ภาคผนวก ก.
การวิเคราะห์ทางเคมีของผลิตภัณฑ์โพลิเมอร์

1. การทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโพลิเมอร์ (Bradford, 1976)

สารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย Coomassie blue

โดยการชั่ง coomassie blue G250 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด แล้วจึงเติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA (Bovin serum albumin)

โดยการชั่ง BSA 0.25 กรัม ละลายน้ำปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตสารละลายนี้มา 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์

3. การทำกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน BSA 0.04 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในของเหลวปริมาตรดังแสดงในตารางที่ 25 เติมน้ำจนได้สารละลายโปรตีน 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย coomassie blue 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีแล้วจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

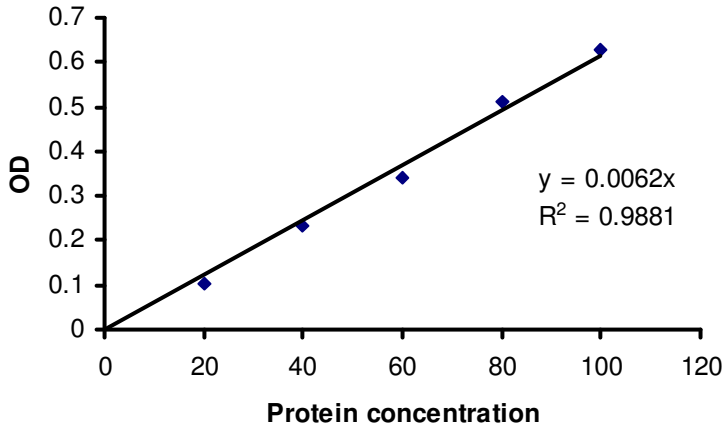
4. การวิเคราะห์โปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย coomassie blue 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 26 แสดงการเตรียมสารละลาย 0.04 เปอร์เซ็นต์ BSA เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

Table 26. The preparation of 0.04 %BSA for standard curve.

Protein concentration (µg)	0.04 % BSA (µl)	Distilled water (µl)	Coomassie blue (ml)
0	-	200	10
10	25	175	10
20	50	150	10
30	75	125	10
40	100	100	10
50	125	75	10
60	150	50	10
70	175	25	10
80	200	-	10



รูปที่ 13. กราฟมาตรฐานโปรตีน

Figure 13. Standard curve of protein concentration.

ตารางที่ 27 ปริมาณโปรตีนของโพลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อ CNBP001

Table 27. Protein concentration from polymer produced by CNBP001.

Sample	Protein concentration (mg/g polymer)
polymer	27.96±0.1

2. การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography)

(Lato *et al*., 1968, Rcbyt and White, 1987)

1. การเตรียมแผ่นโครมาโทกราฟีแผ่นบางสำหรับทดสอบคาร์โบไฮเดรต

นำโครมาโทกราฟีแผ่นบางลงไปแช่ใน 0.2 Mโซเดียม อะซิเตต ให้อิ่มตัว เพื่อช่วยในการปรากฏตำแหน่งของน้ำตาลให้มีความชัดเจนและรวดเร็ว

2. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำสารละลายของโพลิเมอร์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาย่อยด้วย TFA (trifluoroacetic acid) 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำผสมไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยที่สมบูรณ์

3. การเตรียมน้ำตาลมาตรฐาน

นำน้ำตาลแต่ละชนิดที่ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบมา 10 มิลลิกรัมละลายลงในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรจะได้สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

หยดตัวอย่างและสารละลายน้ำตาลที่เตรียมไว้ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร ลงบนโครมาโทกราฟีแผ่นบางที่เตรียมไว้ นำโครมาโทกราฟีแผ่นบางจุ่มลงไปในตัวทำละลายเคลื่อนที่ซึ่งประกอบไปด้วย ไอโซบิวทานอล เมทานอล และน้ำ ในอัตราส่วน 5: 3: 1(n-butanol- methanol-water; 5: 3: 1) หลังจากนั้นทำการตรวจหาสารบนโครมาโทกราฟีแผ่นบางโดยพ่นด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นผสมกับเมทานอล (Cont. sulfuric acid: methanol; 3: 1) และนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส จะปรากฏตำแหน่งของน้ำตาลและตัวอย่างบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

3. การเทียบเคียงเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. การทดสอบแคตาเลส (Catalase test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3
2. กระจกสไลด์
3. ห่วงเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนสไลด์
3. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อลงไปแล้วทำการผสมให้เข้ากัน

การวิเคราะห์

ผลบวก เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ ไม่มีฟอง

2. การทดสอบการออกซิไดซ์และการหมัก (Oxidation-Fermentation test)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อาหาร Hugh and Leifson’s O-F medium
2. พาราฟิน
3. หลอดดักแก๊ส

