ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 0.02 M Tris-HCl Buffer, pH 7.3 ปริมาตร 1 ลิตร

1.1 วิธีการเตรียมสาร

ชั่ง Tris 2.42 กรัม* ละลายลงใน HCl 1.515 มิลลิลิตร* คนให้เข้ากันแล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.3 ด้วย NaOH

* สูตรคำนวณหาปริมาณปริมาตร HCl ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 M Tris-HCl Buffer, pH 7.3 ปริมาตร 1 ลิตร สามารถเตรียมได้จาก

pH	=	pK + log ([Tris]/[Tris-H])
7.3	=	8.3 + log ([Tris]/[Tris-H])
-1	=	log log ([Tris]/[Tris-H])
1	=	log ([Tris]/[Tris-H])
10	=	log ([Tris]/[Tris-H])
[Tris-H]	=	(10)/(10+1)
	=	0.909

เพราะฉะนั้นที่ pH 7.3 พบว่า Tris-HCl เข้มข้น 1 moles ความเข้มข้นของ [Tris-H] เท่ากับ 0.909 moles

ดังนั้น ถ้าต้องการ Tris-HCl เข้มข้น 0.02 moles ความเข้มข้นของ [Tris-H] เท่ากับ

[Tris-H]	=	(0.02)(0.909)
	=	0.01818 moles

เพราะฉะนั้นปริมาณ HCl ที่ใช้เท่ากับ 0.01818 moles

จาก [Tris-H] เข้มข้นเท่ากับ 0.909 หรือ 90.9 % เพราะฉะนั้น [Tris] เข้มข้นเท่ากับ 9.1 % ดังนั้น ถ้าต้องการ Tris-HCl เข้มข้น 0.02 moles ความเข้มข้นของ [Tris] เท่ากับ

[Tris] = 9.1 %

[Tris] = (0.02)(0.091)

= 1.82×10^{-3} moles

จากสมการเคมีของ Tris-HCl คือ

$$\text{Tris} + \text{HCl} \longrightarrow \text{Tris-H} + \text{Tris}$$

สามารถหาปริมาณของ Tris ที่ใช้ได้เท่ากับ

Tris (g) = (0.02 M)(1 L)(121 g)

= 2.42 g

ซึ่งจาก HCl เข้มข้น 12 moles จะใช้ปริมาณสารเท่ากับ

12 M HCl

HCl (ml) = (0.01818 moles) / (12 moles/L)

= 1.515×10^{-3} L

= 1.515 ml

เพราะฉะนั้นต้องชั่ง Tris 2.42 กรัม

ปิเปต HCl 1.515 มิลลิลิตร

2. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salt medium (MSM) (Bodour, Drees and Maier, 2003)

ประกอบด้วยสารละลาย A ปริมาตร 1 ลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สารละลาย A ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

1. $NaNO_3$	2.5	กรัม
2. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4	กรัม
3. NaCl	1.0	กรัม

4. KCl	1.0	กรัม
5. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.05	กรัม
6. Phosphoric acid (85 %)	10	มิลลิลิตร
7. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	1	ลิตร

8. ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วย KOH

สารละลาย B ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

1. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
2. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5	กรัม
3. $MnSO_4 \cdot H_2O$	1.5	กรัม
4. Boric acid	0.3	กรัม
5. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.15	กรัม
6. $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.1	กรัม

7. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

วิธีการเตรียม

นำสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย A ปริมาตร 900 มิลลิลิตร บรรจุลงในถังหมัก นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำแหล่งคาร์บอนปริมาณ 20 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นพร้อมกับปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.2 แล้วบรรจุลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีก่อนใช้งานให้เติมแหล่งคาร์บอนปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง

1. วิธีการทดสอบ Surface tension

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดแรงตึงผิว (Ring Tensiometor)
2. บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. Acetone
3. Toluene

วิธีการทดลอง

วิธีการเตรียมอุปกรณ์และภาชนะที่ใช้ในการทดลอง

1. เตรียมบีกเกอร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 45 มิลลิเมตร
2. ทำความสะอาดบีกเกอร์โดยการใช้ Toluene ล้าง 2-3 ครั้ง แล้วตามด้วย Methyl ethyl ketone และน้ำกลั่น ตามลำดับ
3. นำบีกเกอร์ไปแช่ในสารละลายอุ่นของ Chromic acid cleaning solution แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่น ตามลำดับ
4. คว่ำบีกเกอร์บนผ้าสะอาดจนแห้งก่อนนำไปใช้

วิธีการเตรียม platinum-iridium ring

1. นำ platinum-iridium ring ไปจุ่มลงใน Toluene เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนจำพวก Hydrocarbons
2. นำ platinum-iridium ring ไปจุ่มใน Acetone (เพื่อล้าง Toluene) ปล่อยให้ Acetone ระเหยออกไปแล้วเผาขดลวดอย่างรวดเร็วด้วยไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการวัดแรงตึงผิว

1. นำ platinum-iridium ring ที่ทำความสะอาดแล้วไปแขวนไว้ที่ปลายของ Lever arm ในตอนนี้เครื่องมือจะต้องจัดให้อยู่ในตำแหน่งที่จับ Lever arm

2. เทสารที่ต้องการวัดแรงตึงผิวลงในบีกเกอร์ แล้ววางบนที่วางตัวอย่างภายในเครื่อง

3. เลื่อนที่วางตัวอย่างจนกว่าจะได้ตำแหน่งที่อยู่ใต้ platinum-iridium ring พอดี

4. หมุนปุ่มค่อยๆ ยกตัวอย่างขึ้นจนกระทั่งวงแหวนอยู่ใต้ตัวอย่าง เพื่อให้ทุกส่วนของวงแหวนเปียกทั้งหมด (โดยทั่วไปควรอยู่ใต้ตัวอย่างประมาณ ½ เซนติเมตร

