ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. อาหารที่ใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.1 Blood agar

เตรียม Nutrient agar (NA) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สำหรับการเติมเลือดนั้นให้เติมหลังจากการฆ่าเชื้ออาหารแล้ว โดยปล่อยให้อาหารเย็นลงอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วค่อย ๆ เติมเลือดลงไป 5 % จากนั้นเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ

2. อาหาร Mueller-Hinton-Broth (MHB)

เตรียม Mueller-Hinton-Broth (MHB) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Meat	2	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์

3.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

3.1.1 การวิเคราะห์หมู่อัลฟาอะมิโน โดยปฏิกิริยา Ninhydrin (Plummer, 1978 อ้างโดย Dermlim, 1999)

วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาหมู่อัลฟาอะมิโน

สารเคมี

1. สารละลายพอลิเมอร์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายกรดอะมิโนมาตราฐานของลิวซีน (Leucine) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สารละลาย ninhydrin : ละลาย ninhydrin 0.04 กรัม ใน absolute ethanol 20 มิลลิลิตร (เก็บให้พ้นแสง)

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายของกรดอะมิโนมาตราฐาน / สารละลายพอลิเมอร์ / น้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย ninhydrin ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน
3. ต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที
4. สังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลาย ถ้าหากมีองค์ประกอบของหมู่อัลฟาอะมิโนสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน

การแปลผล

ผลบวก (ninhydrin posistive) : สารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงหลังจากการต้มในน้ำเดือด

3.1.2 **การวิเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก** โดยปฏิกิริยา Xanthoproteic (Plummer, 1978 อ้างโดย Dermlim, 1999)

วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก

สารเคมี

1. สารละลายพอลิเมอร์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายกรดอะมิโนมาตราฐานของทริปโตแฟน (tryptophan) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. กรดไนตริกเข้มข้น (HNO_3)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 3 โมลาร์

วิธีการวิเคราะห์

1. เติมสารละลายของกรดอะมิโนมาตราฐาน / สารละลายพอลิเมอร์ / น้ำ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
2. เติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปอุ่นในน้ำเดือด

3. ทำให้เย็นและสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีในสารละลายกรด
4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และสังเกตการเปลี่ยนสีในสารละลายด่าง

การแปลผล

ผลบวก (xanthoproteic posistive) : สีเหลือง (ในสภาวะที่เป็นกรด) และเปลี่ยนเป็นสีส้ม (ในสภาวะที่เป็นด่าง)

3.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลาง โดยปฏิกิริยา Anthrone reaction (Trelyan and Harrison, 1952 อ้างโดย Chaplin and Kennedy, 1986)

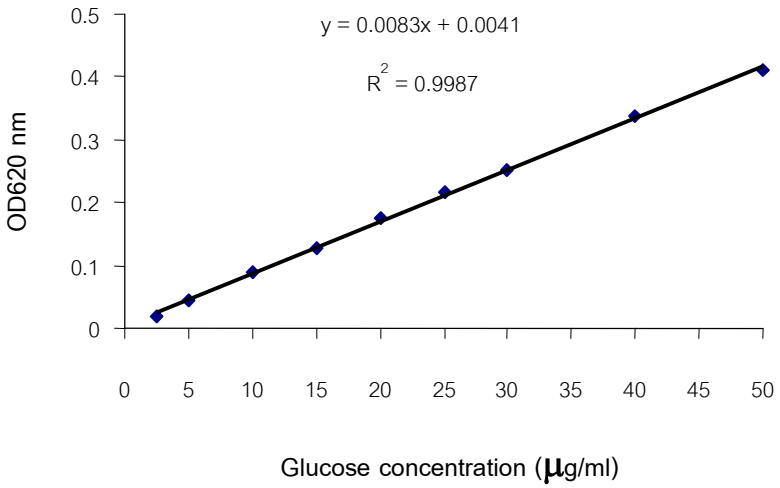
วัตถุประสงค์ เพื่อหาปริมาณน้ำตาลที่เป็นกลาง

