

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างที่เก็บจากทะเล

จากการนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากทะเล (สัตว์น้ำ, พืชน้ำ, ซากพืช, ซากสัตว์, ตะกอนดิน, ทางเดินอาหาร, ฟองน้ำ, ดิน, ทราบ, น้ำ, ปะการัง ฯลฯ) จำนวน 77 สายพันธุ์ที่มีอยู่ใน culture collection ของห้องปฏิบัติการมาเลี้ยงบนอาหาร YM agar ซึ่งมีการเติมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ และ Rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวบ่งชี้การย่อยน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ และส่องเชื้อยีสต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร พบว่ายีสต์จำนวน 30 สายพันธุ์ เกิดการเรืองแสงรอบโคโลนีและโคโลนีของยีสต์มีสีชมพู-ส้ม นอกจากนี้ยังเกิดวงใสรอบโคโลนี ดังแสดงในตารางที่ 6 เป็นการยืนยันว่าสายพันธุ์ยีสต์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเนื่องจากสามารถใช้ไขมันปาล์มเป็นสับสเตรท และเกิดวงใสรอบโคโลนี นอกจากนี้โคโลนีของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นสีชมพู-ส้ม เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่ยีสต์ผลิตขึ้นจะย่อยสับสเตรทได้แก่น้ำมันปาล์มเป็นกรดไขมันสายสั้น ซึ่ง Rhodamine B จับกับกรดไขมันทำให้เกิดโคโลนีชมพู-ส้ม และเรืองแสงเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เช่นเดียวกับ Wang และคณะ (1995) ได้คัดแยก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีการเติม Rhodamine B สามารถคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เนื่องจาก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเกิดสีชมพู-ส้มรอบโคโลนี สอดคล้องกับการทดลองของ Chaiyaso (2007) ที่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งที่มีการเติม Rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ พบว่ารอบโคโลนีของแบคทีเรียมีสีชมพู-ส้ม และเกิดวงใสรอบโคโลนีดังกล่าวเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร นอกจากนี้ Heravi และคณะ (2008) ได้คัดแยก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินบนอาหารที่เติม Rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ พบว่ารอบโคโลนีเป็นวงใสและเป็นสีชมพู-ส้ม ซึ่งสามารถบ่งชี้ว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

2. การแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

จากการนำตัวอย่าง ดิน, น้ำ และกากปาล์ม ที่เก็บจากโรงงานน้ำมันปาล์มบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน มาตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะปรากฏ, พีเอช และอุณหภูมิ (ภาคผนวก ค) ก่อนนำมาแยกเชื้อ ยีสต์บนอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถแยกยีสต์ได้จากตัวอย่างจากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์จำกัด จังหวัดสงขลา จำนวน 64 สายพันธุ์ โดยแยกได้จากอาหาร Yeast-malt medium (YM) 38 สายพันธุ์ และอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) 26 สายพันธุ์ จากจำนวนตัวอย่าง 11 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างจำนวน 9 ตัวอย่างจากบริษัทเอเชียนปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่ แยกได้เชื้อยีสต์จำนวน 51 สายพันธุ์ โดยเป็นยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร YM 28 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 23 สายพันธุ์ 8 ตัวอย่างจากบริษัทยูนิวานิช

น้ำมันปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่ ได้ยีสต์ 41 สายพันธุ์ แยกได้จากอาหาร YM 21 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 20 สายพันธุ์ และ 8 ตัวอย่างจากบริษัทอเนกามันน้ำมันปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่ ได้ยีสต์จำนวน 50 สายพันธุ์ แยกได้จากอาหาร YM 30 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 20 สายพันธุ์ รวมจำนวนยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้ทั้งหมด 206 สายพันธุ์ โดยแยกได้จากอาหาร YM จำนวน 117 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 89 สายพันธุ์ โดยอาหาร YM และ IMY ที่นำมาคัดแยกนั้นมีส่วนประกอบของอาหารที่แตกต่างกัน อาหาร YM มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ คือ yeast extract, malt extract และ peptone และน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน โดย Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนและ co-factor หลายชนิดที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไกลโคไลปิดของยีสต์ (Walker, 1998) ในขณะที่อาหาร IMY เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วย yeast extract และสารประกอบอินทรีย์ที่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน (semi-synthetic media) ซึ่งอาหาร IMY มีองค์ประกอบที่เป็นสารเคมีที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม เป็นต้น (นงลักษณ์และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) อาหารทั้งสองชนิดมีการเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเจริญได้เร็วกว่ายีสต์ โดยยาปฏิชีวนะชนิดนี้มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยการรวมกับ 50S ไรโบโซม ชัดขวางกระบวนการทรานสเพปติเดชัน (transpeptidation) และทรานสโลเคชัน (translocation) (นงลักษณ์ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) จากการที่อาหาร YM มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายและมีความเข้มข้นของสารอาหารสูงกว่าอาหาร IMY ซึ่งมีเฉพาะน้ำมันปาล์มที่เป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้นเป็นผลให้เมื่อใช้อาหาร YM แยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ยีสต์หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีและพบจำนวนยีสต์มากกว่าเมื่อใช้อาหาร IMY

ตารางที่ 6 จำนวนสายพันธุ์ยีสต์จากทะเลที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

Yeast strains	Numbers of strains	
	Lipase producing yeasts	Non-lipase producing yeasts
FS1-FS27	5	7
KK3-KK40	0	1
KT1.1.1-KT 2.8.1	10	12
PP002-PP028	3	6
TR16	1	0
PHK1.1-PHK9B	11	21
Total	30	47

FS = ทางเดินอาหารปลาทะเล, KK = ตัวอย่างจากเกาะกระ จ.นครศรีธรรมราช, KT = ตัวอย่างจากเกาะเต่า, PP=ตัวอย่างจากเกาะพีพี, TR = ตัวอย่างจากหาดปากเมง จ.ตรัง, PHK = ตัวอย่างจากเกาะภูเก็ต

