ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร และวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงยีสต์

1. อาหารสูตร YM (ดัดแปลงจาก Lagos *et al.*, 2002)

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Palm oil	10.0	กรัม
Gum Arabic	10.0	กรัม
Rhodamine B	0.010	กรัม
Chloramphenicol		
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH 5.0		

เตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอชให้ได้ 5.0 ปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Homogenizer) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมด และเติมผงวุ้น 15 กรัม (1.5 เปอร์เซ็นต์) หลังจากปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Homogenizer) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Isolation medium for yeast (Koh *et al.*, 1983)

Palm oil	20.0	กรัม
NH_4NO_3	4.0	กรัม
KH_2PO_4	4.7	กรัม
$Na_2HPO_4.12\ H_2O$	0.3	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
$MnSO_4.4\ H_2O$	0.01	กรัม

Yeast extract	0.10	กรัม
Gum Arabic	10.0	กรัม
Chloramphenicol		
Rhodamine B	0.010	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH 5.0		

เตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอชให้ได้ 5.0 ปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Homogenizer) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมด และเติมผงวุ้น 15 กรัม (1.5 เปอร์เซ็นต์) หลังจากปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Homogenizer) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การนับเซลล์ด้วย Haemacytometer

นำตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หยดลงบน counting chamber แล้วปิดด้วย cover slip นับเซลล์ยีสต์ในช่องสี่เหลี่ยมทั้ง 25 ช่อง ที่กำลังขยาย 400 เท่า ในการคำนวณจะนำจำนวนช่องสี่เหลี่ยม 25 ช่อง หารด้วยจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้ทั้งหมด จะได้จำนวนเซลล์ยีสต์โดยเฉลี่ยต่อช่องซึ่งมีปริมาตร $0.2\times0.2\times0.1$ มิลลิเมตร จากนั้นจึงคำนวณปริมาณเซลล์ยีสต์ให้มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร

4. การเตรียมเซลล์ยีสต์ในการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชั่นและปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น

สมมุติว่าต้องการศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชั่น ที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม และเมทานอล 0.054 กรัม เป็นสับสเตรท อัตราส่วนโมล เท่ากับ 1:3 (โมล:โมล) โดยต้องการใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท และนับเซลล์ยีสต์ด้วย Haemacytometer ได้เท่ากับ 2.25×10^{8} ดังนั้น

น้ำหนักสับสเตรททั้งหมด = น้ำหนักน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ + น้ำหนักเมทานอล

= 0.5 กรัม + 0.054 กรัม

= 0.554 กรัม

ต้องการใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ดังนั้น

น้ำหนักสับสเตรท	1	กรัม	ใช้เซลล์ยีสต์	1×10^{10}	เซลล์
น้ำหนักสับสเตรท	0.554	กรัม	ใช้เซลล์ยีสต์	5.54×10^{9}	เซลล์

นับเซลล์ยีสต์ ได้เท่ากับ 2.25×10^{8} ดังนั้น

จำนวนเซลล์	2.25×10^{8} เซลล์	ในอาหาร	1	มิลลิลิตร
จำนวนเซลล์	5.54×10^{9} เซลล์	ในอาหาร	5.54×10^{9}	มิลลิลิตร
			2.25×10^{8}	

แสดงว่า จะต้องปิเปตอาหารมาเท่ากับ 24.6 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีและ การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ตามวิธีของ Kademi และคณะ (2000)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A : ละลาย *p*-nitrophenyl palmitate ($pPNC_{16}$) 0.302 กรัม ใน 2-Propanol (iso-propanol) ให้ได้ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

2. สารละลาย B : ละลาย Triton-X-100 0.4 กรัม และกัมอราบิค 0.1 กรัม ในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

นำสารละลายส่วนใสเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสับสเตรท (สารละลาย A) 0.9 มิลลิลิตร 1 ส่วนกับ 9 ส่วนของสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 (สารละลาย B) ผสมสารละลายที่ได้อย่างรวดเร็ว วัดอัตราการย่อยสลายของ *p*-nitrophenyl palmitate ที่ความยาวคลื่น 410 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ค่า Extinction coefficient ของ *p*-nitrophenol เท่ากับ 12442 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ที่ pH 7.5 โดยที่ 1 ยูนิต ของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยซับสเตรทให้ *p*-nitrophenol อิสระ 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