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อในอาหาร Hugh and Leifson’s O-F medium ชนิดละ 2 หลอดโดยการแทงตรงลงไปในอาหาร
2. หลอดหนึ่งให้อยู่ในสภาพขาดอากาศโดยเทพาราฟินเหลวปิดผิวหน้าประมาณ 2 เซนติเมตร
3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 48 ชั่วโมง
4. ดูการเปรียบเทียบสีของอาหารและการเกิดแก๊ส

การวิเคราะห์

อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟิน แสดงว่าเกิด oxidation แต่ถ้าเกิดเปลี่ยนสีทั้งสองหลอด แสดงว่าเป็น fermentation

สูตรอาหารที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ

อาหารทุกสูตรใช้ผสมน้ำทะเล 1 ลิตร

1. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

2. Motility test medium

Tryptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม

3. Hugh and Leifson's O-F medium (pH 7.1)

Peptone	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Bromthymol blue 0.2%	15.0	กรัม

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

1. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3

H_2O_2	3.0	กรัม
H_2O	100	มิลลิลิตร

2. Bromthymol blue 1.6%

Bromthymol blue	1.6	กรัม
Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
การเจริญเติบโตของเชื้อและอาหารที่ใช้เลี้ยง

1. การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ CNBP001 โดยการเกลี่ยเชื้อ (spread plate)

ตารางที่ 28 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดชีวิตอยู่ด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆของเชื้อ CNBP001ก่อนการหาสภาวะที่เหมาะสม

Table 28. The number of survival bacterium CNBP001 by spread plate before optimization condition.

	Number of colonies (CFU/ml)		
hours	1	2	average
0	2.00×10^{6}	7.80×10^{6}	4.90×10^{6} ± 4.1012
3	2.00×10^{8}	2.50×10^{7}	1.12×10^{8} ± 0.3536
6	3.20×10^{5}	1.33×10^{6}	8.25×10^{5} ± 1.3223
9	4.10×10^{6}	1.50×10^{6}	2.80×10^{6} ± 1.8385
12	1.00×10^{5}	6.40×10^{6}	6.50×10^{6} ± 3.8184
15	5.70×10^{5}	5.20×10^{5}	5.45×10^{5} ± 0.3536
21	3.90×10^{9}	1.11×10^{8}	4.01×10^{9} ± 1.9728
27	6.90×10^{9}	2.09×10^{9}	4.50×10^{9} ± 3.4012
33	4.10×10^{8}	8.60×10^{9}	9.01×10^{9} ± 3.1820
39	7.80×10^{9}	1.29×10^{9}	4.55×10^{9} ± 4.6033
45	1.02×10^{9}	2.03×10^{10}	1.07×10^{10} ± 0.7142
51	2.68×10^{9}	4.50×10^{10}	2.38×10^{10} ± 1.2869
57	2.51×10^{10}	1.07×10^{9}	1.31×10^{10} ± 1.0182
63	1.30×10^{9}	5.30×10^{9}	3.30×10^{9} ± 2.8284
72	7.40×10^{9}	1.18×10^{9}	4.29×10^{9} ± 4.3982

ตารางที่ 29 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดชีวิตอยู่ด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆของเชื้อ CNBP001หลังการหาสภาวะที่เหมาะสม

Table 29. The number of survival bacterium CNBP001 by spread plate after optimization condition.

	Number of colonies (CFU/ml)		
hours	1	2	average
0	3.10×10^7	4.40×10^7	$3.75 \times 10^7 \pm 0.65$
3	4.60×10^7	5.60×10^7	$5.10 \times 10^7 \pm 0.50$
6	5.60×10^7	5.40×10^7	$5.50 \times 10^7 \pm 0.10$
12	1.04×10^8	9.90×10^7	$1.02 \times 10^8 \pm 0.03$
18	9.80×10^8	8.80×10^8	$9.30 \times 10^8 \pm 0.50$
24	1.91×10^9	-	$1.91 \times 10^9 \pm 0.00$
36	1.73×10^9	1.08×10^9	$1.41 \times 10^9 \pm 0.33$
48	1.67×10^9	1.28×10^9	$1.78 \times 10^9 \pm 0.20$
72	6.80×10^8	8.70×10^8	$7.75 \times 10^8 \pm 0.95$