เมื่อพิจารณาชนิดตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ พบว่าสามารถแยกยีสต์จากตัวอย่างที่เป็นน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันได้มากที่สุด 102 สายพันธุ์ รองลงมาเป็นตัวอย่างกากปาล์ม และดิน ซึ่งแยกยีสต์ได้ 75 และ 29 สายพันธุ์ ตามลำดับ จากค่าพีเอชของตัวอย่างที่เก็บมาคัดแยกยีสต์ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างน้ำ, กากปาล์ม และดิน ที่มีพีเอช 4-6 ได้จำนวนยีสต์ 92, 70 และ 25 สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้มากกว่าตัวอย่างที่มีพีเอช 7-9 ที่ได้จำนวนยีสต์จากตัวอย่างน้ำ, กากปาล์ม และดิน 6, 5 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ และที่พีเอช 3 ได้ยีสต์จากตัวอย่างน้ำ และดิน จำนวน 4 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ อุณหภูมิของตัวอย่างต่างๆ ที่นำมาคัดแยกมีผลต่อจำนวนยีสต์ที่แยกได้เช่นกัน โดยพบว่าในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส สามารถแยกยีสต์ได้จำนวนมาก คือ จากตัวอย่างน้ำ, กากปาล์ม และดิน ได้ยีสต์ 56, 70 และ 20 สายพันธุ์ ส่วนที่อุณหภูมิ 41-70 องศาเซลเซียส พบยีสต์จำนวนน้อย (ตารางที่ 8) ซึ่งการที่พบยีสต์จำนวนหลายสายพันธุ์จากตัวอย่างที่มีพีเอช 4-6 และอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการคัดแยกใกล้เคียงกับพีเอชและอุณหภูมิของตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อยีสต์ นอกจากนี้ ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญดีที่พีเอช 3.5-5.0 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของโปรตีนที่เกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งเอนไซม์ และโปรตีนที่ใช้สำหรับการขนส่งสารต่างๆ ของยีสต์อีกด้วย (สาวิตรี ลิมทอง, 2540) จากการทดลองของ Hernandez และคณะ (2007) ได้ทำการแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่าง olive fruit และ olive brine พบว่า เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอช 3.96-4.18 ได้ยีสต์จำนวนมากถึง 83 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับ Landell และคณะ (2006) ได้นำชีส (ricotta และ caccio cavallo cheese) จากตอนใต้ของบราซิล 30 ตัวอย่างมาแยกยีสต์ด้วยอาหาร YM และอาหาร YEPG ที่มีพีเอช 4.0 พบว่า ได้ยีสต์ทั้งหมด 97 สายพันธุ์

ตารางที่ 7 จำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ เส้นใยปาล์ม และดินที่เก็บจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Samples	Number of samples	pH range	Number of yeast isolates
Water	1	3	4
	12	4-6	92
	4	7-9	6
Palm pressed fiber	9	4-6	70
	1	7-9	5
Soil	1	3	2
	7	4-6	25
	1	7-9	2
Total	36	-	206

ตารางที่ 8 จำนวนสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกจากตัวอย่างที่มีระดับอุณหภูมิต่างๆ

Samples	Number of samples	Temperature	Number of yeast isolates
Water	8	25-40	56
	8	41-60	43
	1	61-70	3
Palm pressed fiber	9	25-40	70
	-	41-60	-
	1	61-70	5
Soil	6	25-40	20
	3	41-60	9
	-	61-70	-
total	36	-	206

การแยกยีสต์ในอาหารที่มีการเติม Rhodamine B ลงไปในอาหารทั้งอาหาร YM และอาหาร IMY เพื่อที่สามารถคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสไปพร้อมๆ กับการแยกยีสต์ ซึ่งการเติม Rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการผลิตเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกของ Rhodamine B และไอออนลบของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปส เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ uranyl-fatty acid ซึ่งสามารถเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ 350 นาโนเมตรได้ ดังแสดงใน ภาพที่ 5 (Mackenzie *et al.*, 1967) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเชิงปริมาณที่แน่นอนได้ เพราะน้ำมันปาล์มที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อผสมกับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร ทำให้ยากต่อการดูวงใสเพื่อบ่งชี้ถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยตรง การใช้ Rhodamine B จึงเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการคัดเลือกระดับเชิงคุณภาพ (Kouker and Jaeger, 1987) ทำให้สามารถทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตไลเปสไปด้วยกันกับการแยกเชื้อยีสต์ จึงสามารถแยกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในขั้นตอนเดียว แตกต่างจากการศึกษาของ Hernandez และคณะ (2007) ที่ทำการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่าง olive fruit และ olive brine จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยขั้นตอนแรกคัดแยกยีสต์ด้วยอาหาร tributyrin medium บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน พบว่า คัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 83 สายพันธุ์ ต่อจากนั้นในขั้นตอนที่สองจึงค่อยนำยีสต์ที่คัดแยกได้ไปเลี้ยงในอาหาร tributyrin medium ที่มี Rhodamine B เพื่อแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่า มียีสต์เพียง 7 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ และมีการศึกษาจาก Thongekkaew และ Boonchird (2007) ในการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงจากตัวอย่างทั้งหมด 149 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารแข็งที่มี

น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติม rhodamine B ลงไปในอาหาร (YNB-Rhodamine B) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า คัดแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 30 สายพันธุ์ และมียีสต์เพียง 3 สายพันธุ์ เท่านั้นที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตไลเปสบนอาหาร Isolation Medium for Yeast ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน และ Rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3. การคัดเลือกยีสต์ที่แยกจากทะเลโดยการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยไขมัน (hydrolysis activity)

จากการนำยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างจากทะเลจำนวน 30 สายพันธุ์ มาวัดกิจกรรมไฮโดรไลซิสด้วยวิธี two phase emulsion หรือ cupric acetate method ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท พบยีสต์ที่มีกิจกรรมไฮโดรไลซิส 10 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ KT2.5.1, KT1.8.1, PHK 2B, PHK 8B, KT.1.7.1, KT 2.11.1, PHK1A-1, KT 2.13.1, PHK 2.2 และ TR16 ซึ่งสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมสูงสุดได้แก่สายพันธุ์ PHK1A-1 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.372 หน่วยต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สายพันธุ์ TR16, KT2.13.1, PHK 2.2, PHK8B, PHK2B, KT 1.8.1, KT 2.5.1, KT2.11.1 และ KT 1.7.1 มีค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสเท่ากับ 1.24, 1.028, 1.024, 1.008, 1.001, 0.97, 0.937 และ 0.921 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงตามตารางที่ 9 จากการศึกษากิจกรรมไฮโดรไลซิสของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ที่คัดเลือกได้มีกิจกรรมการย่อยสลายไขมันเกิดเป็นไขมันอิสระได้สูงซึ่งสอดคล้องกับ Ghosh และคณะ (2005) ได้ศึกษากิจกรรมไฮโดรไลซิสของไลเปสจาก *Pseudomonas sp.* ด้วยวิธี cupric acetate method พบว่า สายพันธุ์ SB3 ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดคือ 0.54 หน่วยต่อมิลลิลิตร H-Kittikun และคณะ (2000) ศึกษากิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปส 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Burkholderia cepacia*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida rugosa* ด้วยวิธี cupric

acetate method พบว่าเอนไซม์จาก *Candida rugosa* มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 209 ยูนิต์ต่อ มิลลิกรัมโปรตีน โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* จะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์แบบสุ่ม นอกจากนี้ Kaieda และคณะ (2001) อธิบายว่าในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของน้ำมัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าเริ่มต้นเอนไซม์ไลเปสจะย่อยพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันและกลีเซอไรด์จากนั้นได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์โดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของกรดไขมันกับเมทานอล จากการทดลองจึงเลือกยีสต์จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ KT.1.7.1, KT 1.8.1, KT2.5.1, KT 2.11.1, KT 2.13.1, PHK 1A-1, PHK 2.2, PHK 2B, PHK 8B และ TR16 เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันได้สูงต่อไป