ใช้วิธี two-phase emulsion ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

2.1 สารผสมในปฏิกิริยา

สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอีน ที่ละลายในไอโซออกเทนความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1.0 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว หยุดเวลาโดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งให้แยกชั้น

2.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยใช้วิธี cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986) โดยดูดสารละลายส่วนบนจากที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 2.1 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent

ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งให้แยกชั้น นำสารละลายส่วนใสสีเขียวอ่อนส่วนบนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มมิติก

2.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปของกรดปาล์มมิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากตัวเซลล์

ใช้วิธี two-phase emulsion ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

3.1 สารผสมในปฏิกิริยา

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ยีสต์ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นเติมสารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทน ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว หยุดเวลาโดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งให้แยกชั้น

3.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยใช้วิธี cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986) โดยดูดสารละลายส่วนบนจากที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 3.1 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งให้แยกชั้น นำสารละลายส่วนใสสีเขียวอ่อนส่วนบนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มมิติก

3.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปของกรดปาล์มมิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

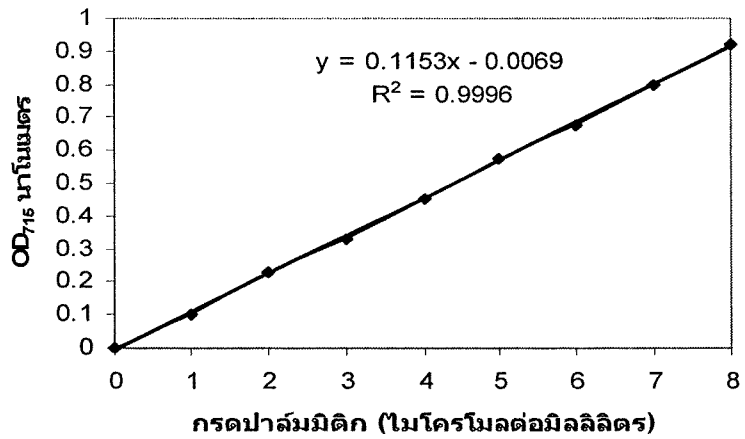
4. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. กรดปาล์มมิติก
2. ไอโซออกเทน
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0
4. สารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยชั่ง cupric acetate ($C_4H_6CuO_4.H_2O$) 50.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร กรองส่วนที่ไม่ละลายออก ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.1 ด้วยไพริดีน และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งกรดปาล์มมิติกที่มีความบริสุทธิ์สูงให้มีน้ำหนักแน่นอนตั้งแต่ 0-10 มิลลิกรัม ละลายในไอโซออกเทน ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการละลาย จะได้สารละลายกรดปาล์มมิติก 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
2. นำสารละลายกรดปาล์มมิติกที่เตรียมได้จากข้อ 1 ในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทนให้ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
3. เติมด้วยสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้แยกชั้น
3. ดูดสารละลายชั้นบนแล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็น blank
4. นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดปาล์มมิติก (ภาพที่ 41)



ภาพที่ 41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดปาล์มิติกมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (IUPAC, 1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายผสมอะซีติก-คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 3:2
2. สารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์
3. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล
4. น้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนตามตารางที่ 17 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

ตารางที่ 17 น้ำหนักตัวอย่างโดยประมาณที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์

Prediction of peroxide value (mg)	Weight (g)
0-12	5.0-2.0
12-20	2.0-1.2
20-30	1.2-0.8
30-50	0.8-0.5
50-90	0.5-0.3

2. เติมสารละลายอะซีติก-คลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลาย
3. เติมสารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกพร้อมเขย่าแล้วตั้งไว้ในที่มืดนาน 5 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
5. นำสารละลายที่ได้ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต พร้อมเขย่าอย่างแรงเมื่อได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 0.5 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทต่อจนกระทั่งสีน้ำเงินหมดไป
6. เตรียมและไตเตรทแบลงค์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำมัน
7. คำนวณค่าเปอร์ออกไซด์จากสูตร

