ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การบ่งชี้ผลผลิตและชนิดของเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ โดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษ (Paper Chromatography) (Chaplin, 1986 อ้างโดย จินตนา เพชรมณีโชติ, 2539)

1.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบ

นำตัวอย่างสารละลายที่ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้วแยกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งหยดบนกระดาษกรองโดยตรง ส่วนที่สองนำตัวอย่างสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแป้งร้อยละ 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิโมล ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การลงจุดสารตัวอย่างบนกระดาษกรองแต่ละครั้งใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้กระดาษกรองแห้ง แล้วลงสารตัวอย่างซ้ำจุดเดิมอีก 2 ครั้ง

1.2 การเตรียมกระดาษกรองสำหรับทดสอบ

ใช้กระดาษกรองสำหรับทำโครมาโทกราฟีกระดาษ (Chromatographic paper Whatman No.3) ขนาด 15x16 เซนติเมตร จุดตัวอย่างห่างจากขอบกระดาษกรองซ้าย–ขวา ด้านละ 2.5 เซนติเมตร ห่างจากขอบล่าง 2.5 เซนติเมตร สารที่ต้องการบ่งชี้ คือ ผลผลิตที่ได้จากการย่อยแป้ง สำหรับสารมาตรฐานซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบ ได้แก่ สารละลายแป้งร้อยละ 1 , β-cyclodextrin, กลูโคส, ฟรุคโทส, และมอลโทส แต่ละสารละลายมีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3 การเตรียมตัวทำละลายในการชะสาร

ตัวทำละลาย คือ เอ็น-บิวทานอล (n-butanol) : ไพริดีน (pyridine) : น้ำ ผสมกันในอัตราส่วนของปริมาตรเท่ากับ 6 : 4 : 3 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในถังโครมาโทกราฟี ใส่กระดาษกรอง (Whatman No.1) ภายในถังโครมาโทกราฟี ปิดฝาให้สนิท ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่จากด้านล่างของถังขึ้นข้างบน ทิ้งไว้จนกระทั่งแนวของตัวทำละลายขึ้นถึงข้างบนห่างจากขอบบนของกระดาษกรองประมาณ 2.5 เซนติเมตร เปิดฝา คีบกระดาษกรองออกจากตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้แห้งสนิทก่อนนำไปย้อมสี

1.4 การย้อมสีตัวอย่างสารละลาย

การย้อมสีตัวอย่างสารละลายบนกระดาษโครมาโทกราฟี โดยจุ่มกระดาษกรองที่ได้จากข้อ 1.4 ลงในสารละลาย A (สารละลายอิ่มตัวของซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) ปริมาตร 0.1

มิลลิลิตร ในตัวทำละลายอะซีโตน (acetone) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร) ยกกระดาษกรองขึ้นแล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งสนิท จากนั้นพ่นกระดาษกรองด้วยสารละลาย B โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 กรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยเมทธานอล (methanol)) สีจะปรากฏบนกระดาษกรอง วัดค่า R_f ของสารมาตรฐาน เปรียบกับค่า R_f ของตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์

ค่า R_f หมายถึง ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น

2. การหาปริมาณไซโคลเด็กซ์ตริน

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- ฟีนอฟทาลีน (phenolthalein)
- โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$)
- เบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน (β-cyclodextrin)

วิธีเตรียมสารเคมี

ก. เตรียมสารละลายฟีนอฟทาลีนร้อยละ 0.02 ใน 0.005 M โซเดียมคาร์บอเนต (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ข. เตรียมสารละลาย 0.03 M โซเดียมไฮดรอกไซด์

วิธีการวิเคราะห์

2.1 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของเบต้าไซโคลเด็กซ์ตริน

ก. เตรียมสารละลายเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินให้มีความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. ปิเปตสารละลายในข้อ ก. มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (blankใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)

ค. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

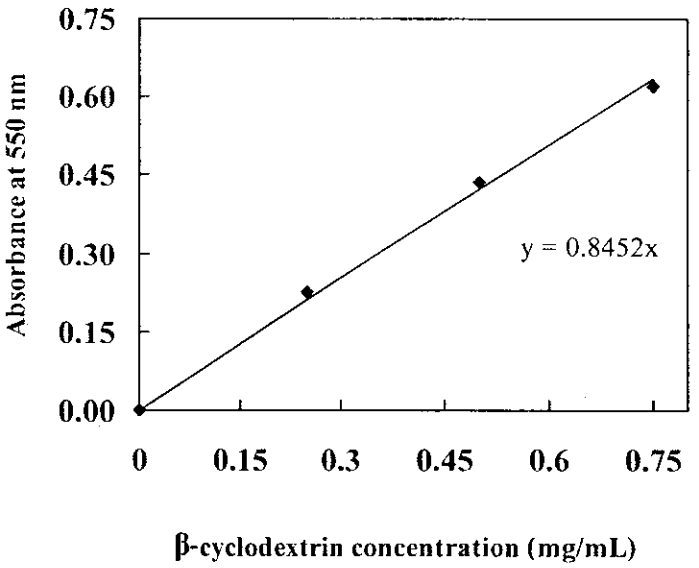
ง. เติมสารละลายฟีนอฟทาลีนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

จ. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ฉ. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.2 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ปั่นแยกแป้งออกแล้วเจือจางให้เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินเช่นเดียวกับข้อ 2.1



ภาพที่ 25 กราฟมาตรฐานปริมาณเบต้าไซโคลเด็กซ์ตรินและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

Figure 25 Standard curve β-cyclodextrin at 550 nm

3. การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ (Total cell protein) โดยใช้ Folin – Ciocalteau reagent (Lowry, 1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)
- โฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ (Folin – Ciocalteau reagent)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)

วิธีเตรียมสารเคมี

ก. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

ข. เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตร้อยละ 1

ค. เตรียมสารละลาย alkali copper โดยผสมสารละลายในข้อ ก. 50 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ ข. 1 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้)

ง. เตรียมสารละลาย Folin – Ciocalteau reagent โดยเจือจางโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์กับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 (เตรียมก่อนใช้)

วิธีการวิเคราะห์

3.1 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

ก. เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin ให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อลิตร

ข. ปิเปตสารละลายในข้อ ก. มาความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (blankใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร แทน)

ค. เติมสารละลาย alkali copper ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

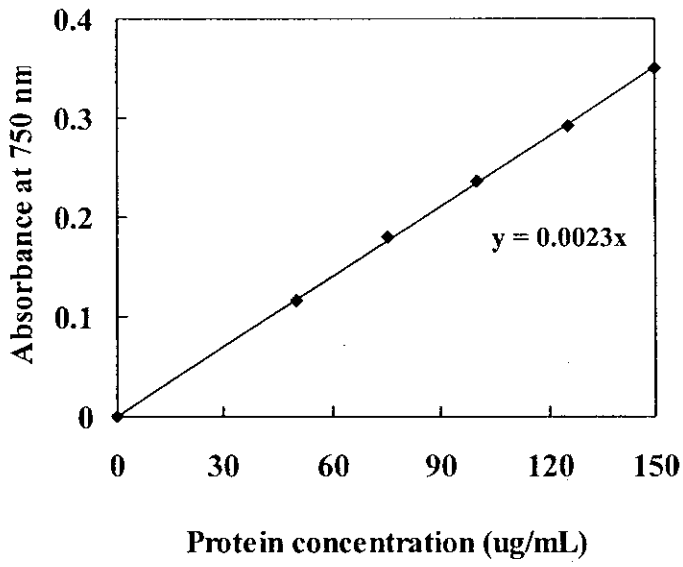
ง. เติมสารละลาย Folin – Ciocalteau reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

จ. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ฉ. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณโปรตีน และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.2 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 3.1



ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

Figure 26 Standard curve protein at 750 nm

3. การหาอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะ

อัตราการเจริญจำเพาะ

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

$$\int \frac{dx}{x} = \int \mu dt$$

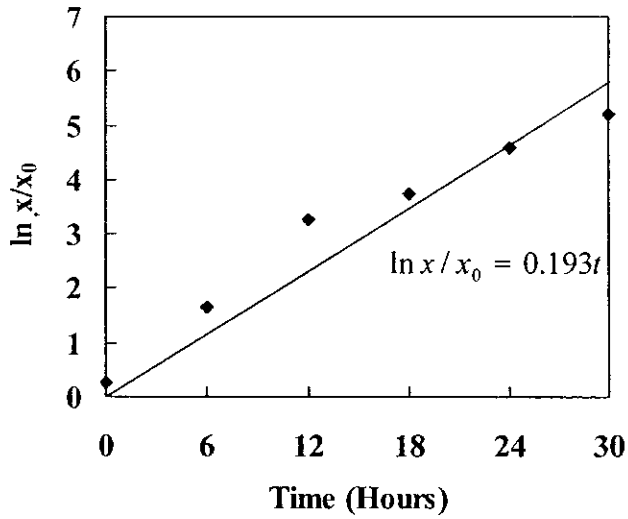
$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu \Delta t$$

μ คือ specific growth rate (h^{-1})

x คือ total cell protein (mg/mL)

x_0 คือ initial total cell protein (mg/mL)

t คือ time (h)



ภาพที่ 27 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

Figure 27 Specific growth rate of *Bacillus* sp. C26 under optimum condition

อัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะ

$$dP = \rho x dt$$

$$\int dP = \rho \int x dt$$

$$P - P_0 = \rho \int x dt$$

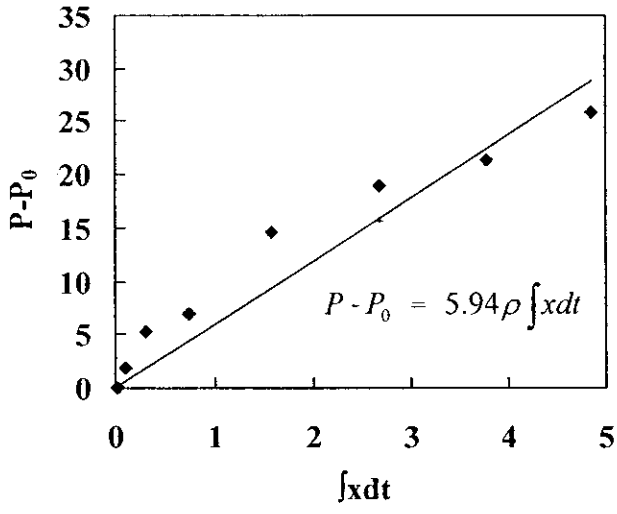
ρ คือ specific production rate (U/mg-protein/h)

P คือ the final product (U/mL)

P_0 คือ the initial product (U/mL)

x คือ total cell protein (mg/mL)

t คือ time (h)



ภาพที่ 28 อัตราการผลิตจำเพาะของเชื้อ *Bacillus* sp. C26 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

Figure 28 Specific production rate of *Bacillus* sp. C26 under optimum condition