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 75% ปริมาตร/ปริมาตร
2. Anthrone reagent : เตรียมโดยการเติมแอนโทรน 200 มิลลิกรัมในเอทานอล 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยการเติมกรดซัลฟิวริก (75% v/v) ให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนละลาย (รีเอเจนต์นี้ควรเตรียมก่อนใช้)
3. สารละลายกลูโคสมาตราฐาน ความเข้มข้น 2.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. เติมสารละลายกลูโคสมาตราฐาน / สารละลายพอลิเมอร์ / น้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง
2. นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง รอจนสารละลายเย็นลง
3. เติม Anthrone reagent ที่แช่เย็นไว้ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน (ขณะเติมและเขย่าต้องให้หลอดทดลองอยู่ในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา)
4. แช่ไว้ในอ่างน้ำแข็งจนทุกหลอดเย็นลงจนถึงประมาณ 0 องศาเซลเซียส
5. นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของกลูโคส



ภาพภาคผนวกที่ ก1 กราฟมาตราฐานกลูโคส (OD620 nm)

Figure-Appendix A1 Standard curve of glucose (OD620 nm)

3.2.2 **การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด** โดยปฏิกิริยา Phenol-sulfuric method (Dobois *et al*., 1956)

วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

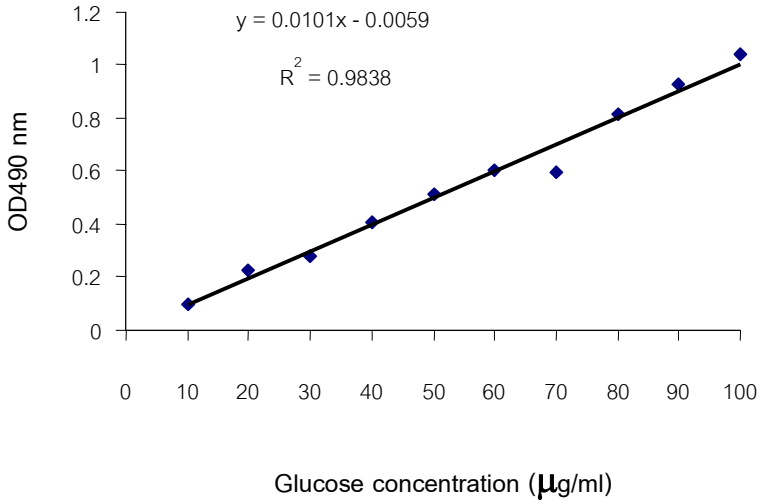
สารเคมี

1. สารละลายฟีนอล : ละลายฟีนอลในน้ำ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร)
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)
3. สารละลายพอลิเมอร์ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารละลายกลูโคสมาตราฐาน ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ผสมสารละลายพอลิเมอร์ / สารละลายกลูโคสมาตราฐาน / น้ำ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และสารละลายฟีนอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้กรดสัมผัสกับบริเวณด้านข้างหลอดทดลอง
3. ปล่อยทิ้งไว้นาน 10 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากันอย่างแรง

4. ปล่อยทิ้งไว้นาน 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของกลูโคส
5. เตรียมกราฟมาตราฐานปริมาณกลูโคส ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีการเดียวกันกับข้างต้น



ภาพภาคผนวกที่ ก2 กราฟมาตราฐานกลูโคส (OD490 nm)

Figure-Appendix A2 Standard curve of glucose (OD490 nm)

3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดยูโรนิค โดยวิธี Carbozole assay (Bitter and Muir, 1962 อ้างโดย Chaplin and Kennedy, 1986)

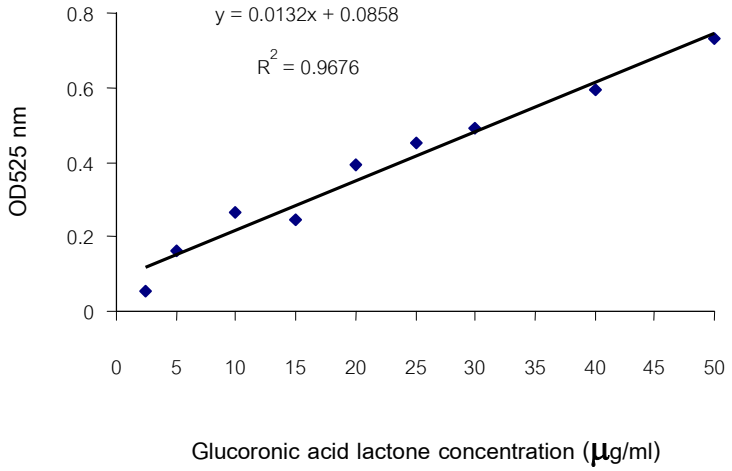
วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลยูโรนิค

สารเคมี

1. Reagent A : ผสม sodium tetraborate decahydrate 0.95 กรัม, น้ำ 2 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริก 98 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและแช่ในอ่างน้ำแข็ง
2. Reagent B : ผสม carbazole 125 มิลลิกรัม และabsolute ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตรให้เข้ากัน
3. สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารละลายมาตราฐาน glucuronic acid lactone ความเข้มข้น 2.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. สารละลายพอลิเมอร์ / สารละลายมาตราฐาน glucuronic acid lactone / น้ำ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร
2. เติม reagent A ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและแช่เย็นทันที
3. ต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. นำไปแช่เย็นทันที
5. เติม reagent B ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. ต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
6. ปล่อยให้เย็นลง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวกที่ ก3 กราฟมาตราฐาน Glucuronic acid lactone (OD525 nm)

Figure-Appendix A3 Standard curve of glucuronic acid lactone (OD525 nm)

3.2.4 **การวิเคราะห์หาปริมาณเอสเทอร์ซัลเฟต** โดยวิธี Turbidimetrically (Dodgson and Price, 1962)

วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเอสเทอร์ซัลเฟต

สารเคมี

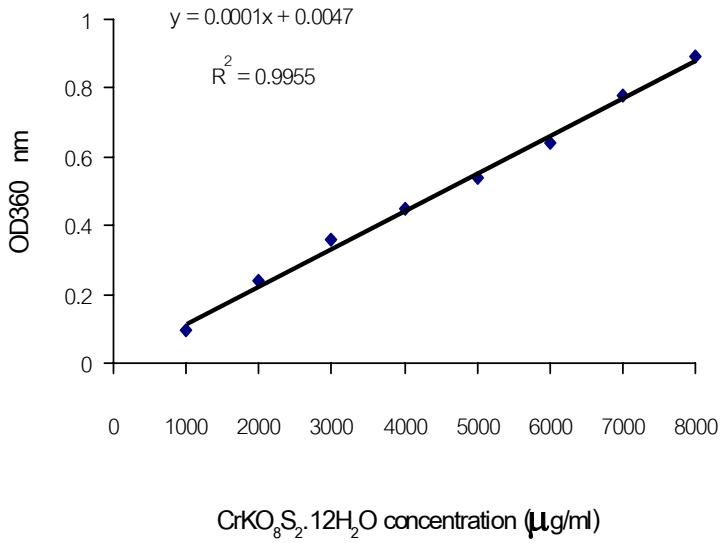
1. Barium chloride-gelatin reagent : เตรียมโดยละลายเจลลาติน 2 กรัมในน้ำเดือด อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียสปริมาตร 400 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม $BaCl_2$ 2 กรัม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

2. Trichloroacetic acid ความเข้มข้น 3 % w/v
3. สารละลายมาตราฐาน Potassium chromium (III) sulfate dodecahydrate ความเข้มข้น 1000-5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ย่อยพอลิเมอร์ 2-4 มิลลิกรัมด้วยกรด HCl ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง
2. ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าก่อนเปิดฝา
3. เติม 3 % trichloroacetic acid ปริมาตร 3.8 มิลลิลิตร
4. เขย่าให้เข้ากัน และเติม barium chloride-gelatin reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15-20 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของ Potassium chromium (III) sulfate dodecahydrate



ภาพภาคผนวกที่ ก4 กราฟมาตราฐาน Potassium chromium (III) sulfate dodecahydrate (OD360 nm)

Figure-Appendix A4 Standard curve of Potassium chromium (III) sulfate dodecahydrate (OD360 nm)

3.2.5 **การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้** โดยปฏิกิริยา Lowry (Lowry *et al*., 1951)

วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

สารเคมี

A = สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล

B = สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ร้อยละ 0.5

C = สารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทตร้อยละ 1

D = สารผสมระหว่าง A:B:C ในอัตราส่วน 98:1:1

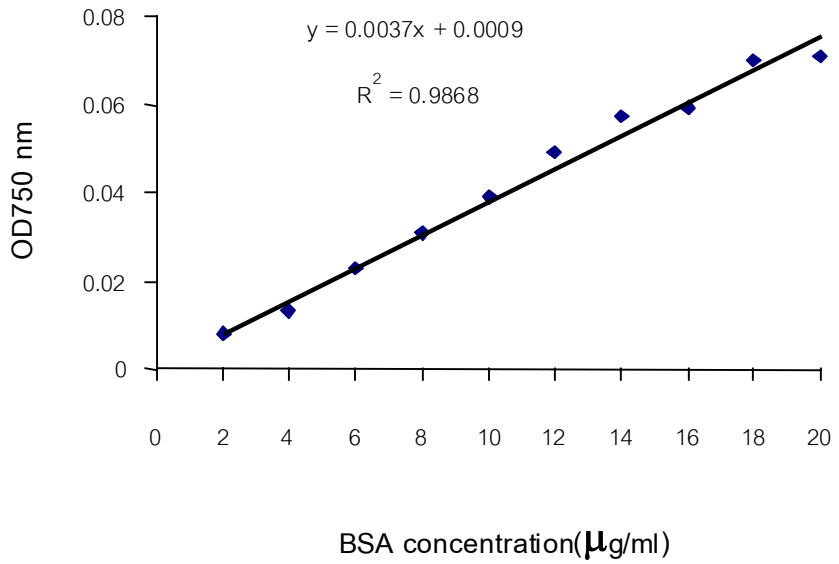
E = สารผสมระหว่าง Folin-ciocateau reagent และน้ำในอัตราส่วน 1:1 (ผสมก่อนใช้)

วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.2 มิลลิลิตร เติมสารผสม D 2.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารผสม E 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของ BSA

การเตรียมกราฟมาตราฐาน

1. ชั่งสาร BSA 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือ สารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution
2. เจือจางสารละลาย BSA ให้อยู่ในช่วง 2-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. นำไปหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951)
4. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวกที่ ก5 กราฟมาตราฐาน BSA (OD750 nm)

Figure-Appendix A5 Standard curve of BSA (OD750 nm)

3.2.6 **การวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุหลัก** ด้วยเครื่อง CHNS-O Analyzer

วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์

สารเคมี

1. ตัวอย่างสารชีวภาพที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 2-3 มิลลิกรัม
2. กรดอะมิโนเมไธโอนีน เป็นสารมาตราฐาน

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างน้ำหนัก 2-3 มิลลิกรัม บรรจุในถ้วยดีบุก (tin cup) ชั่งน้ำหนักของสารตัวอย่างอีกครั้ง
2. นำไปเผาในเตาเผา ซึ่งภายในมีขดลวดให้ความร้อนและมีก๊าซออกซิเจน (99.999 %) ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาการเผาไหม้ อุณหภูมิที่ใช้ในการเผาไหม้สำหรับการหาปริมาณคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ (CHNS-mode) คือ 900 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเผาไหม้เพื่อการหาปริมาณออกซิเจน (O_2-mode) คือ 1,060 องศาเซลเซียส
3. ก๊าซที่เกิดขึ้นจะถูกแยกโดยคอลัมน์ (Muti-seperator column) ก่อนผ่านเข้าสู่เครื่องดีเทคเตอร์
4. สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกส่งต่อไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อการประมวลผล

3.2.7 **การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์** โดยเครื่อง Gel Permeation Chromatography : (GPC)

วัตถุประสงค์ เพื่อหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารชีวภาพ

สารเคมี

1. ตัวอย่างสารชีวภาพ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์
2. น้ำที่ผ่านการกำจัดอิออน (deionized water)
3. พอลูแลนเป็นสารมาตราฐาน

วิธีการ

1. ตัวอย่างสารชีวภาพความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ กรองสารละลายสารชีวภาพโดยใช้กระดาษกรอง (Millpore Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
2. ฉีดสารละลายสารชีวภาพที่ผ่านการกรองแล้วเข้าเครื่อง GPC (PL-GPC 110, Polymerlab) สภาวะของเครื่องที่ใช้ในการทดลอง คือ ใช้อัตราในการเคลื่อนที่ของสาร

(flow rate) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้น้ำที่ผ่านการกำจัดอิออน (deionized water) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยฉีดสารละลายสารชีวภาพปริมาตร 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3. นำช่วงเวลาที่สารเคลื่อนที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของพอลูแลน