บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. แบคทีเรีย

แบคทีเรียทนร้อนจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ CH11 และ FT3 ซึ่งแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำยางข้น 2 โรงงาน คือ บริษัทฉลองอุตสาหกรรมน้ำยาง จำกัด และบริษัทเฟลเท็กซ์ จำกัด (รหัสเชื้อ CH และ FT ตามลำดับ) โดยศิริพร หมาดหล้า (2544)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับผลิตพอลิเมอร์ชนิดโปรตีน (Protein polymer-producing medium : PR) (Takeda *et al*., 1992) ประกอบด้วย กลูโคส 1 %, ยีสต์สกัด 0.4 %, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 %, Na_2HPO_4 0.6 % และ$MgSO_4.7H_2O$ 0.02 % ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 สำหรับน้ำตาลกลูโคสแยกฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และในกรณีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งให้เติมผงวุ้นปริมาณ 1.5 %

3. Weathered Oil

Weathered oil เป็นน้ำมันที่ได้จากกระบวนการกลั่นแยกน้ำมันดิบ (Oman crude oil) ที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4. สารเคมี

สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้, และใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติของพอลิเมอร์รวมทั้งสารลดแรงตึงผิว รายการสารเคมีแสดงในรายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก ก

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Mettler รุ่น Toledo 320
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (electronic balance) ยี่ห้อ Satorius รุ่น BP 221S
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS325
4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Mor 212

5. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator-shaker) ยี่ห้อ Lab-line รุ่น M.3525-1
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hettich zentrifugenรุ่น universal 32/32R
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2000
8. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus
9. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ยี่ห้อ EYELA รุ่น SB-651
10. ตู้อบ (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น ULM.500
11. เครื่อง Torsion balance ยี่ห้อ White TBS
12. เครื่อง Freeze dryer ยี่ห้อ Dura-Stop^{TM}μP
13. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-35 CF
14. กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast ยี่ห้อ Olympus รุ่น CHS
15. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบหมุนเวียน ยี่ห้อ JUDABO รุ่น MP
16. เครื่อง Fourier Transfrom Infrared Spectrometer ยี่ห้อ Bruker รุ่น Equinox 55
17. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุหลัก ยี่ห้อ CHOS-O Analyzer รุ่น FLASH 1112 Series EA
18. เครื่อง Gel Permeation Chromatography ยี่ห้อ Polymerlab รุ่น PL-GPC
19. แผ่น Thin-layer chromatography (TLC) aluminium sheets silica gel 60 F_{254} ขนาด 20x20 cm layer thickness 0.2 mm ยี่ห้อ MERCK

วิธีการวิเคราะห์

1. **การทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน** (Oil displacement test)

นำจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร บรรจุน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร หยด weathered oil ปริมาตร 15 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าของน้ำ จากนั้นจึงหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในที่นี้ คือ ส่วนใสที่ได้เหวี่ยงแยกเซลล์ออกปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าของ weathered oil วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง เพื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่ของการกระจาย weathered oil เป็นตารางเซนติเมตร สำหรับวงใสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 15 เซนติเมตร จะเจือจางส่วนใสเป็น 10 เท่า สูตรคำนวณดังสมการ (Morikawa *et al.*, 1993)

Oil displacement area (ODA) = 22/7 $(r)^2$ ตารางเซนติเมตร

r = รัศมีการกระจายของตัวอย่างบนผิวหน้าของ weathered oil

วิธีการทดลอง

1. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียทนร้อน 2 สายพันธุ์

เทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียทนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ CH11 และ FT3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธีการในหนังสืออนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการของดวงพร คันธโชติ (2537) และ Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria (MacFaddin, 1980) ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคทีเรีย เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียถึงระดับสกุลตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Holt, 1984)

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบและทดสอบคุณสมบัติด้านพอลิเมอร์ของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน 2 สายพันธุ์