5. ทำการปล่อย torsion arm แล้วปรับเครื่องมือให้อ่านค่าที่ศูนย์

6. ปรับปุ่มที่อยู่ทางขวาของเครื่องวัดแรงตึงผิวจนกระทั่ง index และ its image อยู่บนเส้นเดียวกับตำแหน่งอ้างอิงบนกระจก ระวังอย่าให้วงแหวนหลุดออกจากตัวอย่างในระหว่างนี้

7. เลื่อนที่วางตัวอย่างขึ้นหรือลง จนกระทั่ง vernier บนสเกลที่อยู่รอบนอกของ dial อ่านได้ค่าเท่ากับศูนย์

8. ค่อยๆ เลื่อนที่วางตัวอย่างจนกระทั่งวงแหวนอยู่ในผิวหน้าของตัวอย่างพอดี ในขณะเดียวกันปรับปุ่มที่อยู่ทางขวาของเครื่องวัดแรงตึงผิวเพื่อที่จะให้ index อยู่บนเส้นเดียวกันกับตำแหน่งอ้างอิงบนกระจก ให้ทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนกว่าฟิล์มของตัวอย่างจะแตกขาด ซึ่งค่าที่อ่านได้บนสเกลในตอนที่ฟิล์มขาดพอดี คือแรงตึงผิว

9. ต้องทำการวัดค่าแรงตึงผิวอย่างน้อย 3 ครั้ง จนกว่าค่าที่ได้จะใกล้ เคียงกัน

2. **การวัดปริมาณ** Reducing sugar

2.1 การเตรียม standard curve

2.1.1 การเตรียม standard curve ทำโดยการเตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0 ,2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 กรัมต่อลิตร

2.1.2 เติม DNS reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากัน

2.1.3 นำหลอดทั้งหมดไปตั้งไว้ใน boiling bath เป็น 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงโดยย้ายมาตั้งไว้ใน ice bath

2.1.4 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

2.1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.1.6 นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสต่อปริมาณกลูโคส

2.2 การวัดปริมาณ Reducing sugar

2.2.1 ทำการปิเปต fermentation broth และน้ำกลั่นเติมลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติม DNS reagent ลงไปในหลอด 1 มิลลิลิตร (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)

2.2.2 นำหลอดทั้งหมดไปตั้งไว้ใน boiling bath 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงโดยย้ายมาตั้งไว้ใน ice bath

2.2.3 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด

2.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่เป็นน้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ

2.2.5 นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟของปริมาณ Reducing sugar

3. การคัดเลือกและพัฒนาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography

การคัดเลือกและพัฒนาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ทำโดยการทดสอบด้วยการใช้ตัวทำละลายที่มีค่าความแรงต่างๆ กันเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ Methanol, Acetone, Chloroform, Toluene และ Hexane โดยการทดสอบทำการจุดสารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC เป็นแถบขนาดสั้นๆ ไม่เกิน 4 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำแต่ละแผ่นไปจุ่มในแทงค์ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ ดูผลการแยกที่ได้ ตัวทำละลายเดี่ยวชนิดใดที่ทำให้สารเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC มีค่า R_f อยู่ในช่วงระหว่าง 0.2 ถึง 0.8 จัดว่ามีความแรงพอเหมาะ

ขั้นต่อมาทำการทดลองโดยเลือกใช้ตัวทำละเดี่ยวชนิดที่ให้ผลการแยกองค์ประกอบออกจากกันได้ดี จากการศึกษาข้างต้นแต่ยังคงมีความแรงสูงหรือต่ำเกินไป นำมาผสมกันในอัตราส่วนที่ทำให้จุดของสารต่างๆ แยกออกจากกันอยู่ที่ค่า R_f ประมาณ 0.2 ถึง 0.8 (โดยเหตุที่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายมากกว่า 1 ชนิด เนื่องจากมักพบว่าการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ไม่เพียงพอต่อการแยกองค์ประกอบต่างๆ ออกจากกัน)

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)	:	**สารตัวกลางที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างผิวของของเหลวกับก๊าซ เป็นผลผลิตมา** จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ
สารก่ออิมัลชันชีวภาพ (Bioemulisfier)	:	สารตัวกลางที่มีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างผิวของของเหลวกับของแข็ง ระหว่างของเหลวกับของเหลว เป็นผลผลิตมาจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ
Surface tension	:	ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของน้ำกับอากาศ
Interfacial tension	:	ค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับไฮโดรคาร์บอน
มิลลินิวตันต่อตารางเมตร (mN/m)		
หรือ ไดน์ (dyne)	:	หน่วยที่ใช้วัดแรงตึงผิว
Critical micelle concentration (CMC)	:	ความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมกัน เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด
อิมัลชัน (Emulsification)	:	เป็นลักษณะการเชื่อมโยงของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ผสมกันด้วยสารตัวกลาง โดยอยู่ในรูปของสารแขวนลอย
De-emulsification	:	การทำให้ของเหลว 2 ชนิดที่เกิดอิมัลชัน เกิดการแยกชั้นออกจากกัน
Oil removal	:	การแยกน้ำมันออกมาจากสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน
Oil recovery	:	การคืนกลับของน้ำมัน เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่