ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Minimal salt medium (ดัดแปลงจาก Shabtai and Gutnick, 1985)

$K_2HPO_4.3H_2O$	2.2 g/l
KH_2PO_4	0.73 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/l
NaCl	30 g/l
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g/l
pH 7.0	

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Seawater medium (ดัดแปลงจาก Ana *et al.,* 2000)

NH_4NO_3	1 g/l
Yeast extract	0.2 g/l
Phosphate solution	4 ml/l
- $Na_2HPO_4.12H_2O$	25 g/l
- NaH_2PO_4	3.6 g/l
pH 7.0	

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยใช้วิธี Lowry method (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย I

สารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2% ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

2. สารละลาย II

เตรียม $CuSO_4.5H_2O$ ความเข้มข้น 1% ในสารละลาย sodium potassium tatrate ความเข้มข้น 1%

3. สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (Alkaline copper solution)

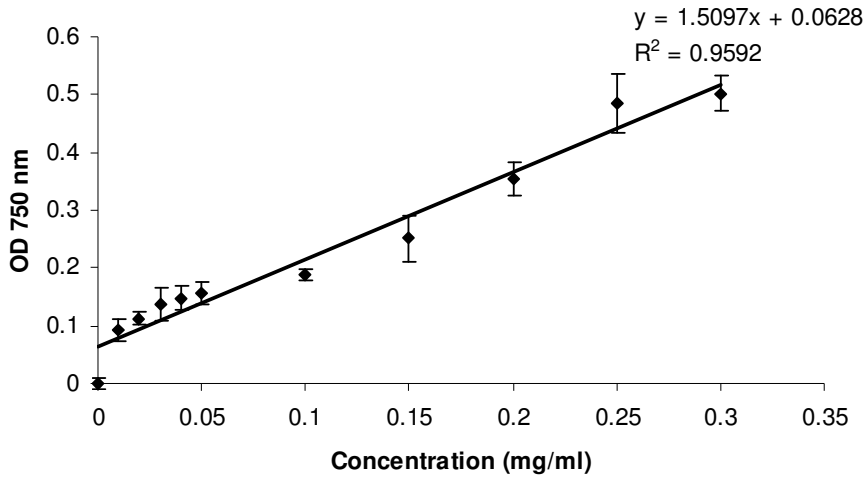
เตรียมโดยผสมสารละลาย I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย II ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมก่อนใช้

4. Folin-ciocateus reagent

เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1 อย่างรวดเร็วก่อนใช้

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม folin-ciocateus reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานโปรตีนโดยวิธี Lowry method

Figure 14. Standard curve of protein

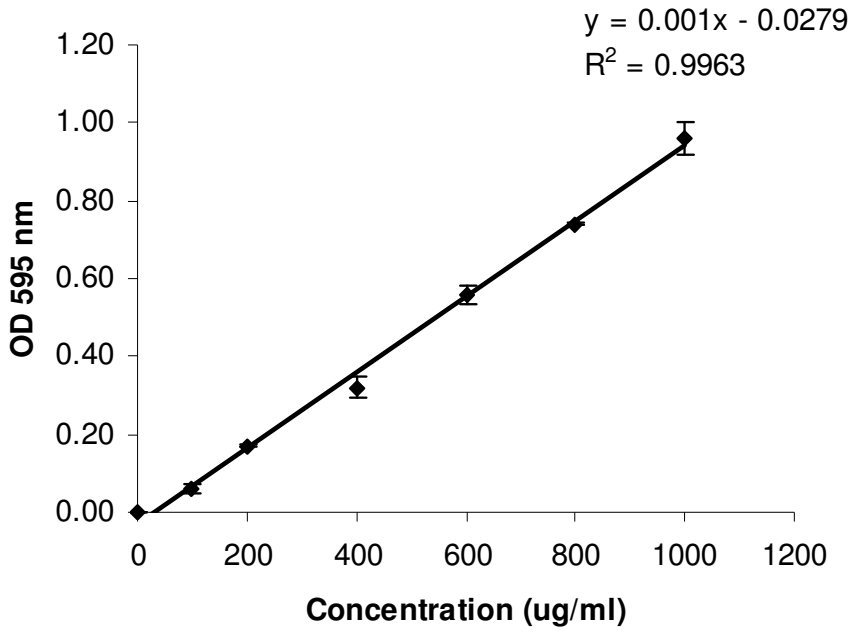
2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford method (Bradford, 1976)