ตารางที่ 30 องค์ประกอบอาหารสำหรับแยกเชื้อที่สร้างโพลิเมอร์ดูดซับตะกั่วจากทะเล

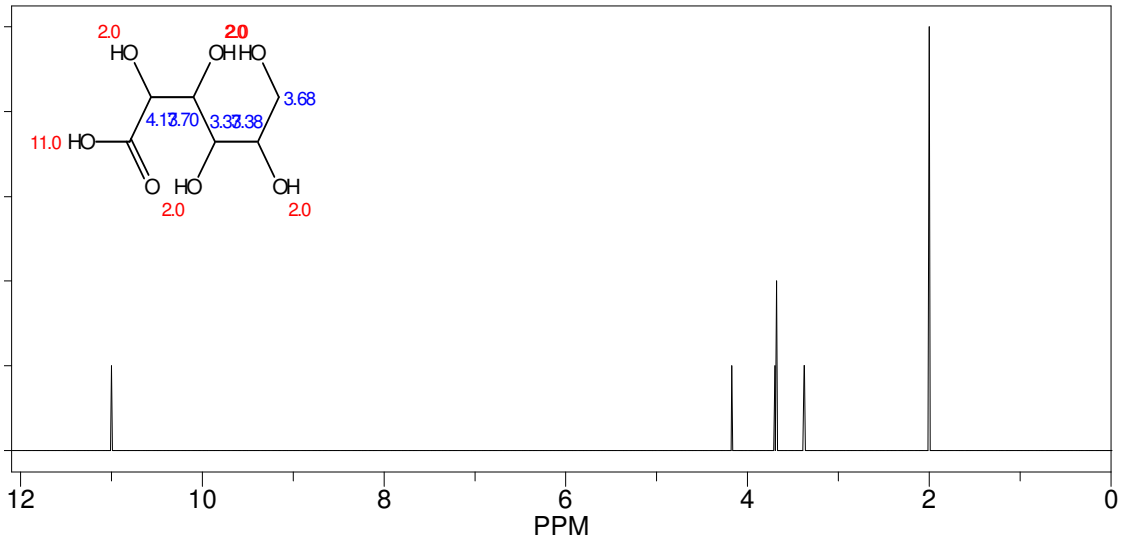
Table 30. Composition of lead-absorbing biopolymer marine bacteria isolating media.

Media	Composition		
Formula A	proteose – peptone	2	g
	yeast extract	1	g
	agar	15	g
	sea water	1	l
Formola B	proteose – peptone	2	g
	yeast extract	1	g
	Lead Nitrate ($Pb(NO_3)_2$)	125	mg/l
	agar	15	g
	sea water	1	l
Formula C	sucrose	20	g
	KH_2PO_4	1	g
	peptone	10	g
	$NaNO_3$	1	g
	$MgSO_4$	0.5	g
	sea water	1	l
Nutrient Agar (NA)	beef extract	3	g
	peptone	5	g
	agar	15	g
	sea water	1	l

หมายเหตุ สูตร A และ B ดัดแปลงจาก ดวงพร คันธโชติ และ พรศิลป์ ศิริพงศ์วุฒิกร (2529)
สูตร C ดัดแปลงจากอรไท สุขเจริญ (2545)

ภาคผนวก ค
สัญญาณ ^{1}H NMR ของน้ำตาลมาตรฐาน

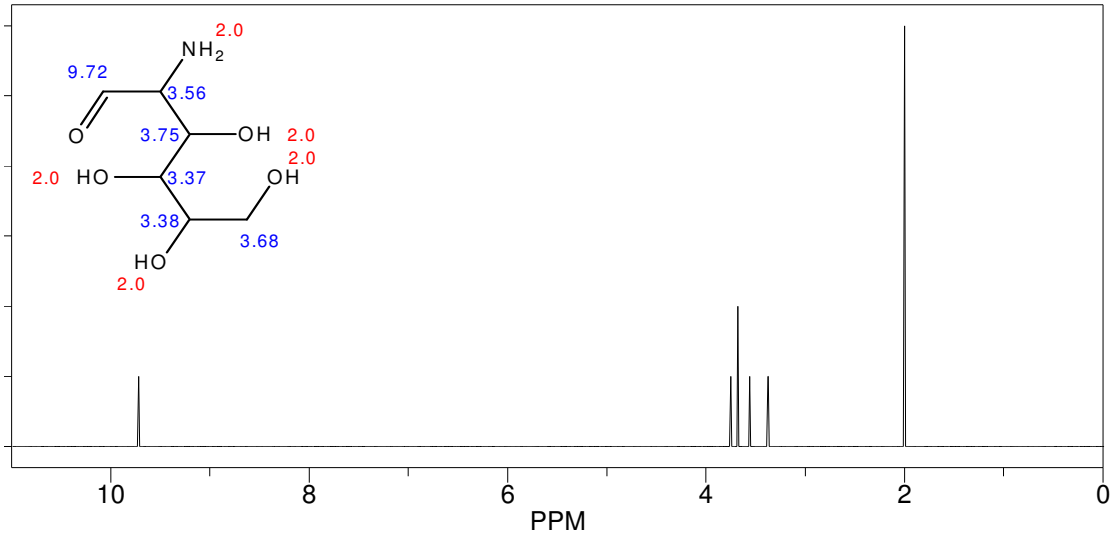
1. สัญญาณของ gluconic acid



รูปที่ 14 สัญญาณมาตรฐานของ gluconic acid

Figure 14. ^{1}H NMR spectrum of gluconic acid.