$$\text{ค่าเปอร์ออกไซด์} = \frac{(A-B) \times N \times 1000}{W}$$

A = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

6. การวิเคราะห์ค่าไอโอดีนในไขมันและน้ำมัน (IUPAC, 1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายวิจส์ (Wijs solution) โดยการชั่งสารไอโอดีนคลอไรด์ (ICl) หนัก 16.5 กรัม ละลายใน glacial acetic acid และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร หรืออาจเตรียมโดยชั่งไอโอดีนไตรคลอไรด์ 9 กรัม ละลายในสารละลายผสมของกรดแอซิติก 700 มิลลิลิตร และคาร์บอนเตตราคลอไรด์ 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา ปิดผนึกให้แน่นด้วยพาราฟินจนกว่าจะนำมาใช้
2. สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ เข้มข้นร้อยละ 10
3. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยชั่งโซเดียมไทโอซัลเฟต 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดเบาๆ 5 นาที แล้วถ่ายลงในขวดเก็บสีชาขณะร้อน เก็บสารละลายในที่มืดและเย็น ทำการหาความเข้มข้นมาตรฐานโดยการอบสารโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอนใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด ขวดละ 0.1 กรัม (สำหรับความเข้มข้น 1 นอร์มอล) แต่ละขวดเติมน้ำกลั่นปราศจากคลอรีนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่มีโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม และเติมสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งในที่มืดทันที เป็นเวลา 10 นาที แล้วไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตข้างต้น โดยใช้น้ำแป้งเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอินดิเคเตอร์
4. คำนวณความเข้มข้นจากสูตร

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

$$= \frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมไดโครเมต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรท} \times 0.0490}$$

สมมูลของโพแทสเซียมไดโครเมต = 49.032

5. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) หรือไซโคลเฮกเซน
6. น้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนตามตารางที่ 18
2. เติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์หรือไซโคลเฮกเซน 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลาย
3. เติมสารละลายวิจส์ 25 มิลลิลิตร ด้วยปิเปตที่แห้งและสะอาด
4. เขย่าขวดอย่างรวดเร็ว ปิดจุกและเก็บไว้ในที่มืด 1-2 ชั่วโมง

ตารางที่ 18 น้ำหนักตัวอย่างโดยประมาณที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ค่าไอโอดีน

Prediction of iodine value	Weight (g)
< 5	3.00
5-20	1.00
21-50	0.40
51-100	0.20
101-150	0.13
151-200	0.10

5. เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ปริมาณ 20 มิลลิลิตร และน้ำต้มใหม่ที่เย็นแล้ว 150 มิลลิลิตร

6. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้งลงไป 2-3 หยด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแล้วไตเตรทต่อจนสีน้ำเงินหมดไป ก่อนปฏิกิริยาจะสิ้นสุดถึงจุดยุติให้ปิดขวดด้วยจุกยางเขย่าอย่างแรงเพื่อให้ไอโอดีนที่เหลืออยู่ในชั้นของคาร์บอนเตตราคลอไรด์ถูกดึงออกมาให้หมด

7. เตรียมแบลงค์ด้วยวิธีเดียวกัน

8. คำนวณค่าไอโอดีนจากสูตร

$$\text{ค่าไอโอดีน} = \frac{(A-B) \times N \times 12.69}{W}$$

A = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

หมายเหตุ ถ้าค่า B-A > B/2 ต้องทำการทดลองใหม่โดยใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยลง

7. การวิเคราะห์ค่ากรดและกรดไขมันอิสระ (IUPAC, 1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บสารละลายด่างในขวดแก้ว ก่อนนำมาใช้ทำการหาความเข้มข้นมาตรฐานที่แน่นอนโดยการนำ

โพแทสเซียมเอซิดพาทาเลท ($KHC_8H_4O_4$) ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 0.8 กรัม (สำหรับความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอเนต 25 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับสารละลายด่างข้างต้น โดยมีฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

3. คำนวณความเข้มข้นด่างจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นสารละลาย NaOH} = \frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมแอซิดพาทาเลต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้} \times 0.2042}$$