ตารางที่ 9 กิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปส (cupric acetate method) จากสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้จากทะเล

Strains	Hydrolysis activity	Strains	Hydrolysis activity
	(U/ml)		(U/ml)
FS 2	0.78 ± 0.096	PHK	0.90 ± 0.061
FS 4.3	0.31 ± 0.016	PHK 1A-1*	1.37 ± 0.017
FS16	0.73 ± 0.078	PHK 1B	0.85 ± 0.010
FS 19	0.83 ± 0.086	PHK 2.2*	1.02 ± 0.078
FS 25	0.66 ± 0.151	PHK 2B*	1.00 ± 0.108
KT 1.7.1*	0.92 ± 0.098	PHK 2.5	0.64 ± 0.013
KT1.8.1*	0.97 ± 0.134	PHK 3B	0.67 ± 0.102
KT 2.1	0.60 ± 0.051	PHK 4A	0.76 ± 0.150
KT 2.3.1	0.81 ± 0.049	PHK 8B*	1.01 ± 0.239
KT 2.5.1*	0.94 ± 0.056	PHK 2.12	0.60 ± 0.029
KT 2.6	0.49 ± 0.066	PP 2	0.47 ± 0.005
KT 2.10	0.73 ± 0.218	PP 8.2	0.73 ± 0.022
KT 2.11.1*	0.92 ± 0.163	PP 13.2	0.68 ± 0.040
KT 2.13.1*	1.03 ± 0.020	TR 16*	1.24 ± 0.021
KT 1.20.1	0.79 ± 0.096		

*สายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อทดสอบกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน

FS = ทางเดินอาหารปลาทะเล, KK = ตัวอย่างจากเกาะกระ จ.นครศรีธรรมราช, KT = ตัวอย่างจากเกาะเต่า, PP=ตัวอย่างจากเกาะพีพี, TR = ตัวอย่างจากหาดปากเมง จ.ตรัง, PHK = ตัวอย่างจากเกาะภูเก็ต

3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification activity) และปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification)

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันและปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของยีสต์จำนวน 10 สายพันธุ์ โดยใช้ตัวเซลล์จำนวน 1×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และส่วนใสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรทสำหรับปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันและกรดปาล์มติกเป็นสับสเตรทสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน ในอัตราส่วนน้ำมันปาล์มหรือกรดปาล์มติกต่อเมทานอล 1: 3 (โมล/โมล) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมงปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของเซลล์ยีสต์ไม่พบการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของยีสต์ทั้ง 10 สายพันธุ์ แต่ในขณะที่เดียวกันพบว่าส่วนใสของยีสต์สายพันธุ์ PHK 2.2 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันเพื่อผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดคือ 0.31 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ 1-3 ไคกลีเซอไรด์ 1-2 ไคกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ เท่ากับ 92.43, 1.33, 4.10 และ 1.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 นอกจากนี้พบว่าปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันระหว่างกรดไขมันโอเลอิกและเมทานอลที่เร่งโดยใช้เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ PHK 8B สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดโอเลอิกได้สูงสุดคือ 0.67 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณกรดไขมันเท่ากับ 99.34 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ส่วนใสจากการเลี้ยงยีสต์ 10 สายพันธุ์ ในการเร่งปฏิกิริยาพบว่าสายพันธุ์ KT 1.8.1 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดโอเลอิกได้สูงสุด คือ 1.86 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ KT.1.7.1, PHK 2.1, KT 2.11.1, PHK 2B และPHK 8B สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 1.75, 1.67, 1.47, 1.43 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11 จากการทดลองพบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันและปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันที่เร่งโดยใช้เซลล์ยีสต์มีปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาที่เร่งโดยใช้เอนไซม์จากส่วนใสซึ่งมีค่าสูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณของเอนไซม์ภายในเซลล์ยีสต์มีปริมาณน้อยกว่าภายนอกเซลล์ หรืออาจเนื่องจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ไม่ทนต่อเมทานอลในขั้นตอนของปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส ดังข้อสรุปของ Kaieda และคณะ (2001) ที่ศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ซึ่งใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida rugosa*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida lipolytica* และ *Klebsiella oxytoca* พบว่า *P. cepacia* ให้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์สูงสุดคือ 32 เปอร์เซ็นต์ และเมทิลเอสเทอร์จาก *P. roqueforti* และ *C. lipolytica* มีค่าเท่ากับ 8 และ 8.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเอนไซม์ไลเปสจาก *P. camembertii* และ *K. oxytoca* ไม่พบปริมาณเมทิลเอสเทอร์เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาอาจน้อยหรือเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสไม่ทนต่อเมทานอลที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส

ตารางที่ 10 การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอล
ที่มียีสต์ที่แยกได้จากทะเลเป็นตัวเร่ง

