ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

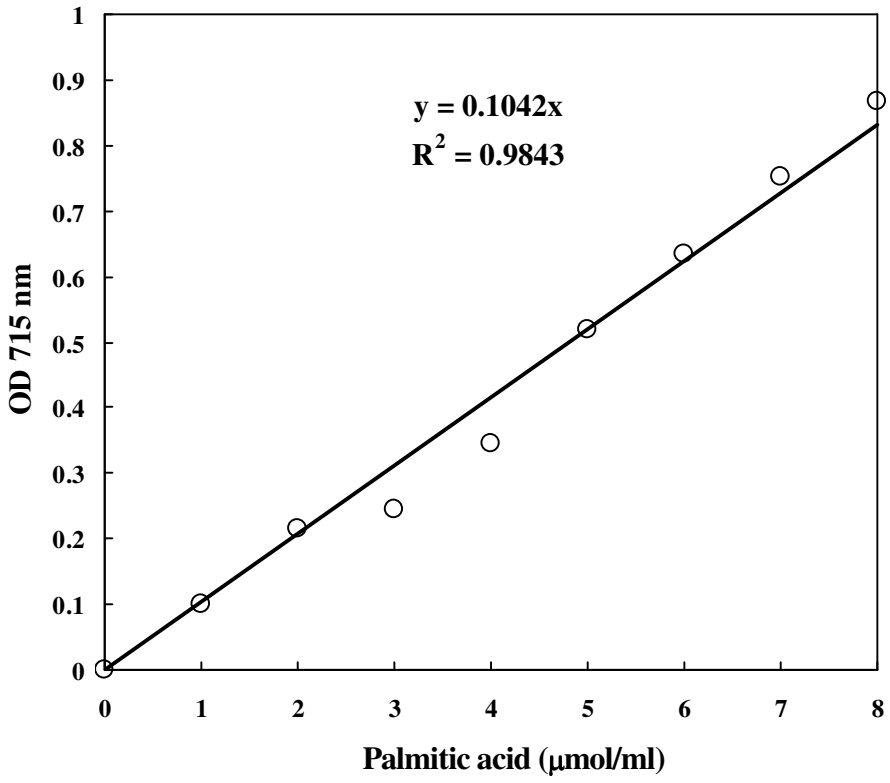
1. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) กรดปาล์มมิติก
2) ไอโซออกเทน
3) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7 (ภาคผนวก ข)
4) สารละลาย Cupric acetate-pyridine reagent ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยชั่ง Cupric acetate ($C_4H_6CuO_4 \bullet H_2O$) 50.0 กรัมละลายในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร กรองส่วนที่ไม่ละลายออก ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.1 ด้วยไพริดีน และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

1) ชั่งกรดปาล์มมิติกที่มีความบริสุทธิ์สูงให้มีน้ำหนักแน่นอนตั้งแต่ 0-10 มิลลิกรัม ละลายในไอโซออกเทนปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการละลาย
2) นำสารละลายกรดปาล์มมิติกที่เตรียมได้จากข้อ 1) ความเข้มข้นละ 1.0 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลาย Cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมอย่างรวดเร็วทิ้งให้แยกชั้น
3) ดูดสารละลายชั้นบนวัดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซ-ออกเทนเป็น blank
4) นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดปาล์มมิติก แสดงดังภาพภาคผนวก ก1



ภาพภาคผนวก ก1 กราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก

Figure-Appendix A1. Standard curve of palmitic acid.

