริษัท Fluka Chemical Co. (Bushs, Switzerland)
- Ninhydrin บริษัท Fluka Chemical Co. (Bushs, Switzerland)
- Anisaldehyde บริษัท Nacalai Tesque Inc. (Tokyo, Japan)
- Sodium dodecyl sulfate บริษัท Bio-Rad (California, USA)

- Tween 80 บริษัท Ajax finechem Ltd. (Auckland, Newzeland)
- แอมโมเนียมซัลเฟต บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- อะซิโตน บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- เมธานอล บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- เอธานอล 95% บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- เอธิลอะซิเตต บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- ไพริดีน บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)
- กรดอะซิติก บริษัท Lab-Scan (Bankok, Thailand)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ การตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์

4. อุปกรณ์

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น 420A บริษัท Orion Research, Inc
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น M.3525 – 1 บริษัท LAB – Line Instruments, Inc
- เครื่องเขย่าไม่ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น GFL บริษัท Gesellschaft fur Labortechnik mbH
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5403 บริษัท Eppendorf
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR 20 B บริษัท Hitachi
- เครื่องอบอากาศร้อน (hot air oven) รุ่น MOV. 212 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Technical Cooperation
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210s บริษัท Sartorius
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D company, Ltd
- เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท LAB – Line Instruments, Inc

5. วัสดุ

- แผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) aluminium sheets silica gel 60 F_{254} ขนาด 20x20 cm layer thickness 0.2 mm บริษัท MERCK
- ถุง dialysis ขนาด molecular weight cut-off 8,000 ดาลตัน บริษัท Viskase

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ

ปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) 2 ครั้ง เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (Shabtai, 1990) แล้วจึงนำไปหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Lowry method (Lowry *et al.,* 1951) (ภาคผนวก ข)

2. การวิเคราะห์ค่า Emulsification activity (%EA)

เติม *n*-hexadecane 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 2 นาที แล้วทิ้งไว้ 10 นาที หาค่า emulsification activity โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ (Cooper and Goldenberg, 1987)

$$\text{Emulsification activity} = \frac{\text{ความสูงของ emulsion ที่เกิดขึ้น x 100}}{\text{ความสูงทั้งหมดของสารละลาย}}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Bradford method (Bradford, 1976) (ภาคผนวก ข)

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

วิเคราะห์ปริมารน้ำตาลทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี phenol-sulfuric method (Dubois *et al.,* 1956) (ภาคผนวก ข)

วิธีการทดลอง

<u>การเตรียมกล้าเชื้อ</u>

ถ่ายเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 จาก glycerol stock 0.1 มิลลิลิตร ลงใน Marine broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดกลาง เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1.0 มิลลิลิตร ลงใน marine broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน

ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

1. เปรียบเทียบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ WCO ของตัวเซลล์และส่วนใส

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงใน marine broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกจากน้ำหมัก (culture broth) ล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0) สองครั้ง แล้วละลายเซลล์กลับโดยใช้บัฟเฟอร์เดิมให้มีปริมาตรเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเติม WCO ร้อยละ 1 ทั้งในส่วนใส (cell-free broth) และเซลล์แขวนลอย (cell suspension) เขย่าภายใต้สภาวะเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ แล้วเปรียบเทียบผลการอิมัลซิไฟด์ WCO ของเซลล์แขวนลอยและส่วนใส

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

2.1 สูตรอาหาร

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงใน สูตรอาหาร 2 สูตร คือ minimal salt medium (ภาคผนวก ก) และ seawater medium (ภาคผนวก ก) โดยแต่ละสูตรมีกลูโคส และ *n*-hexadecane ความเข้มข้น 2% และ 1% เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วัด emulsification activity แล้วเลือกสูตรอาหารและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.2 แหล่งคาร์บอน

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน คือ *n*-tridecane, *n*-tetradecane, *n*-pentadecane, *n*-hexadecane, *n*-heptadecane ความเข้มข้น 0.1% เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดของเซลล์, พีเอช, emulsification activity เลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.3 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้มีค่าเท่ากับ 0.1, 0.3 และ 0.5% เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.4 แหล่งไนโตรเจน

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.1 % เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.5 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนให้มีค่าเท่ากับ 0.1, 0.3 และ 0.5% เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.6 พีเอชเริ่มต้น