สมมูลของโพแทสเซียมแอซิดพาทาเลต = 204.216

4. ฟีนอฟทาลีน เข้มข้นร้อยละ 1

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-10 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกลาง โดยเติมฟีนอฟทาลีน 5 หยด และปรับให้เป็นกลางด้วยการหยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล พร้อมทั้งเขย่าจนได้สีชมพูอ่อนถาวร
3. เติมแอลกอฮอล์ที่เป็นกลางปริมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง เขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างละลายในแอลกอฮอล์ ถ้าละลายได้ไม่ดีให้อุ่นที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส
4. หยดฟีนอฟทาลีน 1-2 หยด และไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ขณะไตเตรทต้องเขย่าอย่างแรงจนกระทั่งได้สีชมพูคงที่นานประมาณ 1 นาที
5. คำนวณค่ากรดและปริมาณกรดไขมันอิสระจากสูตร

$$\text{ค่ากรด(มิลลิกรัม)} = \frac{\text{ปริมาณด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นด่าง(นอร์มอล)} \times 56.1}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

$$\text{กรดไขมันอิสระร้อยละในรูปกรดปาล์มมิติก} = \frac{\text{ปริมาณด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นด่าง(นอร์มอล)} \times 25.6}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

8. การวิเคราะห์ค่าสปอนิฟิเคชั่น (saponification value) (IUPAC, 1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายแอลกอฮอลิคโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มอล ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเตรียม

ไว้อย่างน้อย 5 วันก่อนทำการทดลอง

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

3 สารละลายฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-2 กรัม ใส่ในขวดกลั่นที่แห้งและสะอาด
2. เติมสารละลายแอลกอฮอลิคโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร แล้วเติมลูกแก้ว
3. จัดเครื่องกลั่นพร้อมเปิดน้ำหล่อชุดควบแน่น รีฟลักซ์สารละลายให้เดือดเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง
4. นำขวดสารละลายออกจากอุปกรณ์ควบแน่นของชุดกลั่น
5. เติมฟีนอฟทาลีน 5 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก
6. เตรียมและไตเตรทแบลงค์เช่นเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณค่าสปอนิฟิเคชั่นจากสูตร

$$\text{ค่าสปอนิฟิเคชั่น} = \frac{(B - A) \times N \times 56.1}{W}$$

โดย

A = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

9. การวิเคราะห์องค์ประกอบจากปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันปาล์ม

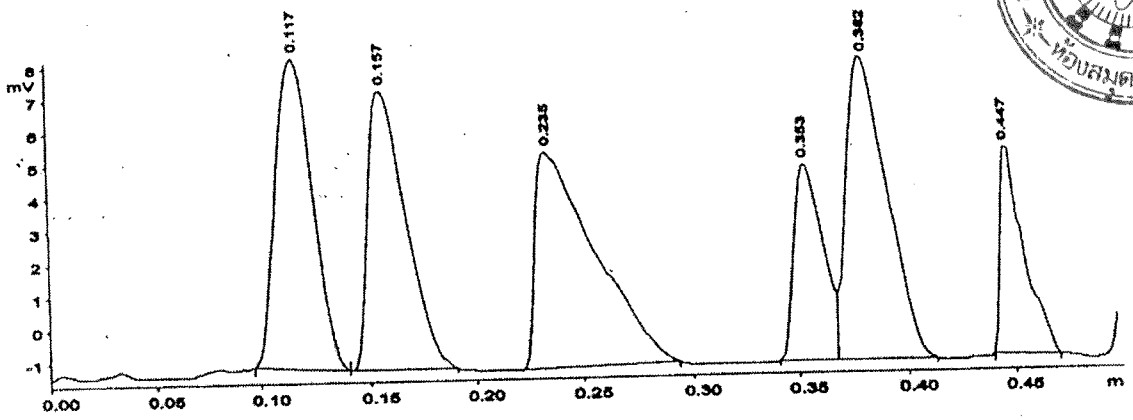
การวิเคราะห์องค์ประกอบจากปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันปาล์ม ได้แก่ อัลคิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ ด้วย TLC/FID analyzer สำหรับขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย TLC/FID analyzer (Freedman *et al.*, 1984) มีดังนี้

1. เตรียม quartz rods (silica gel powder coated Chromarod S-III) โดยแช่ในสารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปทำ blank scan ด้วย TLC/FID analyzer ภายใต้สภาวะ 30 วินาทีต่อสแกน อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของอากาศ 2000 มิลลิลิตรต่อนาที

2. หยดสารละลายไตรกลีเซอไรด์และเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานบน quartz rods ประมาณ 1 ไมโครลิตร นำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์:กรดฟอร์