2.1 การผลิตสารชีวภาพ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยบ่มเชื้อสายพันธุ์ CH11 และ FT3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PR นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว PR ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PR ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, 72 และ 96 ชั่วโมงเพื่อวัดพีเอช การเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรด้วยเครื่องมือ UV-VIS spectrophotometer และค่าน้ำหนักของเซลล์แห้ง (Kurane *et al*., 1994a) และเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงเพื่อวัดผลผลิตสารชีวภาพที่ได้จากการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักแล้ว นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วย 95% เอทานอลที่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรน้ำหมัก ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15

นาที ตะกอนที่ได้นำมาอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และชั่งหาน้ำหนักของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (ศิริพร หมาดหล้า, 2544)

2.2 การสกัดสารชีวภาพด้วยเอทานอลและการทำบริสุทธิ์บางส่วน

นำน้ำหมักไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อแยกตัวเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการลดปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต้องใช้ในการตกตะกอนพอลิเมอร์ ตกตะกอนพอลิเมอร์ออกจากสารละลายส่วนใสด้วยการเติมเอทานอล 95% ที่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรน้ำหมักภายหลังการทำให้เข้มข้น ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อแยกตะกอนของพอลิเมอร์ นำตะกอนพอลิเมอร์ที่ได้ไปทำแห้งแบบ freeze dry จากขั้นตอนนี้จะได้พอลิเมอร์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude polymer) นำไปละลายในน้ำกลั่น และกำจัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที กำจัดเกลือโดยใช้วิธีไดอะไลซีส (dialysis) ที่มี molecular weight cut off 5,000 แล้วนำสารละลายพอลิเมอร์ไปทำแห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง freeze dryer จะได้พอลิเมอร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (ดัดแปลงจาก Goto and Kunioka, 1992)

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

นำสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน มาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยวิธี Colorimetric method ในเชิงคุณภาพและปริมาณดังนี้ (รายละเอียดในภาคผนวก ก)

ก. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

- กรดอะมิโนชนิดแอลฟา วิเคราะห์โดยวิธี Ninhydrin reaction (Plummer, 1978 อ้างโดย Dermlim, 1999)
- กรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก วิเคราะห์โดยวิธี Xanthoproteic reaction (Plummer, 1978 อ้างโดย Dermlim, 1999)

ข. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

- น้ำตาลที่เป็นกลาง วิเคราะห์โดยวิธี Anthrone reaction (Trelyan and Harrison, 1952 อ้างโดย Dermlim, 1999)
- น้ำตาลทั้งหมด วิเคราะห์โดยวิธี Phenol-sulfuric acid reaction (Dubois *et al.*, 1956 อ้างโดย Dermlim, 1999)

- กรดยูโรนิค	วิเคราะห์โดยวิธี Carbazole-sulfate reaction (Bitter and Muir, 1962 อ้างโดย Dermlim, 1999)
- เอสเทอร์ซัลเฟต	วิเคราะห์โดยวิธี Turbidimetric (Dodgson and Price, 1962)
- โปรตีน	วิเคราะห์โดยวิธี Lowry (Lowery *et al*., 1951)
- แร่ธาตุหลัก (CHONS)	วิเคราะห์โดยเครื่อง CHNS-O Analyzer (รุ่น FLASH1112 Series EA) ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (Kurane and Matsuyama, 1994)

2.4 ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

2.4.1 คุณสมบัติในการละลาย

ชั่งสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน 1 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร สังเกตการละลายของสารชีวภาพหลังจากตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนโดยเปรียบเทียบกับตัวทำละลายที่ไม่มีการเติมสารชีวภาพ ตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ น้ำกลั่น เอทานอล เมทานอล อะซิโตน เฮกเซน คลอโรฟอร์ม โพพานอล ไดคลอโรมีเทน ไอโซโพพิวอีเทอร์ (Collins *et al*., 1973)

2.4.2 คุณสมบัติการเกิดเจล

ทดสอบความสามารถการเกิดเจลของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง เมื่อมีเกลือชนิดประจุ +1 (NaCl) และ +2 ($CaCl_2.2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$) ปริมาณ 2 มิลลิกรัม, สารละลายของสารชีวภาพ (0.5% นน./ปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (Shimada *et al*., 1997) ผสมให้เข้ากัน ส่วนผสมที่ทดสอบแสดงดังต่อไปนี้

