บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกได้เป็น 4 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 การศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ส่วนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในถังหมัก (fermenter) ที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ส่วนที่ 3 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ส่วนที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการประยุกต์ใช้ในด้านการบำบัดสภาพแวดล้อม อุตสาหกรรมปิโตรเลียม และอุตสาหกรรมอื่นๆ

4.1 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการเก็บเกี่ยวน้ำมัน (Oil removal) โดยวิธี sand pack test

4.2 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการคืนกลับของน้ำมัน (Oil recovery) โดยวิธี De-emulsification

4.3 การประยุกต์ใช้ลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพในการเกิดอิมัลชัน (Emulsification) โดยวิธี Emulsification stability

4.4 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพในการเกิดฟอง (Foamability) โดยวิธี Foamability

อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการดำเนินการวิจัย

1.1 ชุดเครื่องแก้วสำหรับทดลอง เช่น ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ หลอดทดลอง

1.2 ชุดอุปกรณ์สำหรับย้อมสีแกรม เช่น แผ่นสไลด์ กระดาษซับ สีสำหรับย้อมแกรม

1.3 ชุดอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ จานเพาะเชื้อ ห่วงเขี่ยเชื้อ ตะเกียง เป็นต้น

1.4 ชุดทดสอบ sand pack test ประกอบด้วย บิวเรต ขาตั้งบิวเรต กระบอกตวง

1.5 ชุด foam recycling system

1.1.6 ชุดสำหรับสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประกอบด้วย กรวยแยก ขาตั้งกรวยแยก

1.1.7 ไมโครปิเปต และ ปิเปต

1.1.8 ตะแกรงร่อน (sieve) ขนาด 250, 500 ไมครอน

2. **เครื่องมือสำหรับใช้ในการดำเนินการวิจัย**

2.1 เครื่อง Fermenter (RW 20 DZM, IKA-Labortechnik)

2.2 เครื่องระเหยสุญญากาศ (BUCHI Rotavapor R-300VL)

2.3 เครื่อง Freeze-dried (Freeze dryer Dura-Top/Dura-Stop MP DURA DRY MP)

2.4 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX50)

2.5 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius AC 210S)

2.6 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius MC1)

2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall RC 26 Plus)

2.8 เครื่อง Vortex (Vortex-genic 2)

2.9 เครื่องวัดแรงตึงผิว (Cole-parmer Tensiometers/RK-59951-12)

2.10 หม้อนึ่งความดันไอ (Sturdy SA-300VL)

2.11 ตู้แยกเชื้อ (IDFASTER Bio72)

2.12 ตู้บ่มเชื้อ Shaker incubator (Innova 4230)

2.13 ตู้อบ Hot air oven (Memmert)

2.14 เครื่อง Spectrophotometer (Spectronic Genesys 5)

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียตัวอย่างคือ *Enterobacter cloacae* LK5 แยกได้จากบ่อดักตะกอนน้ำมันในแหล่งขุดเจาะน้ำมันสิริกิติ์ อำเภอลานกระบือ จังหวัดกำแพงเพชร

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **สารเคมี**

1.1 Tris-HCl buffer pH 7.3 (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก.)

1.2 Acetic acid

1.3 Ethanol

1.4 Methanol

1.5 Chloroform

1.6 Acetone

1.7 Toluene

1.8 Hexane

1.9 Sodium dodecyl sulfate (SDS)

1.10 NaOH

1.11 H_2SO_4

1.12 HCl

1.13 NH_4NO_3

1.14 $(NH_4)_2SO_4$

1.15 Glutamic acid

1.16 Peptone

1.17 น้ำตาลกลูโคส

1.18 น้ำตาลทราย

1.19 น้ำมันถั่วเหลือง

1.20 กากน้ำตาล

1.21 น้ำมันหล่อลื่น (lubricanting oil, 10W-40)

1.22 น้ำมันก๊าด (kerosene oil)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM) (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก.)