Yeast strains	% FAMES	% TG	% FFA	%1-3 di	%1-2di	% MG
Whole cell						
KT2.5.1	0 ± 0	90.34 ± 0.40	0 ± 0	6.79 ± 2.40	1.73 ± 1.63	1.145 ± 1.18
PHK 1A-1	0 ± 0	96.27 ± 0.79	0 ± 0	2.12 ± 0.28	0.69 ± 0.06	0.93 ± 1.03
KT 2.13.1	0 ± 0	94.5 ± 0.00	0 ± 0	1.56 ± 0.49	1.32 ± 0.17	2.645 ± 0.64
PHK 2.2	0 ± 0	96.57 ± 0.15	0 ± 0	1.68 ± 0.86	0.78 ± 0.33	0.98 ± 1.05
TR16	0 ± 0	94.07 ± 0.52	0 ± 0	1.98 ± 0.42	1.12 ± 0.72	2.83 ± 0.63
PHK 8B	0 ± 0	92.79 ± 0.89	0 ± 0	99.4 ± 0.85	0.6 ± 0.85	2.67 ± 0.18
PHK 2B	0 ± 0	96.60 ± 0.32	0 ± 0	2.39 ± 0.20	1.02 ± 0.11	0 ± 0
KT.1.7.1	0 ± 0	96.69 ± 0.22	0 ± 0	2.12 ± 0.68	0.76 ± 0.18	0.43 ± 0.27
KT 1.8.1	0 ± 0	93.26 ± 0.90	0 ± 0	2.75 ± 0.30	0 ± 0	4 ± 0.75
KT 2.11.1	0 ± 0	97.21 ± 0.49	0 ± 0	2.02 ± 0.42	0.78 ± 0.77	0 ± 0
Supernatant						
KT2.5.1	0 ± 0	88.56 ± 3.35	0 ± 0	5.20 ± 0.01	0 ± 0	6.26 ± 3.36
PHK1A-1	0 ± 0	93.92 ± 1.11	0 ± 0	1.36 ± 0.24	0 ± 0	4.83 ± 1.49
KT 2.13.1	0 ± 0	97.37 ± 0.21	0 ± 0	1.28 ± 0.31	0.59 ± 0.12	0.76 ± 0.40
PHK 2.2	0.31 ± 0.43	92.43 ± 2.48	0 ± 0	1.33 ± 0.23	4.10 ± 0.28	1.85 ± 0.23
TR16	0 ± 0	95.71 ± 1.55	0 ± 0	1.58 ± 0.19	0.53 ± 0.12	2.19 ± 1.87
PHK8B	0 ± 0	92.79 ± 0.89	0 ± 0	99.4 ± 0.85	0.6 ± 0.85	2.67 ± 0.18
PHK2B	0 ± 0	96.60 ± 0.32	0 ± 0	2.39 ± 0.20	1.02 ± 0.11	0 ± 0
KT.1.7.1	0 ± 0	96.83 ± 0.10	0 ± 0	2.75 ± 0.30	0 ± 0	4 ± 0.75
KT 1.8.1	0 ± 0	97.11 ± 0.07	0 ± 0	1.77 ± 0.01	0.69 ± 0.27	0.43 ± 0.18
KT 2.11.1	0 ± 0	95.97 ± 0.98	0 ± 0	0 ± 0	2.04 ± 0.61	0.81 ± 0.27

FAMES = Fatty acid methyl esters, TG = Triglyceride, FFA = Free fatty acid, 1-3di = 1-3diglyceride,
1-2di = 1-2diglyceride, MG = Monoglyceride

ตารางที่ 11 การผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดโอเลอิกจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของกรดไขมันโอเลอิกและเมทานอลที่มียีสต์ที่แยกได้จากทะเลเป็นตัวเร่ง

Yeast strains	% FAMES	% TG	% FFA	%1-3 di	%1-2di	% MG
Whole cell						
KT2.5.1	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PHK1A-1	0 ± 0	0 ± 0	32.92 ± 3.42	1.31 ± 0.58	0 ± 0	65.77 ± 4.01
KT 2.13.1	0 ± 0	0 ± 0	98.31 ± 2.40	0 ± 0	0 ± 0	1.70 ± 4.01
PHK2.2	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
TR16	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PHK 8B	0.67 ± 0.67	0 ± 0	99.34 ± 0.94	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PHK 2B	0 ± 0	0 ± 0	98.64 ± 1.92	0 ± 0	0 ± 0	1.36 ± 1.92
KT.1.7.1	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
KT 1.8.1	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
KT 2.11.1	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Supernatant						
KT2.5.1	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PHK1A-1	1.67 ± 0.30	0 ± 0	91.15 ± 0.45	3.41 ± 1.36	0 ± 0	3.77 ± 2.23
KT 2.13.1	0 ± 0	0 ± 0	97.86 ± 3.03	0 ± 0	0 ± 0	2.14 ± 3.03
PHK 2.2	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
TR16	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PHK 8B	0.2 ± 0.28	0 ± 0	98.11 ± 1.23	0.66 ± 0.93	0.53 ± 0.74	0.51 ± 0.72
PHK 2B	1.425 ± 0.13	0 ± 0	97.54 ± 0.06	0 ± 0	0 ± 0	1.04 ± 0.19
KT.1.7.1	1.745 ± 0.09	0 ± 0	97.40 ± 1.12	0.86 ± 1.12	0 ± 0	0 ± 0
KT 1.8.1	1.86 ± 0.11	0 ± 0	98.14 ± 0.11	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
KT 2.11.1	1.47 ± 0.21	0 ± 0	97.19 ± 2.11	0 ± 0	0 ± 0	1.35 ± 1.90

FAMES = Fatty acid methyl esters, TG = Triglyceride, FFA = Free fatty acid, 1-3di = 1-3diglyceride,

1-2di = 1-2diglyceride, MG = Monoglyceride

4. การคัดเลือกยีสต์ที่แยกจากโรงงานน้ำมันปาล์มโดยการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

4.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยไขมัน (hydrolysis activity)

จากการนำยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 3.1 ทั้งหมด 206 สายพันธุ์มาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของส่วนใสที่ใช้จากการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร Yeast Malt (YM) จำนวน 117 สายพันธุ์ มีเพียง 22 สายพันธุ์ที่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยสายพันธุ์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงคือ สายพันธุ์ P4Y12, U2Y68 และ A4Y52 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.41 ± 0.008 , 0.25 ± 0.002 และ 0.216 ± 0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) จำนวน 89 สายพันธุ์ มี 27 สายพันธุ์ที่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยสายพันธุ์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงคือ สายพันธุ์ D2I75, P5I07 และ U4I51 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.22 ± 0.015 , 0.18 ± 0.003 และ 0.12 ± 0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 12) การคัดเลือกยีสต์โดยการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท เป็นการวัดอัตราการย่อยสลายของ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เกิดเป็น *p*-nitrophenol ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรได้ โดยมี Gum Arabic และ Triton X-100% เป็นตัวอิมัลซิไฟเออร์ นอกจากนี้การวิเคราะห์แบบโคเนติกส์โดยวัดอัตราการเกิดเป็น *p*-nitrophenol นั้น สามารถวัดได้ที่ค่าพีเอชเป็นกลางหรืออยู่ในช่วงของค่าพีเอชในช่วงพีเอชที่เป็นกรดจะมีผลต่อการดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol (Gilham and Lehner, 2005)