Product + NaOH

Product + NaOH + NaCl

Product + NaCl

Product + NaOH + $CaCl_2.2H_2O$

Product + $CaCl_2.2H_2O$

Product + NaOH+ $MgSO_4.7H_2O$

Product + $MgSO_4.7H_2O$

Product + NaOH+ $CuSO_4.5H_2O$

Product + $CuSO_4.5H_2O$

อ่านผลโดยสังเกตการฟอร์มตัวเป็นเจล แสดงผล positive (+) เมื่อเกิดเจล และ negative (-) เมื่อไม่เกิดเจล

2.4.3 คุณสมบัติการเป็นสารตกตะกอน

ทดสอบความสามารถการเป็นสารตกตะกอนของสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยการวัดค่ากิจกรรมการตกตะกอนในสารแขวนลอยของดินขาว (Kaolin) ดังนี้ ผสมสารละลายของสารชีวภาพ 0.1 มิลลิลิตร, $CaCl_2$ ความเข้มข้น 90 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และสารแขวนลอยของดินขาวความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรปริมาตร 4.65 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดสอบตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที ดูดสารละลายผสมปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากส่วนบนสุดของหลอดทดลอง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (OD550 nm) สำหรับชุดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายของสารชีวภาพ (Yokoi *et al*., 1995)

คำนวณค่ากิจกรรมการตกตะกอนโดยใช้สมการ

$$\text{ค่ากิจกรรมการตกตะกอน} = 1/(\text{OD550 nm})s - 1/(\text{OD550 nm})c$$

$$\text{อัตราการตกตะกอน (\%)} = \frac{[(\text{OD550 nm})c - (\text{OD550 nm})s]}{(\text{OD550 nm})c} \times 100$$

(OD550 nm)s คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรของสารตัวอย่าง

(OD550 nm)c คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรของชุดควบคุม

2.4.4 คุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์

ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ของสารชีวภาพ โดยวิธี agar diffusion method เตรียมสารละลายสารชีวภาพความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลาย ใช้ยามาตราฐาน chloramphenicol เป็น positive control และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็น negative control เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* เขี่ยเชื้อทดสอบจาก pure colony ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Broth (MHB) (ภาคผนวก ก) 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–8 ชั่วโมง นำมาเปรียบเทียบความขุ่นกับ 0.5% McFarland standrads ซึ่งเทียบเท่ากับมีจำนวนเชื้อ 10^8 cell/ml (ถ้าขุ่นเกินไปให้เจือจางด้วยสารละลาย 0.85% NaCl) ใช้ sterile cotton swap จุ่มลงในอาหาร MHB ที่มีเชื้อทดสอบอยู่ บิดให้หมาด ๆ แล้วป้ายลงใน agar plate ทิ้งไว้ 3-5 นาที ดูดตัวอย่างยาและสารละลายชีวภาพ

10 ไมโครลิตร หยดลงบน antibiotic disc แล้วใช้ปากคีบคีบแผ่น antibiotic disc วางลงบน agar plate กดให้แน่น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัด inhibition zone (Borel *et al*., 1993)

2.4.5 ความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดง

ทดสอบความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดแดงของสารชีวภาพ โดยวิธี red blood cell lysis เตรียมน้ำเลือด (เลือดคนซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยคลังเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์) โดยนำน้ำเลือดไปผสมกับ phosphate buffer saline (PBS) พีเอช 7.0 ที่เย็น 4 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้ละลายกับบัฟเฟอร์ PBS ให้ได้ความเข้มข้น 2% (w/v) ผสมสารละลายสารชีวภาพกับน้ำเลือดให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1, 2, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลา จนครบเวลา 1 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ใช้ Triton X-100 (1% v/v) เป็น positive control และบัฟเฟอร์ PBS เป็น negative control (Carreno-Gomez and Duncan, 1997)

$$\% \text{ red blood cell lysis} = \frac{\text{sample - PBS}}{\text{Triton X-100 - PBS}} \times 100$$

2.5 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน น้ำหนักโมเลกุลและการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุล

วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของสารชีวภาพโดยเครื่อง Fourier-transfrom infrared (FT-IR) spectroscopy (Dermlim *et al*., 1999) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาค่าน้ำหนักโมเลกุลและค่าการแจกแจงน้ำหนักโมเลกุลของสารชีวภาพโดยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) (ศิริพร หมาดหล้า, 2544) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC)

3. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.1 การคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น (Primary screening)

นำแบคทีเรียทนร้อนทั้ง 2 สายพันธุ์เขี่ยลงบนอาหารแข็ง blood agar plates ที่ประกอบด้วยเลือดคน 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สังเกตวงใสที่เกิดรอบ ๆ โคโลนี (Carrillo *et al*., 1996) ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มว่าสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวได้ และเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 2.1 เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 0, 6, 12, 18,

24, 30, 36, 42, 48, 60, 72 และ 96 ชั่วโมงเพื่อวัดค่าแรงตึง (surface tension) โดยการนำส่วนใสที่ผ่านการแยกเอาเซลล์ออกแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร วัดแรงตึงผิวด้วยเครื่อง Torsion balance ที่คณะวิศวกรรมศาสตร์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank และควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างและอุณหภูมิห้องให้เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส

3.2 การสกัดสารชีวภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกและการทำบริสุทธิ์บางส่วน

ทำการผลิตสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ CH11 และ FT3 (ตามวิธีการในข้อ 2.1) แล้วนำน้ำหมักไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อแยกตัวเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำสารละลายส่วนใสที่ได้ปรับพีเอชให้เท่ากับ 2.0 ด้วย 6 M HCl ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและมีการกวนตลอดเวลา แยกตะกอนที่ได้โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ปรับพีเอชเท่ากับ 2.0 เป็นจำนวน 3 ครั้ง ตะกอนที่ได้เรียกว่า “acid precipitate” นำมาละลายกับน้ำกลั่นแล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 2 M NaOH นำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer และชั่งน้ำหนัก (Yakimov *et al*., 1995)

นำตะกอน “acid precipitate” มาละลายกับ 0.02 M Tris-HCl pH 7.3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาทดสอบความสามารถในการกระจายน้ำมัน (ค่า ODA) และทำการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวด้วยการเติมเอทิลอะซิเตท/คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันในกรวยแยก โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะละลายอยู่ในชั้นของตัวทำละลาย และนำส่วนใสส่วนล่างมาทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมตัวทำละลายที่ได้ทั้งหมดนำมากำจัดตัวทำละลายออกด้วยการระเหยโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรของสารละลายในขวดระเหยเท่ากับ 2 มิลลิลิตร นำไประเหยต่อจนแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ชั่งน้ำหนัก เก็บ “crude biosurfactant” ในหลอดฝาเกลียวขนาดเล็กเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (Prommachan, 2002)

3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.1 วิธี Thin-layer chromatography (TLC) : ผลของชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลาย

TLC เป็นการแยกองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในขั้นต้น (Passeri *et al*., 1991; Carrillo *et al*., 1996) นำ crude biosurfactant ที่ได้ (จากข้อ 3.2) มา spot บนแผ่น TLC aluminium sheet silica gel 60 F_{254} ให้ตัวอย่างมีลักษณะเป็นจุดนำไปแช่ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ต่าง ๆ กัน ได้แก่

	อัตราส่วน
Chloroform : Hexane : Methanol	25 : 15 : 15
Chloroform : Hexane : Acetic acid	45 : 25 : 1
Chloroform : Hexane : Acetic acid : H_2O	60 : 30 : 1 : 1
	25 : 15 : 4 : 2
Chloroform : Methanol	95 : 5
Chloroform : Methanol : Acetone	90 : 10 : 6
Chloroform : Methanol : Acetic acid : H_2O	50 : 5 : 4 : 1
	40 : 10 : 2 : 1
	25 : 15 : 4 : 2
Chloroform : Methanol : H_2O	85 : 15 : 2
	65 : 25 : 4
	40 : 25 : 2
Methanol : Acetone : Acetic acid	80 : 10 : 1
Methanol : Acetone : Ether	80 : 10 : 5
Methanol : H_2O	90 : 10
Butanol : Acetone : H_2O	32 : 48 : 8