2.2 Nutrient broth (NB) (Difco)

2.3 Nutrient agar (NA) (Difco)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1.1 เลี้ยงเชื้อ *Enterobacter cloacae* LK5 ในอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.1.2 เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Nutrient broth อยู่ 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้อากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.2 การศึกษาชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม

1.2.1 แหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ในการศึกษาคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทราย น้ำมันถั่วเหลือง และ กากน้ำตาล โดยใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร MSM ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ในการศึกษาคือ $NaNO_3$, NH_4NO_3, Glutamic acid และ Peptone โดยใช้ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.125, 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร MSM ตามลำดับ (ตาราง 2)

1.2.2 เลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM โดยใช้เชื้อเริ่มต้นจากข้อ 1.1 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงเชื้อใน shaker-incubator ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

1.2.3 ทำการทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยวิธี Emulsification capacity test (EC) และ Emulsification activity (EA) เพื่อทำการเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดีที่สุดมาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวต่อไป

การหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยในการศึกษานั้นจะศึกษาหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยเป็นการทดลองแบบแฟคทอเรียลและความเหมาะสมด้วยวิธี fractional factorial design (FFD) โดยใช้ ค่าต่ำ กลาง และ สูง ของแต่ละตัวแปรทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

ตาราง 2 การวางแผนแบบ fractional factorial design (FFD) เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตัวแปร	ระดับ		
	ต่ำ	กลาง	สูง
แหล่งคาร์บอน (%)	1	2	4
- กลูโคส			
- น้ำตาลทราย			
- กากน้ำตาล			
- น้ำมันถั่วเหลือง			
แหล่งไนโตรเจน (%)	0.125	0.25	0.5
- $NaNO_3$			
- NH_4NO_3			
- glutamic acid			
- peptone			

2. การทดสอบคุณสมบัติบางประการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.1 **การทดสอบคุณสมบัติ** Emulsification capacity test (EC) (ดัดแปลงจาก Ghurye และ Vipulananda, 1994 โดยใช้น้ำมันหล่อลื่น 10W-40 แทน n-hexadecane)

2.1.1 นำ fermentation broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากข้อ 1. และ 0.02 M Tris-HCl buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง (ขนาด 1.6 x 15 ซม.) จากนั้นเติมน้ำมันหล่อลื่นลงไป 2 หยดแล้วทำการชั่งน้ำหนักไว้ [ให้บันทึกเป็น W_1 (หักน้ำหนักหลอด)]

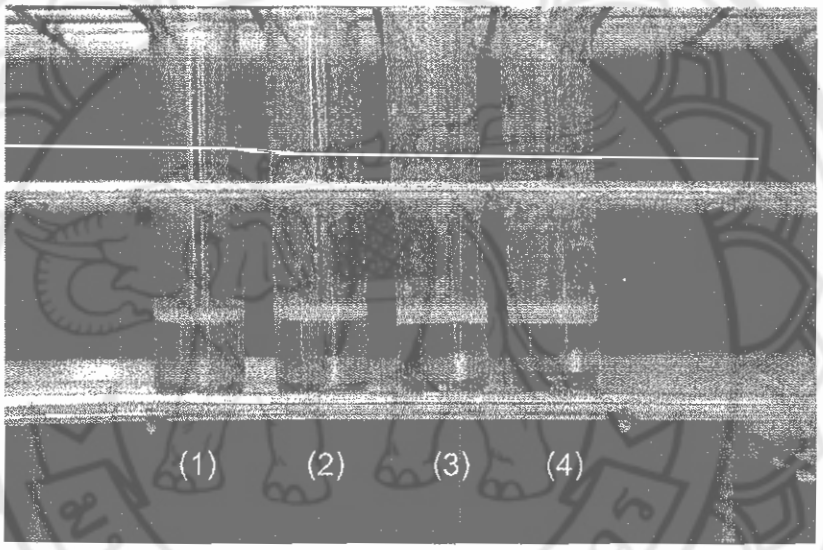
2.1.2 เติมน้ำมันหล่อลื่นลงไป 2 หยด นำไปผสมกันโดยใช้ vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที

2.1.3 ดูผลการทดลองโดยดูลักษณะของอิมัลชันว่าเกิดการสลายตัวหรือไม่ถ้าลักษณะของอิมัลชันสลายตัวให้บันทึกผลการทดสอบ แต่ถ้าอิมัลชันไม่สลายตัวให้ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 และ 2.1.3 ไปเรื่อยๆ จนลักษณะของอิมัลชันสลายตัว (ภาพ 11)

2.1.5 ชั่งน้ำหนักไว้ [ให้เป็น W_2 (หักน้ำหนักหลอด)]

2.1.6 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ Emulsification capacity test (%EC) จากสูตร

$$EC = \frac{(W_2 - W_1)}{W_1} \times 100 \quad \%$$



ภาพ 11 การทดสอบ Emulsification capacity test

หลอดที่ 1 Lubricanting oil (2 drops) + biosurfactant 2 ml + 0.2 M Tris-HCl buffer 2 ml

หลอดที่ 2 Lubricanting oil (4 drops) + biosurfactant 2 ml + 0.2 M Tris-HCl buffer 2 ml

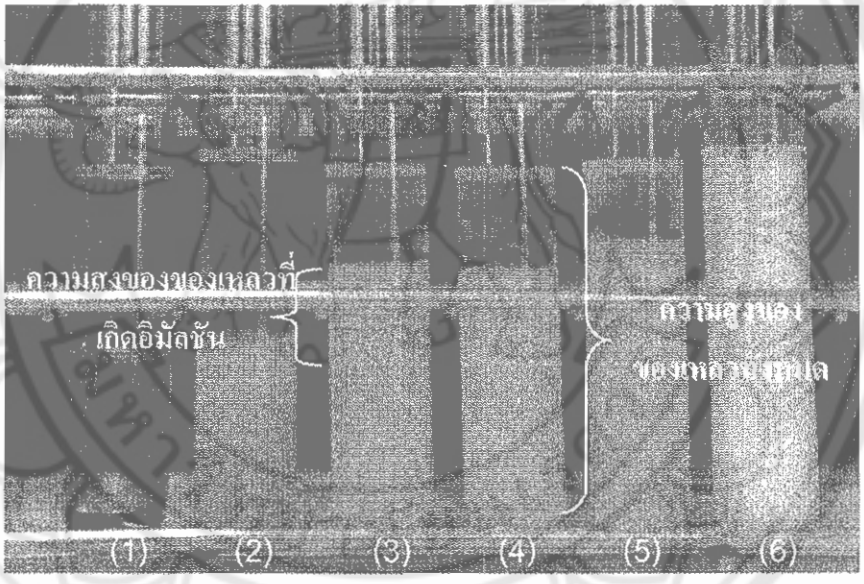
หลอดที่ 3 Lubricanting oil (8 drops) + biosurfactant 2 ml + 0.2 M Tris-HCl buffer 2 ml

หลอดที่ 4 Lubricanting oil (10 drops) + biosurfactant 2 ml + 0.2 M Tris-HCl buffer 2 ml.

2.2 การทดสอบคุณสมบัติ Emulsification activity (EA) (Cooper and Paddock, 1983)

เติมน้ำมันก๊าดปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี fermentation broth จากข้อ 1 อยู่ 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วย vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Emulsification activity จากสูตร

$$EA = \frac{\text{ความสูงของของเหลวที่เกิดอิมัลชัน}}{\text{ความสูงของของเหลวทั้งหมด}} \times 100\ \%$$



ภาพ 12 การทดสอบ Emulsification activity

หลอดที่ 1 น้ำมันก๊าด + น้ำกลั่น

หลอดที่ 2 น้ำมันก๊าด + fermentation broth ยังไม่ได้นำไป vortex

หลอดที่ 3, 4 และ 5 น้ำมันก๊าด + fermentation broth หลังนำไป vortex

หลอดที่ 6 น้ำมันก๊าด + SDS

2.3 การทดสอบคุณสมบัติ Oil displacement area (Morikawa, Hirata and Imanaka, 2000)