สารเคมี

1. สารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent)

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายแบรดฟอร์ด 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 100 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานโปรตีนโดยวิธี Bradford method

Figure 15. Standard curve of protein

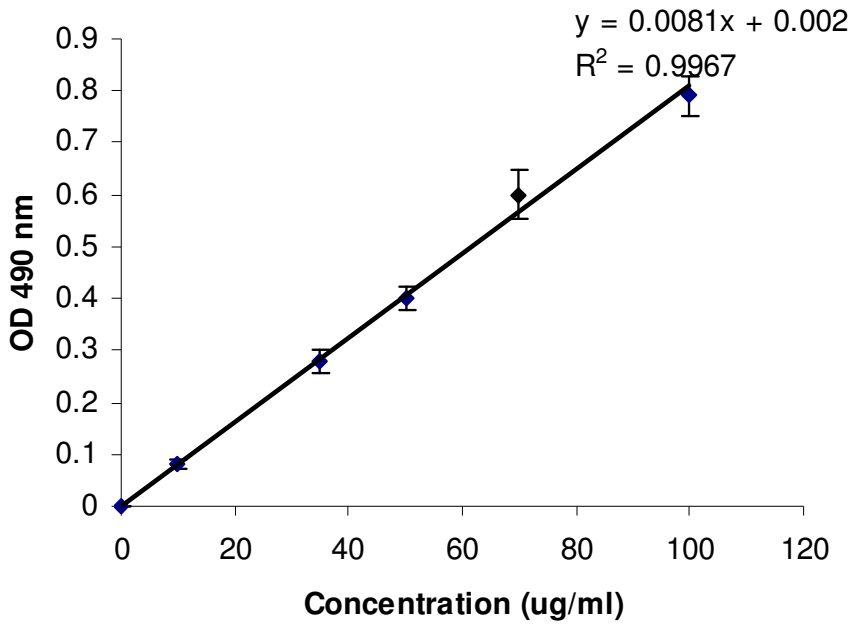
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5%
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10, 35, 50, 70, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น5% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ให้สัมผัสกับสารละลายโดยตรงอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 100 ไมโครลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-sulfuric method

Figure 16. Standard curve of total sugar

ภาคผนวก ค

Spraying reagent

1. Ninhydrin reagent

เตรียมโดยนำ ninhydrin 0.3 กรัม ละลายใน 1-butanol 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม gracial acetic acid ลงไป 3 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบหมู่อะมิโนอิสระ ซึ่งจะปรากฏจุดสีม่วงโดยมีพื้นหลังเป็นสีขาวบนแผ่น TLC หลังจากให้ความร้อน 105 องสาเซลเซียส นาน 10 นาที

2. Rhodamine B

เตรียมโดยนำ rhodamine B 0.25 กรัม ละลายในเอธานอล 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใช้ในการทดสอบกรดไขมัน ซึ่งจะปรากฏจุดสีชมพูบนแผ่น TLC เมื่อมองภายใต้ UV

3. Anisaldehyde

เตรียมโดยผสม anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร กับ เอธานอล 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร และ กรดอะซิติก 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้ในการทดสอบน้ำตาล ซึ่งจะปรากฏจุดสีม่วงเข้มโดยมีพื้นหลังเป็นสีชมพูบนแผ่น TLC หลังจากให้ความร้อน 105 องสาเซลเซียส นาน 10-15 นาที