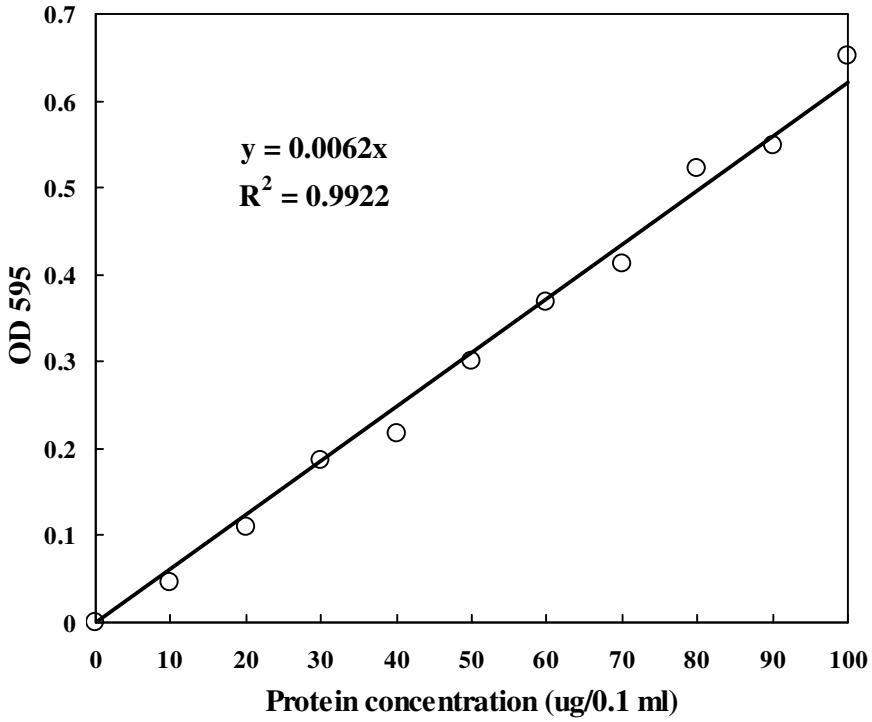
2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี Bradford (1976)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) ชั่ง Coomassie Brilliant blue G 250 100 มิลลิกรัม ละลายใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนอย่างรุนแรงจนละลาย
2) เติม 85 เปอร์เซ็นต์ phosphoric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3) ปรับปริมาตรให้ได้ 600 มิลลิลิตร โดยน้ำกลั่น
4) เติมกลีเซอรอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนจนละลาย
5) ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร กรองเอาส่วนที่ไม่ละลายออก
6) เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ สารละลายที่ได้จะเป็นสีน้ำตาล ถ้าหากเปลี่ยนเป็นสีเขียวดำ ไม่สามารถนำไปใช้ได้ สารละลายนี้ไม่เสถียร สามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 1 เดือน ที่ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์

1) ปีเปตสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน Bradford reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 5 นาที
2) นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร
3) คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน
4) เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ bovine serum albumin (BSA) ปริมาณ 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครกรัม (ใน 0.1 มิลลิลิตร) ชุดควบคุมคือใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์
5) นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน BSA ดังแสดงในภาพผนวก ก2



ภาพภาคผนวก ก2 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

Figure-Appendix A2. Standard curve of protein.

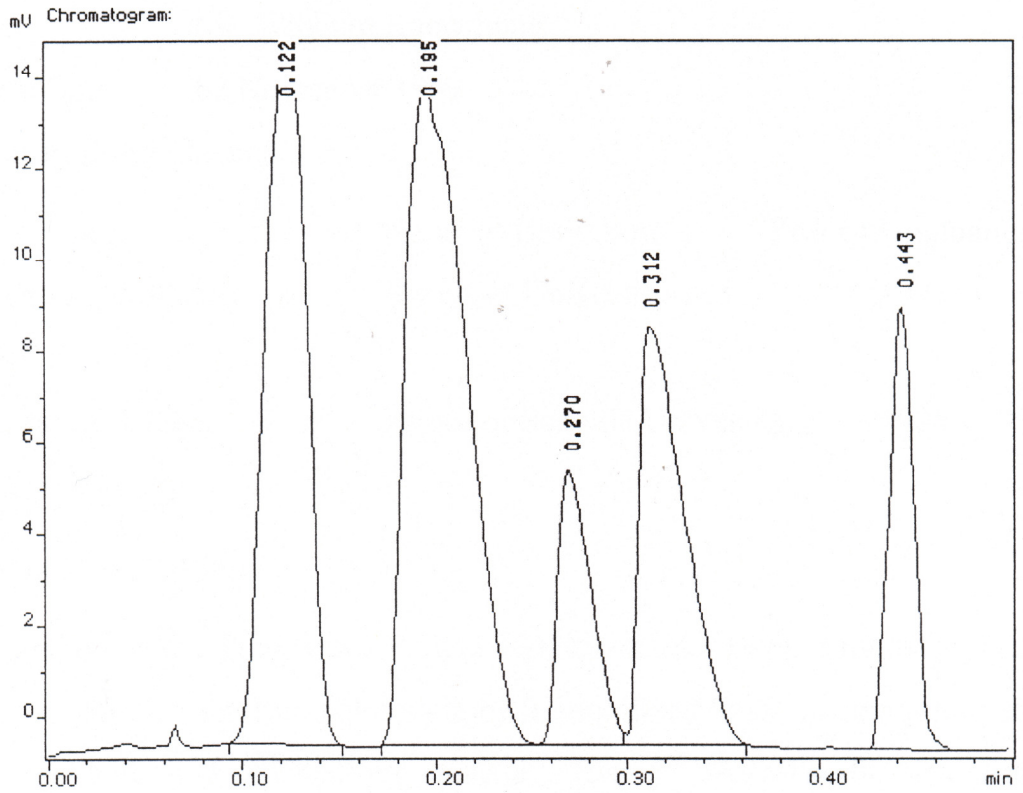
3. การหาค่ามาตรฐานของสารประกอบเอซิลกลีเซอรอล (Rosu *et al*., 1997)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) สารประกอบเอซิลกลีเซอรอลมาตรฐาน (triolein, oleic acid, 1,3-diolein, 1,2dioleoyl-rac-glycerol, monopalmitin)
2) กรดบอร์ริก ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
3) สารละลายผสมของ เบนซีน : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก 50:20:0.7 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์