2.3.1 ทำการปิดเปตน้ำมันหล่อลื่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวของน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในจาน (plate เส้นผ่านศูนย์กลาง 95 มิลลิเมตร) ซึ่งจะทำให้เกิดแผ่นฟิล์มบางๆ เกิดขึ้น

2.3.2 จากนั้นทำการหยดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของแผ่นฟิล์มน้ำมัน ซึ่งจะทำให้เกิดช่องว่างใสเกิดขึ้นโดยสามารถดูได้ภายใต้แสงไฟ โดยคำนวณหาค่า Oil displacement area จากสูตร

$$ODA = \frac{22}{7} (\text{รัศมี})^2 \quad \text{ตารางเซนติเมตร}$$

ภาพ 13 การทดสอบ Oil displacement area

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในถังหมัก (fermenter) ที่มีผลต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.1 นำเชื้อแบคทีเรีย (จากข้อ 1.1) มาปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (จากข้อ 1.2) อยู่ 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด

3.2 เลี้ยงเชื้อใน shaker – incubator ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3 นำเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 100 มิลลิลิตร เติมลงในถังหมัก ที่มีอาหาร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (ข้อ 1.2) อยู่ 900 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยมีอัตราการหมุนของใบพัดเท่ากับ 250, 300 และ 350 รอบต่อนาที และอัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 Volume air/Volume medium/min (vvm) (ตาราง 3)

3.4 ทดสอบการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยวิธี Emulsification capacity test (EC) และ Emulsification activity (EA)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในถังหมักที่ใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในการศึกษานั้นจะศึกษาหาอัตราการหมุนของใบพัดและอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสม โดยเป็นการทดลองแบบแฟคทอเรียลและความเหมาะสมด้วยวิธี fractional factorial design (FFD) โดยใช้ค่าต่ำ กลาง และสูง ของแต่ละตัวแปรทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

ตาราง 3 การวางแผนแบบ fractional factorial design (FFD) เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในถังหมักที่ใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตัวแปร	ระดับ		
	ต่ำ	กลาง	สูง
อัตราการหมุนของใบพัด(รอบต่อนาที)	250	300	350
อัตราการเติมอากาศ (vvm)	0.5	1.0	1.5

4. **การศึกษาจลนศาสตร์ของการหมัก** (fermentation kinetics)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในถังหมัก ที่มีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในถังหมักที่เหมาะสม (จากข้อ 3.) โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดการเจริญของเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์ปริมาณของ reducing sugar ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) Emulsification capacity test (EC) Emulsification activity (EA) Surface Tension และ น้ำหนักแห้งของเซลล์ คำนวณหาค่า Yield, Volumetric productivity, Specific growth rate และ ปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย

5. การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและศึกษาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

5.1 การสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) (Nitschke and Pastore, 2006)

5.1.1 นำน้ำหมักชีวภาพ (จากข้อ 3.) ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักชีวภาพ

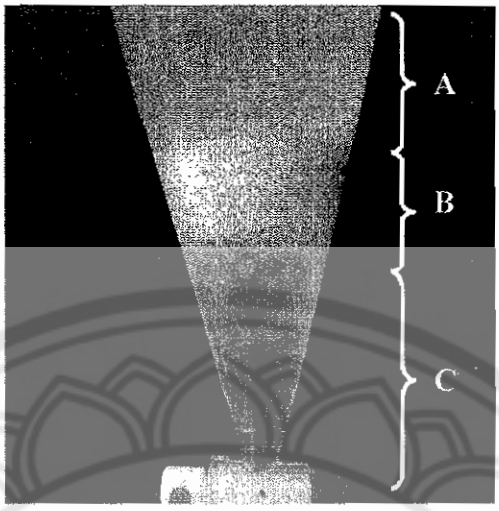
5.1.2 นำส่วนที่เป็น supernatant มาปรับ pH ให้เป็น 2 โดยใช้ H_2SO_4 เข้มข้น 6 N