เปรียบเทียบลักษณะของแถบที่แยกได้ภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่นสั้น 280 นาโนเมตร เลือกใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ทำให้ crude biosurfactant แยกแถบออกจากกันได้ดีที่สุด แล้วจึงนำแผ่น TLC aluminium sheet silica gel 60 F_{254} ที่ได้มาหาองค์ประกอบ (Dawson *et al*., 1986)

ก. คาร์โบไฮเดรต วิเคราะห์ด้วยวิธี Alkaline potassium permanganate และ Iodine ดังนี้

ก.1 Alkaline potassium permanganate สเปรย์ด้วยสารละลายที่มี 1% aq. $KMnO_4$ และ 2%$NaCO_3$ ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรืออย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ถ้ามี sugar alcohols, glycosides, reducing หรือ non-reducing sugar จะปรากฏจุดสีเหลืองบนพื้นสีม่วง แล้วจะเปลี่ยนเป็นจุดสีเทาบนพื้นสีน้ำตาล

ก.2 Iodine นำเกล็ดไอโอดีนเก็บในขวดแก้วที่มีฝาปิดให้ไอกระจายทั่ว นำแผ่น TLC ที่ต้องการทราบวางในขวดประมาณ 15 นาที ถ้าเป็นสีน้ำตาลแดงแสดงว่ามี sugar mercaptals,

alcohols, glycosides, hexonicacides, N-acylamino sugar และ neutral หรือ acidic polysaccharide

ข. ไขมัน วิเคราะห์ด้วยวิธี Iodine และ Rhodamine 6G ดังนี้

ข.1 Iodine วิธีการเช่นเดียวกับในข้อ ก.2 ใช้ตรวจผลไขมันทั่วไป และไขมันที่มี non-reducing carbohydrates เป็นองค์ประกอบ

ข.2 Rhodamine 6G สเปรย์กับสารละลาย 0.001% aq. Rhodamine 6G ที่ละลายใน 0.25 M K_2HPO_4 ส่องดูทั้งเปียกภายใต้แสงยูวี ปรากฏจุดสีน้ำเงินและสีเหลืองบนพื้นสีส้มอมชมพู

ค. กลุ่มอะมิโน วิเคราะห์ด้วยวิธี UV light และ Ninhydrin ดังนี้

ค.1 ภายใต้แสงยูวี กลุ่มอะมิโนสามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มแอลดีไฮด์อิสระ (free aldehyde groups) ในแผ่นTLC ซึ่งเมื่อนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสงยูวี ปรากฏเป็นจุดสีน้ำเงิน

ค.2 Ninhydrin สเปรย์กับสารละลาย ninhydrin (เตรียมโดยละลาย ninhydrin 0.25 กรัมในอะซิโตน 100 มิลลิลิตร) ให้ความร้อนโดยอบในตู้อบ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สีที่ปรากฏแสดงว่ามีองค์ประกอบของอะมิโนกลุ่มต่าง ๆ คือ สีแดง เป็นกลุ่มของ histidine และ glycine, สีน้ำเงินเป็นกลุ่มของ phynylalanine, tyrosine และ aspartic, สีน้ำตาล เป็นกลุ่มของ tryptophan, สีเหลืองดำ เป็นกลุ่มของ asparagine, สีเหลือง เป็นกลุ่มของ proline และสีม่วงเป็นสีของ amino acids

3.3.2 วิธี Fourier-transfrom infrared (FT-IR)

หาหมู่ฟังก์ชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเครื่องมือ Fourier-transfrom infrared (FT-IR) spectroscopy ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (Tuleva *et al*., 2002)

3.4 คุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์

ทดสอบความสามารถการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยการวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar diffusion method เตรียมสารละลายของสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย ใช้ยามาตราฐาน chloramphenicol เป็น positive control และคลอโรฟอร์มเป็น negative control เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีการที่ระบุไว้ข้างต้น (ตามข้อ 2.4.4)