นอกจากนี้เมื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ด้วยวิธี two-phase emulsion พบว่า มีเพียงยีสต์สายพันธุ์ P11I89 เท่านั้น ที่สามารถวัดปริมาณเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี two-phase emulsion ได้ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.54 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งสองวิธี มีสับสเตรทที่จะให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแตกต่างกัน โดยวิธีการวิเคราะห์ของ Kademi และคณะ (2000) มี *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท ซึ่งมีกรดปาล์มมิติก (C16:0) เป็นกรดไขมันอยู่เพียงชนิดเดียว ส่วนวิธี two-phase emulsion มีน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ซึ่งในน้ำมันปาล์มมีกรดไขมันหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ จึงทำให้ผลของการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งสองวิธีนี้แตกต่างกัน เนื่องจากความจำเพาะต่อการย่อยชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของสับสเตรทที่ใช้ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกผลิตขึ้นมาไม่ได้มีความจำเพาะต่อการย่อยตรงตำแหน่งของกรดปาล์มมิติกในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เพียงแค่ตำแหน่งเดียว แต่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาตรงตำแหน่งของกรดไขมันชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์มได้ด้วย เมื่อนำสารละลายเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate จึงทำให้เกิดสีที่ชัดเจน สามารถตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ชัดเจนกว่าสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนั้นยีสต์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Kademi และคณะ (2000) พบว่า แยกได้จากตัวอย่างน้ำ, กากปาล์มและดิน จำนวน 22, 19 และ 8 สายพันธุ์ โดยพีเอชของตัวอย่างที่แยกยีสต์ได้มีค่าพีเอชอยู่ในระหว่าง 4-6 ยกเว้นยีสต์สายพันธุ์ U2Y68 และ D7Y109 ที่แยกได้จากตัวอย่างที่มีค่าพีเอช 7 เมื่อพิจารณาถึงอุณหภูมิ จะเห็นได้ว่ายีสต์ที่มี

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทุกช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 27-64 องศาเซลเซียส โดยสายพันธุ์ P11189 ที่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีเป็นยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินสีน้ำตาล ที่มีน้ำมันปนเปื้อน มีค่าพีเอช 5 อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ดังนั้นการคัดแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ควรเลือกเก็บตัวอย่างที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4-6 เพราะค่าความเป็นกรดต่างเป็นข้อจำกัดของการคัดแยกยีสต์มากกว่าระดับของอุณหภูมิ

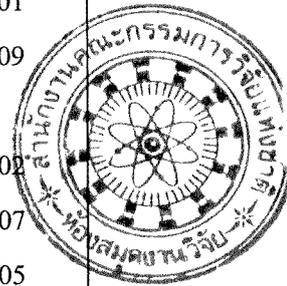
มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก Thongekkaew และ Boonchird (2007) ได้ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida thermophila* ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศไทยโดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดมีค่าเท่ากับ 2.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Cardenas (2001) ศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula araucariae* ด้วยวิธี two-phase emulsion พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 12 กิจกรรมไฮโดรไลซิส (*p*-nitrophenyl palmitate assay) ของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำมันปาล์มเป็นตัวเร่ง

Yeast strains	Sources	pH	Temp (°C)	Hydrolysis activity (Unit/ml)
From IMY				
U5I52	Waste water	4.0	42	0.004±0.001
U6I60	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	37	0.004±0.001
D1I69	Oil contaminated brownish color water	6.0	34	0.007±0.001
P8I21	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	39	0.008±0.003
P6I11	Water around factory area contaminated oil	5.0	27	0.009±0
U8I64	Waste water	4.0	54	0.010±0.001
D1I72	Oil contaminated brownish color water	6.0	34	0.010±0.002
D1I73	Oil contaminated brownish color water	6.0	34	0.010±0.002
A7I46	Oil contaminated soil	4.0	41	0.014±0.001
A3I37	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	31	0.016±0.005
U8I68	Waste water	4.0	54	0.020±0.002
U6I57	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	37	0.021±0.003
P2I02	Floating oil on surface of yellow color water	4.0	45	0.023±0.004

P11I89	Oil contaminated brown color soil	5.0	31	0.026±0.002
P4I03	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	38	0.028±0.003
P8I20	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	39	0.029±0
D2I74	Oil contaminated brown color soil	4.0	35	0.032±0.004
A2I29	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	33	0.036±0.009
A3I35	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	31	0.040±0.007
P10I24	Turbid yellow color water around factory area	6.0	31	0.062±0.005
A1I27	Soil mixed palm pressed fiber	5.0	33	0.065±0.002
P7I13	Oil contaminated soil	3.0	42	0.116±0.005
A5I41	Oil contaminated dark color soil	5.0	32	0.119±0
U3I50	Waste water	4.0	53	0.122±0.003
U4I51	Brown color waste water	4.0	64	0.123±0.002
P5I07	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	37	0.175±0.003
D2I75	Oil contaminated brown color soil	4.0	35	0.219±0.015
From YM				
A6Y58	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	34	0.004±0.001
D2Y95	Oil contaminated brown color soil	4.0	35	0.004±0.001
D7Y109	Oil contaminated palm pressed fiber	7.0	31	0.010±0.001
A1Y40	Soil mixed palm pressed fiber	5.0	33	0.014±0.001
A2Y43	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	33	0.018±0.003
U3Y69	Waste water	4.0	53	0.024±0.001
P6Y16	Water around factory area contaminated oil	5.0	27	0.029±0
D8Y112	Oil contaminated turbid brown color water	6.0	36	0.030±0.002
A3Y48	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	31	0.031±0.003
P6Y24	Water around factory area contaminated oil	5.0	27	0.068±0.005
D5Y101	Oil contaminated brown color water	4.0	35	0.077±0.004
P4Y09	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	38	0.086±0.002
P6Y18	Water around factory area contaminated oil	5.0	27	0.088±0.002
U4Y73	Brown color waste water	4.0	64	0.098±0.003
D1Y89	Oil contaminated brownish color	6.0	34	0.101±0.002

	water			
U5Y75	Waste water	4.0	42	0.102±0.001
P2Y04	Floating oil on surface of yellow color water	4.0	45	0.118±0.009
A5Y54	Oil contaminated dark color soil	5.0	32	0.123±0.002
A6Y59	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	34	0.166±0.007
A4Y52	Oil contaminated palm pressed fiber	6.0	29	0.216±0.005
U2Y68	Oil contaminated water around factory area	7.0	41	0.248±0.002
P4Y12	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	38	0.406±0.008



4.2 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของยีสต์ผลิตไลเปสที่คัดเลือกได้เป็นตัวเร่ง

จากการนำยีสต์จำนวน 49 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) และน้ำมันปาล์ม จากข้อ 3.2.1 มาวัดความสามารถในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล อัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัม सबสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และวัดผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ พบว่า มียีสต์เพียง 16 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยเป็นยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร IMY สายพันธุ์ P5I07, P6I11, P7I13, P8I21, A2I29, U4I51, U8I68, D1I69, D1I73, D2I74 และ P1I189 และยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร YM คือสายพันธุ์ P2Y04, P6Y16, P6Y24, U5Y75 และ D8Y112 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงอาจจะไม่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเสมอไป จาก ตารางที่ 13 ซึ่งแสดงปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยา ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน จะเห็นได้ว่ายีสต์สายพันธุ์ P1I189 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ถึง 51.26±1.24 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ส่วนยีสต์สายพันธุ์ D1I69, A2I29 และ P5I07 ผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เท่ากับ 3.08, 2.11 และ 2.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.3 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของยีสต์ผลิตไลเปสที่คัดเลือกได้เป็นตัวเร่ง