5.1.3 นำส่วน supernatant ที่ปรับ pH เรียบร้อยแล้ว มาสกัดด้วย คลอโรฟอร์มและเมทานอล (2:1) โดยใช้ supernatant 1 ส่วนผสมกับคลอโรฟอร์ม /เมทานอล 1 ส่วน จากนั้นทำการสกัดสารเป็นเวลา 5 นาที แยกเก็บส่วนที่เป็นตัวทำละลายที่อยู่ด้านล่างไว้ จากนั้นสกัด supernatant ซ้ำอีกครั้ง และแยกเก็บส่วนที่เป็นตัวทำละลายรวมกันไว้

5.1.4 จากข้อ 5.1.3 หลังจากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดการแยกชั้นของตัวทำละลาย ทำการเก็บส่วนที่เป็นตัวทำละลายส่วน C (ภาพ 13) ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หลังจากตัวทำละลายแยกออกหมดแล้วให้เก็บส่วนที่เหลือมาชั่งน้ำหนักเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สกัดได้

5.2 การสกัดสารก่ออิมัลชันชีวภาพ (bioemulsifier)

จากข้อ 5.1.3 หลังจากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเกิดการแยกชั้นของตัวทำละลาย ทำการเก็บส่วนที่เป็นตัวทำละลายส่วน B และส่วน C (ภาพ 14) ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หลังจากตัวทำละลายแยกออกหมดแล้วให้เก็บส่วนที่เหลือมาชั่งน้ำหนักเป็นสารก่ออิมัลชันชีวภาพที่สกัดได้



ภาพ 14 การแยกชั้นของสารสกัดและอาหารเลี้ยงเชื้อ
A ชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ
B,C ชั้นของสารก่ออิมัลชันชีวภาพ
C ชั้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

6. การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

6.1 การศึกษาคุณสมบัติการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพในตัวทำละลายชนิดต่างๆ

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ปริมาตรโดยปริมาตร) และสารก่ออิมัลชันชีวภาพ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบการละลายในตัวทำละลายต่างๆ คือ Methanol, Acetone, Chloroform, Toluene และ Hexane ผสมให้เข้ากัน บันทึกผลการละลายของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพ เพื่อศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพก่อนการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) (Dawson et al., 1986)

6.2.1 นำ crude biosurfactant ที่ได้จากข้อ 5 มา spot ลงบนแผ่น TLC aluminum sheet silica gel 60 F254 ให้ตัวอย่างมีลักษณะเป็นจุด

6.2.2 นำแผ่น TLC ไปแช่ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ toluene : acetone ในอัตราส่วน 1 : 1 (ดูวิธีการหาอัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ในภาคผนวก ข)

6.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1) การวิเคราะห์ไขมัน โดยวิธี Iodine และ Rhodamine

Iodine ทำโดยนำเกล็ดไอโอดีนเก็บในขวดแก้วที่มีฝาปิดให้ไอกระจายทั่ว นำแผ่น TLC ที่ต้องการทราบวางในขวดแก้วเป็นเวลา 15 นาที ถ้าเป็นสีน้ำตาลแดงแสดงว่ามีไขมันทั่วไป และไขมันที่มี non-reducing carbohydrates เป็นองค์ประกอบ

Rhodamine B ทำโดยการสเปรย์ 0.001 เปอร์เซ็นต์ aq. Rhodamine B ที่ละลายใน 0.25 M K_2HPO_4 ส่องดูทั้งที่ยังเปียกภายใต้แสงยูวี (UV light) ปรากฏจุดสีน้ำเงินและสีเหลืองบนพื้นสีส้มอมชมพู