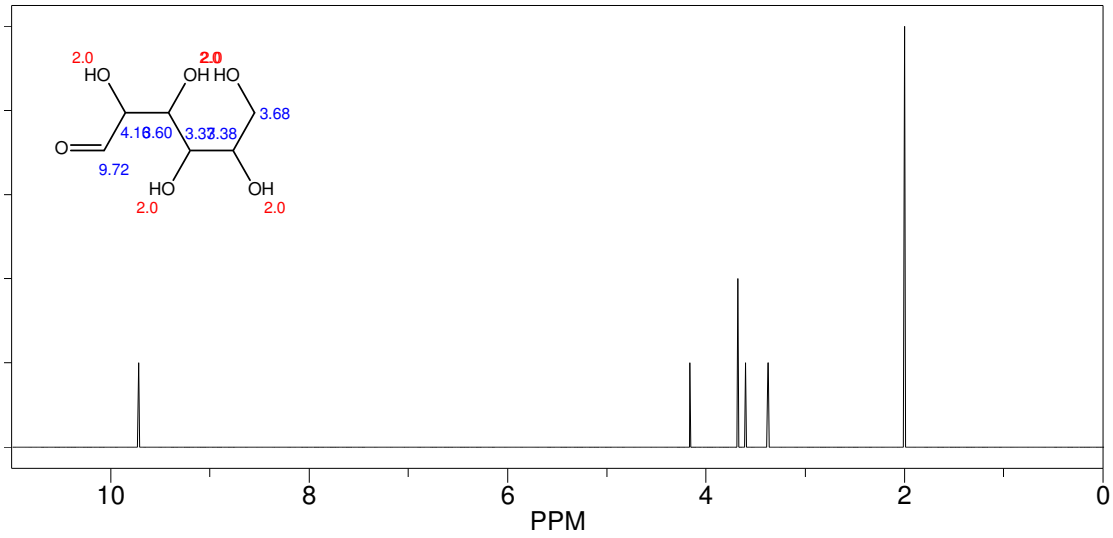
2. สัญญาณของ glucosamine



รูปที่ 15 สัญญาณมาตรฐานของ glucosamine

Figure 15. ^{1}H NMR spectrum of glucosamine.

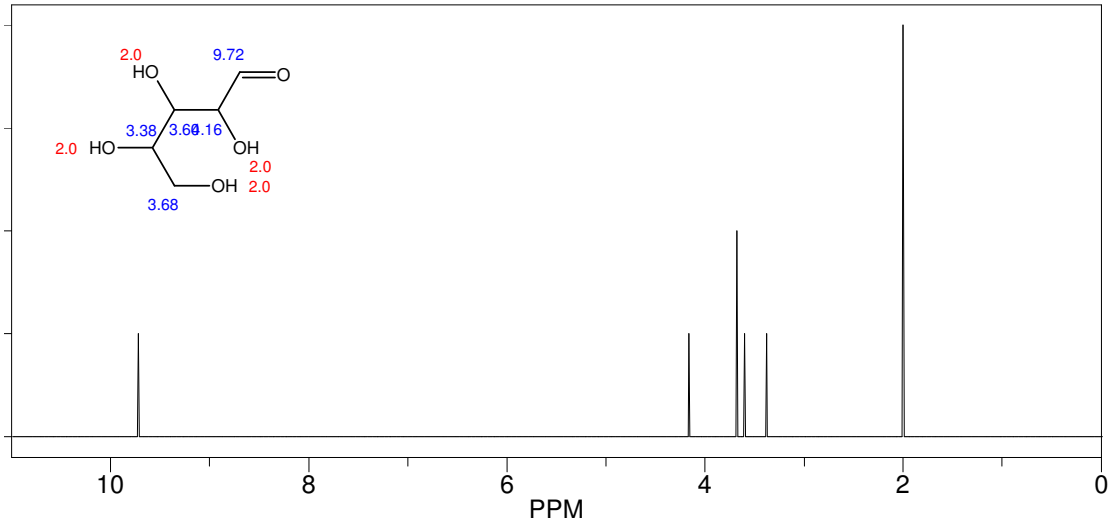
3. สัญญาณของ glucose



รูปที่ 16 สัญญาณมาตรฐานของ glucose

Figure 16. ^{1}H NMR spectrum of glucose.

4. สัญญาณของ xylose



รูปที่ 17 สัญญาณมาตรฐานของ xylose

Figure 17. ^{1}H NMR spectrum of xylose.