มิก ในอัตราส่วน 50:20:0.3 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 8 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน:เบนซิน ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร

3. นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาสแกนภายใต้สภาวะเดียวกันกับ blank scan ซึ่งจะคำนวณปริมาณขององค์ประกอบแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้ peak เปรียบเทียบกับ peak ทั้งหมด



Calculation Method: Percent

Peak No.	Ret.Time (min)	Pk.start (min)	Pk.End (min)	Area	Height (mV)	Area %	
1	0.117	0.097	0.140	5792	9.43	19.790	Methyl ester
2	0.157	0.140	0.190	5339	8.49	18.245	Triglyceride
3	0.235	0.222	0.293	6462	6.58	22.082	Free fatty acid
4	0.353	0.342	0.368	3022	5.99	10.327	1-3Diglyceride
5	0.382	0.368	0.413	6117	9.16	20.901	1-2Diglyceride
6	0.447	0.440	0.472	2533	6.31	8.655	Mono-glyceride
				29265	45.95	100.00	

ภาพที่ 42 Retention time ของกลีเซอไรด์ และเมทิลเอสเทอร์

10. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (Perin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$ 36.61 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางที่ 19 ลักษณะปรากฏ พีเอช อุณหภูมิ ของตัวอย่างที่เก็บมาจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และจำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้โดยใช้อาหาร YM and IMY medium

Samples	Appearances	pH	Temp (°C)	Number from YM	Number from IMY
Pure palm oil Company., Ltd., Songkla					
1	Floating oil on surface of brown color water	8.0	37	2	-
2	Floating oil on surface of yellow color water	4.0	45	3	2
3	Dark brown color soil	8.0	37	2	-
4	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	38	6	4
5	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	37	2	3
6	Water around factory area contaminated oil	5.0	27	9	3
7	Oil contaminated soil	3.0	42	-	4
8	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	39	7	5
9	Floating oil on surface of dark brown color water	6.0	37	3	1
10	Turbid yellow color water around factory area	6.0	31	4	3
11	Oil contaminated brown color soil	5.0	31	-	1
Asian palm oil Company., Ltd., Krabi					
1	Soil mixed palm pressed fiber	5.0	33	2	3
2	Oil contaminated	5.0	33	5	5

	palm pressed fiber				
3	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	31	5	4
4	Oil contaminated palm pressed fiber	6.0	29	3	2
5	Oil contaminated dark color soil	5.0	32	2	4
6	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	34	4	1
7	Oil contaminated soil	4.0	41	1	2
8	Oil contaminated brown color waste water	4.0	54	4	2
9	Oil contaminated black color waste water	8.0	44	2	-

Uniwanich palm oil Company., Ltd., Krabi

1	Oil contaminated brown color waste water	9.0	35	-	-
2	Oil contaminated water around factory area	7.0	41	2	-
3	Waste water	4.0	53	3	2
4	Brown color waste water	4.0	64	2	1
5	Waste water	4.0	42	4	5
6	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	37	3	6
7	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	63	4	1
8	Waste water	4.0	54	3	5

Andaman palm oil Company., Ltd., Krabi

1	Oil contaminated brownish color water	6.0	34	7	5
2	Oil contaminated brown color soil	4.0	35	1	2
3	Oil contaminated black color soil	3.0	50	-	2

4	Oil contaminated black color soil	4.0	39	1	2
5	Oil contaminated brown color water	4.0	35	7	3
6	Oil contaminated turbid brown color water	4.0	51	3	3
7	Oil contaminated palm pressed fiber	7.0	31	5	-
8	Oil contaminated turbid brown color water	6.0	36	6	3

1. ลำดับเบสของยีสต์สายพันธุ์ P11I89 ซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบส *Rhodotorula mucilagenosa* (GenBank accession number EU637076.1) ซึ่งมีความเหมือน (homology) เท่ากับ 99 (523/525 bp) เปอร์เซ็นต์