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกพีเอชเริ่มต้นที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.7 อุณหภูมิ

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และพีเอชจากข้อ 2.6 ปริมาตร 100

มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง และ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกอุณหภูมิที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.8 การให้อากาศ

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และพีเอช ที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.7 โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 100, 200, 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกความเร็วรอบที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุดเพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.9 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

ถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เลือกช่วงเวลาที่ให้ค่า emulsification activity สูงที่สุด เพื่อใช้ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป

3. ศึกษาวิธีการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อ *A. calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7

3.1 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์ 500 มิลลิลิตร โดยให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นในช่วง 40-60 % เก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนในน้ำกลั่น นำสารละลายตะกอนที่ได้มากำจัดเกลือ (dialysis) โดยใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 ดาลตันในน้ำกลั่นโดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2, 4 ชั่วโมง และทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส เลือกความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอน วิเคราะห์ผลโดยชั่งน้ำหนักตะกอนและหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดอิมัลชัน (critical emulsifier concentration)

3.2 ตกตะกอนด้วยอะซิโตน

นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยอะซิโตนในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ระเหยอะซิโตน วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.3 ตกตะกอนด้วยเมธานอล

นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเมธานอลในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ระเหยเมธานอล วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.4 ตกตะกอนด้วยเอธานอล

นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอธานอล 95%ในอัตราส่วน 1:3 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนโดยเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ระเหยเอธานอล วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.1

จากวิธีการตกตะกอนสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทั้ง 4 วิธี เลือกวิธีที่ดีที่สุดในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบค่า critical emulsifier concentration และน้ำหนักตะกอนที่ได้ โดยเลือกวิธีการตกตะกอนที่ให้ตะกอนมากที่สุดและ/หรือมีค่า critical emulsifier concentration น้อยที่สุด

4. ศึกษาคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

4.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับพีเอชด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 จากนั้นจากนั้นวัด emulsification activity ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้และสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ คือ sodiumdodecyl sulfate (SDS) และ Tween 80

4.2 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารลดแรงตึงผิวที่สกัดได้

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น แล้วบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 และ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ยกเว้นที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส บ่มนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่นเดียวกับข้อ 4.1

4.3 ผลของเกลือต่อความคงตัวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่น เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 6, 9 และ 12% หรือแคลเซียมคลอไรด์หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1% หรือทดสอบกิจกรรมกับน้ำทะเล จากนั้นวัดกิจกรรมของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5. ศึกษาความจำเพาะของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้ต่อไฮโดรคาร์บอนต่างๆ

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยน้ำกลั่น วัดค่า emulsification activity ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2 ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้กับไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ *n*-tridecan, *n*-tetradecane, *n*-pentadecane, *n*-hexadecane, *n*-neptadecane, benzene, toluene และ xylene

6. ศึกษาองค์ประกอบบางส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้มากำจัด impurity โดยการทำไดอะไลซิส (dialysis) ซึ่งใช้ dialysis bag ที่มี molecular weight cut-off 8,000 ดาลตัน ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่เวลา 1, 2, 4 ชั่วโมง และทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำให้สารเข้มข้นขึ้นโดยใช้คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสจนมีปริมาตรเหลือประมาณ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปทำแห้งแบบ freeze dry แล้วนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้มาตรวจสอบองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้โดย

6.1 Gel Permeation Chromatography

ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Gel Permeation Chromatography (GPC) ตรวจวิเคราะห์โดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

6.2 Thin Layer Chromatography

ตรวจสอบองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) ที่มี silica gel 60 เป็น stationary phase โดยนำไปแช่ใน mobile phase คือ ethyl acetate: pyridine: water: acetic acid (5:5:5:1) โดยปริมาตร แล้วใช้ spraying reagent ต่างๆ ในการตรวจสอบองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

- ใช้ rhodamine B เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของกรดไขมัน (McInerney *et al.,* 1990) (ภาคผนวก ค)

- ใช้ ninhydrin เพื่อดูหมู่อะมิโนอิสระ (Wilkinson, 1972) (ภาคผนวก ค)
- ใช้ anisaldehydeในการวิเคราะห์น้ำตาล (Schulz *et al.,* 1991) (ภาคผนวก ค)

6.3 Fourier Transform Infrared Spectrometer

ตรวจสอบองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) ตรวจวิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์