1) ละลายสารประกอบเอซิลกลีเซอรอลมาตรฐาน ความเข้มข้น 5-10 มิลลิกรัม ด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมธานอล 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 0.3 มิลลิลิตร
2) เตรียม quartz rods (silica gel powder coated Chromarod S-III) โดยแช่ในกรดบอร์ริก ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5 นาที นำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ quartz rods ไปสแกนด้วย TLC/FID analyzer เพื่อทำ blank scan ภายใต้สภาวะ 30 วินาทีต่อสแกน อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของอากาศ 2000 มิลลิลิตรต่อนาที
3) หยดสารประกอบเอซิลกลีเซอรอลมาตรฐาน บน quartz rods แช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายผสมของเบนซีน : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก 50:20:0.7 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) จนสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร
4) นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาสแกนด้วย TLC/FID analyzer ภายใต้สภาวะเดียวกันกับ blank scan
5) อ่านผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม ChromStar light โดยผลการทดลองแสดงดังภาพภาคผนวก ก3 และ ก4
6) ผลการทดลองคำนวณได้จากพื้นที่ของ peak ซึ่งเปรียบเทียบในรูปเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ของแต่ละ peak

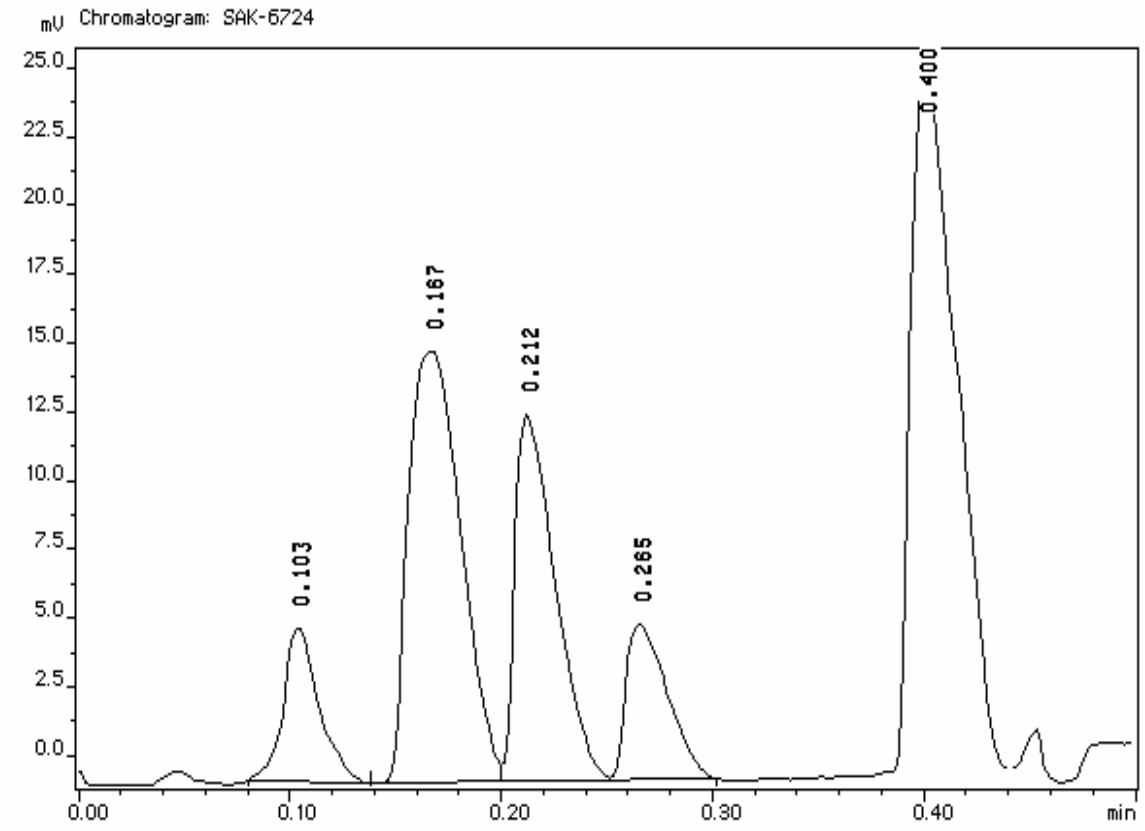


Calculation Method: Percent

Peak No.	Name	Ret. Time (min)	Pk. start (min)	Pk. end (min)	Area	Height (mV)	Area %
1	Triolein	0.123	0.093	0.152	12059	15.26	26.731
2	Oleic acid	0.195	0.172	0.248	16658	14.41	36.923
2	1,3-Diolein	0.270	0.248	0.298	3913	5.99	8.674
4	1,2-Dioleoyl-rac-glycerol	0.312	0.298	0.362	7831	9.07	17.358
5	Monopalmitin	0.443	0.427	0.472	4654	9.67	10.315
					45115	54.39	100.000

ภาพภาคผนวก ก3 ค่า Retention time ของสารประกอบเอซิลกลีเซอรอลมาตรฐาน

Figure-Appendix A3. Retention time of standard acylglycerol.



Calculation Method: Percent

Peak No.	Name	Ret. Time (min)	Pk. start (min)	Pk. end (min)	Area	Height (mV)	Area %
1	Triacylglycerol	0.103	0.080	0.138	3417	5.58	6.68
2	Free fatty acid	0.167	0.138	0.200	14199	15.60	27.75
2	1,3-Diacylglycerol	0.212	0.200	0.252	9302	13.30	18.18
4	1,2-Diacylglycerol	0.265	0.252	0.302	4035	5.65	7.89
5	Monoacylgilcerol	0.400	0.387	0.442	20205	25.97	39.49
					51157	66.10	100.00

ภาพภาคผนวก ก4 ค่า Retention time ของสารประกอบเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมันปาล์มโอลีอีน

Figure-Appendix A4. Retention time of palm olein.

4. การหาอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น (Initial rate (mmol/h))

ตารางภาคผนวก ก1 อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น (Initial rate (mmol/h))

Table- Appendix A1 Initial rate of monoacylglycerol (Initial rate (mmol/h)).

(A) Palm oil concentration (g)	(B) Initial rate (%/h)	(C) Initial rate (mmol/h)
0.22	73.67	0.47
0.44	32.86	0.42
0.66	28.99	0.56
0.88	21.86	0.56
1.10	18.01	0.58
1.32	13.11	0.51

วิธีคำนวณอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น (Initial rate (mmol/h))

(C) (mmol/h = (A) x (B) / 100 / 342 x 100

5. วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

จากสูตรการคำนวณปริมาตรทรงกลม

$$= \frac{4\P r^2}{3}$$

ตารางภาคผนวก ก2 ปริมาตรของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต

Table- Appendix A2 Capacity of immobilized lipase with alginate.

Needle size (G)	Diameter of beads (cm)	Radius (r) (cm)	Capacity of bead (cm^3)
24 G (0.55 x 25 mm)	0.2	0.1	0.004
20 G (0.90 x 25 mm)	0.25	0.125	0.008
18 G (1.20 x 25 mm)	0.3	0.15	0.014

นำปริมาตรของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมโดยหน่วยที่ได้จะเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอช 7.0 ด้วยเครื่องวัดพีเอช

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 31.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 36.61 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

2. การเตรียมและหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริค

ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (Paquot, 1979)

วิธีการเตรียม

เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ค่อยๆ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

การหาความเข้มข้น

ชั่งโซเดียมเทตราบอเรต (Borax: $Na_2B_4O_7 \cdot H_2O$) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 2.0 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมเมทิลเรด 3 หยด (ใช้เป็นอินดิเคเตอร์) นำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอลิคที่เตรียมไว้ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูที่จุดยุติ สามารถคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริคได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{\text{น้ำหนักของโซเดียมเทตราบอเรต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายกรดที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร)} \times 0.1907}$$

$$\text{สมมูลของเทตราบอเรต} = 190.72$$