AAGGCACACTGCGTTCCTCAGTCCCCCAAGATGTATCCAGCAGAGAGCTATAACACAG
CCGAAACTAGCTACCTTCTCTCTTACCATTATCCATCCCGGAAAACTGATGCTGGCCTG
CAAACCGATTGCTCGGCAAGCAAGTCTTGACTTCAAGCGTTTCCCTTCCAACAATTTCA
CGTACTGTTAACTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCT
ATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCATAATGAGCTGCAT
TCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAAATGTATCACAAAGCGCTGGGCGTCCGCACCATAT
ACGGGGGTCTCACCACTATGCCGCTGTATTCCAACAGACTTGTGTGCGGTCCAACGCGG
AAAACATTTCTAGAGATTAGAACTCGGACACCGAAGGTGCCAGATTATAAATTTGAGC
TCTTCCCGCTTCGCTCGCCGCTACTAGGGGAATCCTTGTTAGTTTCCTTTTCCTCA

2. ลำดับเบสของยีสต์สายพันธุ์ D1I69 ซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบส *Candida tropicalis* QD 8.1 (GenBank accession number EU543667.1) ซึ่งมีความเหมือน (homology) เท่ากับ 100 (546/546 bp) เปอร์เซ็นต์

TAACCGCAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTTATCGACGAAGGCTATAACACACAAACC
GAAGCCGTCCACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCCAAACTGATGCTGGCCCGATAA
ACTTGTAGAGGCCACCCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGACCTCAAGC
CCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTTCACGCTCTTTTCAAAGTCCCTTTCATCTTT

CCAGCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAAT
TTACCACCCACTTAGACTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAACTTTACATA
GGCCTGGATCATCGCAGCGCACGGGATTCTCACCCTCTGTGACGTTCTGTTCCAAGAAA
CATAGACACGAGCCAGACCCAAAGATACCGTCTTCAAATTACAACTCGGACTCTGAAA
GAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGCAATCCCT
GTTGGTTTCTTTTCCCTCG

3. ลำดับเบสของยีสต์สายพันธุ์ A2I29 ซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบส *Isstchenkia orientalis* KC5 (GenBank accession number EF635636.1) ซึ่งมีความเหมือน (homology) เท่ากับ 99 (531/536 bp) เปอร์เซ็นต์

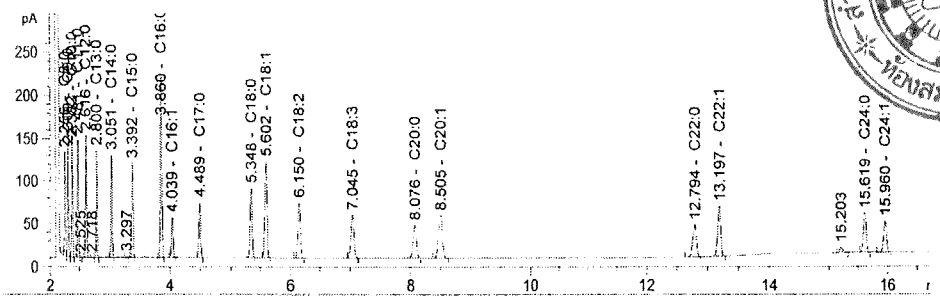
ACACGGCCGCAGTCCTCGGTCCCCGCACGCAGCATCTGGCCCTGGCTATAACACTCGCA
AGAGCCACGTTCCAGAACCCCTTCTCCTGCAGCAAGAACCGATGCTGGCCCAGGGAAA
GCCCAGAGCGCCGCCCACGAGAGGCAGCGGTGCGCAATCCCCATGTCGGGCGCAATAC
CCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTT
CCTTCACAGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCTCGCGTATTTTAGCCTTAGATGGAATTT
ACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGAGTCGTCAGAAGGGCCTCACTGCT
TCCGCCGGCATCCCACGGGGCTCTCACCCTCCTGGGCGCCCTGTTCCAAGGGACTTGGA
CACCGCCTTCCACACAGACTTCAACCTGCAATCTACAACTCGTCGGCCAAAGCACGATT
TCAAATCTGAACTCTTGGCGCTTCACTCGCCGCTACTGGAGGCAAATCCTGGTGGGTTT
CTTTT

4. ลำดับเบสของยีสต์สายพันธุ์ P5I07 ซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบส *Isstchenkia orientalis* isolate 181 (GenBank accession number EF635636.1) ซึ่งมีความเหมือน (homology) เท่ากับ 99 (541/542 bp) เปอร์เซ็นต์