2) การวิเคราะห์กลุ่มอะมิโน โดยวิธี UV light

ภายใต้แสงยูวี โดยกลุ่มอะมิโนสามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มแอลดีไฮด์อิสระ (free aldehyde groups) ในแผ่น TLC ซึ่งเมื่อนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสงยูวีจะปรากฏเป็นจุดสีน้ำเงิน

3) การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต โดยวิธี Alkaline potassium permanganate

Alkaline potassium permanganate ทำได้โดยการสเปรย์ด้วยสารละลายที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ aq. $KMnO_4$ และ 2 เปอร์เซ็นต์ $NaCO_3$ ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรืออย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ถ้ามี sugar, alcohols, glycosides, reducing หรือ non-reducing sugar จะปรากฏจุดสีเหลืองบนพื้นสีม่วง แล้วจะเปลี่ยนเป็นจุดสีเท่าบนพื้นสีน้ำตาล

6.3 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพด้วยวิธี Fourier transform infrared (FT-IR)

วิเคราะห์โดย Fourier transform infrared (FT-IR) เพื่อหาองค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพ โดยส่งวิเคราะห์ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการประยุกต์ใช้ในด้านการบำบัดสภาพแวดล้อม อุตสาหกรรมปิโตรเลียม และอุตสาหกรรมอื่น ๆ

7.1 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในด้านการบำบัดสภาพแวดล้อมโดยการทดสอบความสามารถในการเก็บเกี่ยวน้ำมัน (Oil removal) **โดยวิธี** sand pack test (Makkar and Cameotra, 2002)

7.1.1 การเตรียมตัวอย่างทราย ทำโดยการร่อนทรายด้วยตะแกรงขนาด 250 ไมโครเมตร และ 500 ไมโครเมตร โดยจะคัดเลือกเอาทรายที่มีขนาดระหว่าง 250 ไมโครเมตร

ถึง 500 ไมโครเมตร มาใช้ในการทดลอง ทำการแช่ทรายด้วย HCl เข้มข้น 1 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำร้อน 2-3 ครั้ง และน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เมื่อทรายแห้งดีแล้วทำการชั่งทราย 50 กรัม เติมลงในบิวเรตที่มีการปิดด้วยสำลีแล้ว

7.1.2 เติมน้ำมันก๊าดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในบิวเรตแล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

7.1.3 เติม crude biosurfactant ที่ผสมอยู่กับบัฟเฟอร์ปริมาตร 1, 5, และ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไปปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงไป

7.1.4 ใช้กระบอกตวงวัดปริมาณน้ำมันก๊าดที่แยกถูกออกมา นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยวน้ำมันจากสูตร

$$\%\ \text{oil removal} = \frac{\text{ปริมาณน้ำมันก๊าดที่แยกออกมา}}{\text{ปริมาณน้ำมันก๊าดที่เติมลงไป}} \times 100 \quad \%$$

7.2 การประยุกต์ใช้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพในด้านอุตสาหกรรมปิโตรเลียมโดยการทดสอบความสามารถในการคืนกลับน้ำมัน (oil recovery) **โดยการศึกษาคุณสมบัติ De-emulsification** (Nadarajah, Singh and Owen, 2001)

7.2.1 **วิธีการเตรียม** Kerosene–water model emulsion

1) นำ Span 80® (ICI, Wilmington, USA) ปริมาณ 0.8 กรัม ผสมกับน้ำมันก๊าดปริมาณ 1 ลิตร (Span 80-kerosene solution)

2) นำ Tween 80® (ICI) ปริมาณ 1 กรัม ผสมกับน้ำที่ปราศจากไอออนปริมาตร 1 ลิตร (Tween 80-water solution)

3) นำ stock solution ทั้งสองชนิดมาผสมเข้าด้วยกัน โดยนำ Tween 80-water solution ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำ Span 80-kerosene solution ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ค่อยๆ หยดลงไปขณะที่มีการผสมด้วย vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุด

4) ปิดฝาของหลอดทดลอง จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันอีกครั้งหนึ่งด้วย vortex mixer ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 3 นาที ได้เป็น Kerosene–water model emulsion

7.2.2 การทดสอบการเกิด De-emulsification

1) นำน้ำหมักชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ปริมาตรโดยปริมาตร) เข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบ โดยนำสารทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงใน Kerosene–water model emulsion ปริมาตร 9 มิลลิลิตร

2) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ด้วยความเร็วสูงสุดประมาณ 20 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) เตรียมชุดควบคุมเพื่อนำมาเปรียบเทียบผลการทดลอง โดยเตรียมเช่นเดียวกับหลอดทดลอง แต่แทนส่วนของน้ำน้ำหมักชีวภาพและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยอาหาร mineral–salt medium, 0.02 M tris-HCl buffer pH 7.3 และ SDS (น้ำหนักโดยปริมาตร) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4) สังเกตผลการทดลอง คำนวณหา % Oil recovery โดยดูจากปริมาณน้ำมันที่แยกชั้นออกมา และคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Oil recovery} = \frac{\text{ปริมาณอิมัลชันเริ่มต้น} - \text{ปริมาณอิมัลชันสุดท้าย}}{10} \times 100$$

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารก่ออิมัลชันชีวภาพในการประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมอื่นๆ โดยทดสอบคุณสมบัติ Emulsification stability (Das, Das and Mukherjee, 1998) และ Foamability (ดัดแปลงจาก Lee and Kim, 2004)

7.3.1 การทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsification stability)

1) เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ปริมาตรโดยปริมาตร) และสารก่ออิมัลชันชีวภาพ (น้ำหนักโดยปริมาตร) เข้มข้น 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน 0.02 M Tris-HCl buffer pH 7.3 และน้ำหนักชีวภาพแยกเซลล์และไม่แยกเซลล์

2) นำน้ำมันก๊าดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารทดสอบอยู่ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วย vortex ที่ระดับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที บันทึกผลการทดลองเป็นช่วงเวลา คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ Emulsification volume (% EV) และนำมาหาค่า Emulsification stability (% ES) จากสูตร

$$\%EV = \frac{\text{Emulsion height (mm) x cross-section area (mm}^2\text{)}}{\text{Total liquid volume (mm}^3\text{)}} \times 100$$

$$\%ES = \frac{\%EV, \%\text{at time } t, \text{h}}{\%EV, \%\text{at 0 h}} \times 100$$

7.3.2 **การทดสอบความสามารถในการเกิดฟอง** (Foamability)

ทำการเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ปริมาตรโดยปริมาตร) และสารก่ออิมัลชันชีวภาพ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ 0.02 M Tris-HCl buffer และ 1 เปอร์เซ็นต์ SDS เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยเติมสารตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในกระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมอากาศในอัตรา 100 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับทำการจับเวลา สังเกตุปริมาตรฟองที่เกิดขึ้น โดยเมื่อฟองมีความสูงถึงปริมาตร 250 มิลลิลิตร ให้หยุดเวลาและทำการบันทึกเวลาไว้ บันทึกปริมาตรของสารตัวอย่างที่ไม่เกิดฟอง โดยอัตราการเกิดฟองสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Foamability rate (ml/min)} = \frac{250 - \text{ปริมาณสารตัวอย่างที่ไม่เกิดฟอง}}{\text{เวลาที่ใช้ไป (นาที)}}$$

8. **การวิเคราะห์ข้อมูล**

ข้อมูลผลการวิจัยที่เป็นเปอร์เซ็นต์ เช่น Emulsification activity และ Emulsification capacity จะทำการแปลงข้อมูลโดยวิธี Arcsine transformation ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลมีดังนี้ คือ

8.1. One – way ANOVA **ใช้ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลต่างๆ ในกรณีที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จะทำการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างเฉลี่ย โดยใช้วิธี** Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) test

8.2. Two – way ANOVA สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในถังหมัก

มหาวิทยาลัยนเรศวร