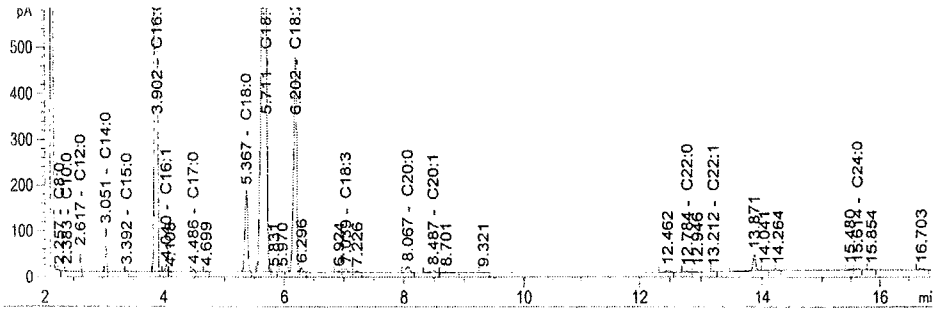
CCTACACGGCCGCAGTCCTCGGTCCCCGCACGCAGCATCTGGCCCTGGCTATAACACTC
CGAAGAGCCACGGTCCAGAACCCCTCTCTCTGCAGCAAGAACCGATGCTGGCCCAGGG
AAAGCCCAGAGCGCCGCCCACGAGAGGCAGCGGTGGCCAATCCCCATGTCGGGCGCA
ATACCCTTCCCTTTCAACAATTACACGTGCTGGTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCA
CTTTTCCTCTACAGTACTTGTTCGCTATCGTCTCCTCGCCAGTATTTAGCCTGAGATGGA
AGTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCGCAAACAACTCGACTCGTCAGAAGGGCCTCA
CTGCTTCCGCCGGCATCCCACGGGGCTCTCACCCTCCTGGGCGCCCTGTTCCAAGGGAC
TTGGACACCGCCTTCCACACAGACTCCAACCTGCAATCTACAACTCGTGCCGCAAAGCA
CGATTTCAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTGAAGCAATCCCTTGTTGT
TTCTTTTCCTCA

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

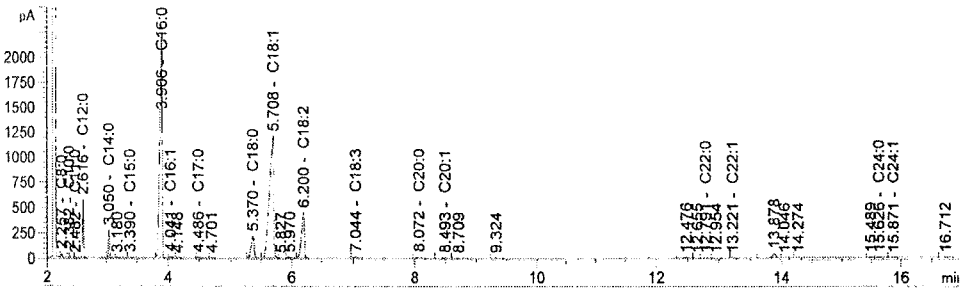
A



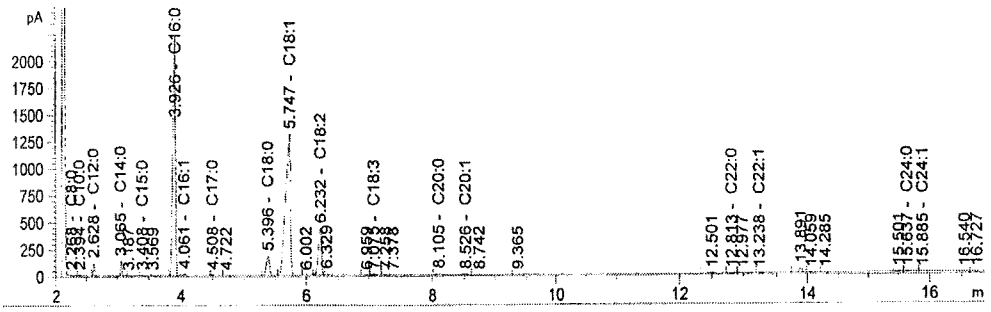
B



C



D



ภาพที่ 43 แก๊สโครมาโตแกรม (GC-FID) ของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐานชนิดต่างๆ (A), กรดไขมันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ (B), น้ำมันปาล์มดิบ (C) และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว (D)