จากการนำยีสต์จำนวน 49 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) และน้ำมันปาล์มจากข้อ 3.2.1 มาวิเคราะห์ความสามารถในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรด โอเลอิกบริสุทธิ์กับเมทานอล อัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัม सबสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) แล้ววัดปริมาณ โอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น พบว่า ยีสต์ทั้ง 49 สายพันธุ์ สามารถผลิต โอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ได้จากกรดไขมันคือเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยยีสต์สายพันธุ์

P11I89 ผลิตโอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 64.12±2.52 เปอร์เซ็นต์ และผลิตเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันได้สูงสุด เท่ากับ 51.26±1.24 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกยีสต์สายพันธุ์นี้มาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 13 การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลและการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดโอเลอิกจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของกรดไขมัน โอเลอิกและเมทานอลที่มียีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำมันปาล์มเป็นตัวเร่ง

Yeast strains	Hydrolysis activity (Unit/ml)	Methyl ester ± SD (%)	Oleic methyl ester ± SD (%)
P2I02	0.023±0.004	-	1.18±0.523
P4I03	0.028±0.003	-	1.28±0.523
P5I07	0.175±0.003	2.02 ± 0.120	1.06± 0.827
P6I11	0.009±0	0.45 ± 0.120	1.52 ± 0.007
P7I13	0.116±0.005	1.27 ± 0.007	1.01 ± 0.148
P8I20	0.029±0	-	1.42±0.233
P8I21	0.008±0.003	1.74 ± 0.127	1.07 ± 0.106
P10I24	0.062±0.005	-	0.87±0.021
A1I27	0.065±0.002	-	2.00±0.205
A2I29	0.036±0.009	2.11 ± 0.919	1.91 ± 0.014
A3I35	0.040±0.007	-	1.61±0.360
A3I37	0.016±0.005	-	1.22±0.205
A5I41	0.119±0	-	1.19±0.233
A7I46	0.014±0.001	-	1.04±0.056
U3I50	0.122±0.003	-	2.12±0.841
U4I51	0.123±0.002	0.37 ± 0.042	1.56 ± 0.028
U5I52	0.004±0.001	-	1.76±0.190
U6I57	0.021±0.003	-	1.57±0.261
U6I60	0.004±0.001	-	1.81±0.077
U8I64	0.010±0.001	-	1.02±0.014
U8I68	0.020±0.002	0.57 ± 0.014	1.43 ± 0.685
D1I69	0.007±0.001	3.08 ± 0.106	0.91 ± 0.063
D1I72	0.010±0.002	-	1.62±0.049
D1I73	0.010±0.002	1.85 ± 1.421	1.30 ± 0.106

D2I74	0.032±0.004	1.88 ± 0.784	1.57 ± 0.070
D2I75	0.219±0.015	-	1.99±0.014
P11I89	0.026±0.002	51.26 ± 1.247	64.1 ± 2.525
P2Y04	0.118±0.009	1.47 ± 0.197	1.55 ± 0.403
P4Y09	0.086±0.002	-	2.06±0.084
P4Y12	0.406±0.008	-	1.19±0.021
P6Y16	0.029±0	1.24 ± 0.247	2.64 ± 1.590
P6Y18	0.088±0.002	-	1.10±0.544
P6Y24	0.068±0.005	0.49 ± 0.021	1.91 ± 0.197
A1Y40	0.014±0.001	-	2.13±0.367
A2Y43	0.018±0.003	-	1.36±0.148
A3Y48	0.031±0.003	-	1.56±0.410
A4Y52	0.216±0.005	-	1.72±0.367
A5Y54	0.123±0.002	-	0.85±0.197
A6Y58	0.004±0.001	-	2.13±0.254
A6Y59	0.166±0.007	-	1.45±0.247
U2Y68	0.248±0.002	-	1.40±0.007
U3Y69	0.024±0.001	-	1.63±0.219
U4Y73	0.098±0.003	-	1.01±0.325
U5Y75	0.102±0.001	1.56 ± 0.417	0.96 ± 0.268
D1Y89	0.101±0.002	-	1.70±0.070
D2Y95	0.004±0.001	-	0.99±0.007
D5Y101	0.077±0.004	-	1.53±0.445
D7Y109	0.010±0.001	-	0.88±0.176
D8Y112	0.030±0.002	1.84 ± 1.187	1.22 ± 0.021

5. การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์

เมื่อทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ P11I89, D1I69, A2I29 และ P5I07 โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนบริเวณ 28S rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nr database ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับเบสของ 28S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ P11I89, D1I69, A2I29 และ P5I07 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Rhodotorula mucilagenosa* (GenBank accession number EU637076.1), *Candida tropicalis* QD 8.1 (GenBank accession number EU543667.1), *Issstchenkia orientalis* KC5 (GenBank accession number EF635636.1) และ *Issstchenkia orientalis*

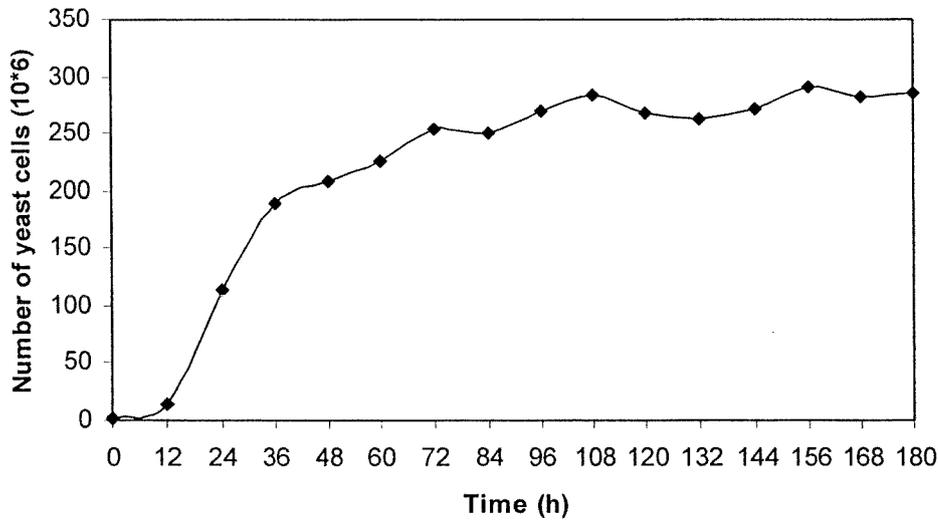
isolate 181 (GenBank accession number EF635636.1) โดยมีความเหมือน (homology) เท่ากับ 99 (523/525 bp), 100 (546/546 bp), 99 (531/536 bp) และ 99 (541/542 bp) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจากผลการจัดจำแนก ยีสต์สายพันธุ์ที่ทำการคัดแยกมาได้มีรายงานว่ามีการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดย Wang และคณะ (2007) ทำการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำทะเล, ตะกอนดิน, โคลน, กระเพาะของปลาทะเล และสาหร่ายทะเล พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมาเป็นเอนไซม์ที่เกาะบริเวณผิวเซลล์ (cell bound) ในส่วนของ Costas และคณะ (2004) ศึกษาความสามารถของยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* พบว่า ยีสต์สายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์ไลเปสแบบ extracellular มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี tributyrin เป็นแหล่งคาร์บอน และการศึกษาของ Haba และคณะ (2000) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยลงเมื่อมีน้ำมันมะกอกที่ใช้แล้วปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

6. การศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa*

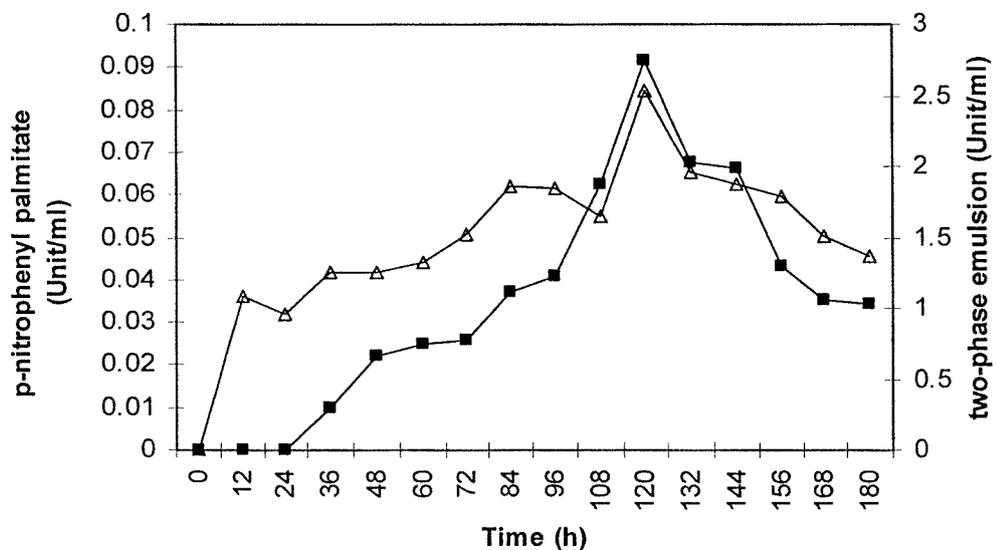
ยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั่วไป ตามแหล่งดิน แหล่งน้ำ ตะกอนดิน โดยโคโลนีจะมีลักษณะกลม สีส้มแดง สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ ไม่มีการสร้างเส้นใย (Barnett *et al.*, 2000) จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* (ภาพที่ 6) โดยทำการเลี้ยงในอาหาร IMY เป็นเวลา 180 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อทำการนับจำนวนเซลล์และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีวิเคราะห์ของ Kademi และคณะ (2000) และวิธี two-phase emulsion ทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่า ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเป็นช่วง Lag phase ซึ่งเป็นช่วงที่ยีสต์ยังไม่เพิ่มจำนวน มีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ แต่เซลล์จะว่องไว และสังเคราะห์โปรตีนโทพลาซึมใหม่ รวมทั้งเอนไซม์ โคเอนไซม์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เพื่อให้เพียงพอต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ หลังจากชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 72 การเจริญเติบโตของยีสต์จะเข้าสู่ระยะ Log phase ซึ่งยีสต์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์ว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว หลังจากชั่วโมงที่ 72 เป็นต้นไป ยีสต์เริ่มเข้าสู่ Stationary phase คือมีการเจริญเติบโตที่คงที่ มีจำนวนเซลล์ในแต่ละชั่วโมงไม่แตกต่างกันมากนัก

นอกจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Kademi และคณะ (2000) และวิธี two-phase emulsion ซึ่งการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนั้นเป็นการวิเคราะห์ส่วนของ extracellular lipase เพื่อบ่งบอกการผลิตเอนไซม์ พบว่า เมื่อใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ตั้งแต่วินาที 36 มีค่าเท่ากับ 0.0096 ± 0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 มีค่าเท่ากับ 0.092 ± 0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่าลดลง โดยชั่วโมงที่ 180 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.034 ± 0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ในส่วนของการใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรทในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี two-

phase emulsion (ภาพที่ 7) พบว่า สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 2.534 ± 0.044 หน่วยต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 6 การเจริญของ *Rhodotorula mucilagenosa* ในอาหาร Isolation Medium for Yeast ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhodotorula mucilagenosa* ที่เลี้ยงในอาหาร Isolation Medium for Yeast ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (กิจกรรมเอนไซม์วิเคราะห์โดยวิธี p-nitrophenyl palmitate, และ วิธี two-phase emulsion method,)

จากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งสองวิธี จะเห็นได้ว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมง ที่ 120 เช่นเดียวกัน โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดวัดได้ระหว่างที่ยีสต์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase ดังนั้นในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ด้วย

ปฏิกิริยา ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง จะทำการเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 120 เนื่องจากที่ชั่วโมงนี้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เซลล์ *Rhodotorula mucilagenosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

7.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ดังแสดงผลในตารางที่ 14 โดยค่าสaponิฟิเคชันใช้เป็นตัวชี้บ่งขนาดของโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมัน จากค่าสaponิฟิเคชันสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ได้เท่ากับ 867.97, 867.50 และ 910.52 ส่วนการหาปริมาณสารเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในน้ำมันด้วยค่าเปอร์ออกไซด์นั้น พบว่า น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์มีค่าเปอร์ออกไซด์สูงสุด รองลงมา คือน้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ตามลำดับ นอกจากนี้ค่าไอโอดีน ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ว่าน้ำมันมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบมากน้อยเพียงใด พบว่า น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว มีค่าไอโอดีนเท่ากับ 53.65, 48.20 และ 52.91 ในส่วนของค่ากรดที่วิเคราะห์ได้เป็นตัวชี้บ่งว่าไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในน้ำมันถูกสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสได้เป็นกรดไขมันอิสระได้มากน้อยเพียงใด จะเห็นได้ว่าน้ำมันปาล์มดิบมีค่ากรดสูงสุดแสดงว่าโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ถูกสลายตัวได้เป็นกรดไขมันอิสระมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันปาล์มใช้แล้วและน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ นอกจากนี้ปริมาณน้ำในน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว พบว่ามีปริมาณมากที่สุดถึง 2.99 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มดิบ

จากการวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ในส่วนของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว มีกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมา เป็นกรดปาล์มมิติกและกรดลิโนเลอิก ส่วนน้ำมันปาล์มดิบมีกรดโอเลอิก และกรดปาล์มมิติก เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกัน แต่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ถ้ากรดไขมันส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว คือ กรดโอเลอิกและกรดลิโนเลอิก จะทำให้น้ำมันเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2541) ส่วนน้ำมันปาล์มดิบมีปริมาณของกรดโอเลอิกและกรดปาล์มมิติกใกล้เคียงกัน นอกจากนั้นยังมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบหลักใกล้เคียงกันอีกด้วย จึงทำให้น้ำมันปาล์มดิบมีลักษณะเป็นของเหลวปะปนอยู่กับของแข็งที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 14 คุณสมบัติทางเคมีและองค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว

Property	Refined palm oil	Crude palm oil	Waste palm oil
Saponification value	193.90±3.67	194.05±3.54	184.84±0.24
Peroxide value	3.15±0.10	2.84±0.03	0.58±0.09
Iodine value	53.65±0.02	48.20±1.22	52.91±0.18
Acid value	0.60±0.02	2.55±0.00	1.24±0.24
Molecular weight (g/mol)	867.97	867.50	910.52
Water (%)	1.38±0.02	1.55±0.01	2.99±0.02

ตารางที่ 15 องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว

Fatty acid composition	Refined palm oil		Crude palm oil		Waste palm oil	
	g/kg	(%)	g/kg	(%)	g/kg	(%)
Myristic acid (14:0)	9.23	0.90	22.89	2.38	12.19	1.20
Palmitic acid (16:0)	352.57	36.50	355.74	37.69	362.22	37.26
Stearic acid (18:0)	41.71	4.10	44.10	4.42	40.60	3.91
Oleic acid (18:1)	401.32	43.68	341.94	37.58	400.23	43.14
Linoleic acid (18:2)	101.89	10.92	85.67	9.41	89.03	9.41
Linolenic acid (18:3)	2.42	0.16	3.23	0.25	2.14	0.14

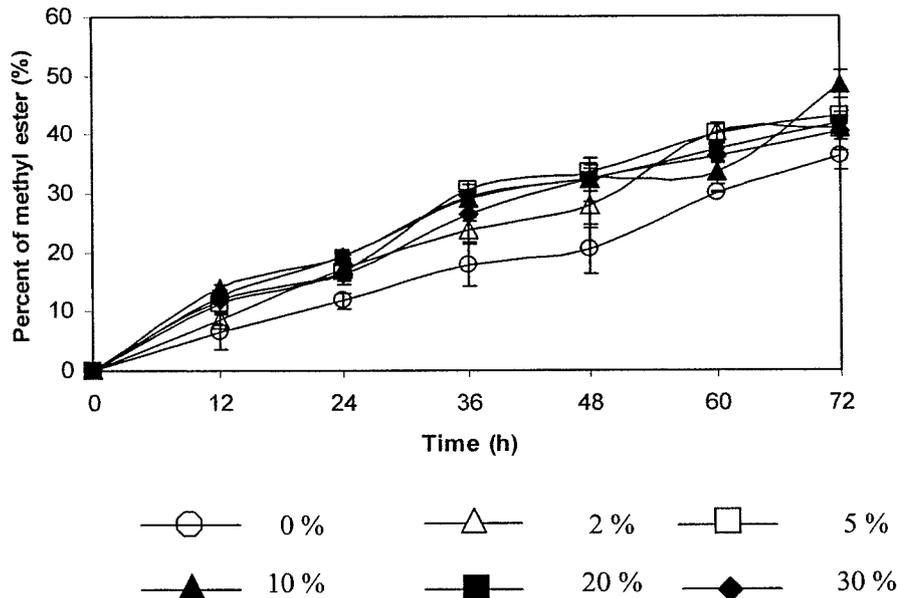
7.2 ผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัม सबสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.982 ยูนิต์ต่อกรัม सबสเตรท มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลเป็น सबสเตรท ผสมกันในอัตราส่วน โมล 1:3 โดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 5, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก सबสเตรท ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำในระบบ 1.38, 3.38, 6.38, 11.38 และ 31.38 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก सबสเตรท ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อ

เพิ่มปริมาณน้ำในช่วง 0-10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จะลดลง (ภาพที่ 8) โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 48.34 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เหลืออยู่ 16.11, 1.24, 18.44, 4.11 และ 13.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 9-11) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการเติมน้ำในปฏิกิริยา 10 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด

จากรูปแบบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่ยังคงมีกิจกรรมอยู่ น้ำมีผลทำให้กิจกรรมดำเนินไปได้และมีบทบาทในการควบคุมกิจกรรม ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (Foresti *et al.*, 2005) การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสเกิดขึ้นระหว่างผิวสัมผัสของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic phase) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic phase) การมีพื้นที่สัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมันมากขึ้นจะทำให้เอนไซม์เข้าไปจับกับสับสเตรทหรือน้ำมันได้ดีขึ้น เนื่องจากเอนไซม์มีคุณสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ดี แต่สับสเตรทหรือน้ำมันที่ใช้ทำปฏิกิริยาไม่ละลายน้ำ เมื่อนำมาผสมเข้าด้วยกันภายในระบบก็จะมีสองส่วน คือส่วนที่ชอบน้ำมัน (lipophilic phase) ประกอบด้วยเอซิลกลีเซอรอลกับกรดไขมัน และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic phase) ดังนั้นการเติมน้ำหรือการมีน้ำในระบบจะเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมันให้มากขึ้น จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปจับกับสับสเตรทหรือน้ำมันได้ดีขึ้น (Hama *et al.*, 2007) ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสไม่จำเป็นต้องมีน้ำในปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามการควบคุมปริมาณน้ำก็ยังเป็นสิ่งสำคัญ ด้วยเหตุผลที่ว่า น้ำเปรียบเสมือนตัวหล่อลื่นที่ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ยังคงกิจกรรมอยู่ได้ โดยในการทดลองที่เติมน้ำ 2 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมน้ำ จะเห็นได้ว่าแต่ละชั่วโมงในระหว่างการทำปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าการทดลองที่มีการเติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ เช่น ในชั่วโมงที่ 36 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของการทดลองที่เติมน้ำ 2 เปอร์เซ็นต์และไม่เติมน้ำ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 23.86 และ 17.76 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการทดลองที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ถึง 29.06 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในกลไกการทำปฏิกิริยาในหลายๆ ปฏิกิริยาที่มีสาเหตุทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ดังเช่นในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซึ่งมีเมทานอลเป็นสับสเตรท จะเห็นได้ว่าการทดลองที่มีการเติมน้ำ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นในช่วงระหว่างการทำปฏิกิริยานั้น มีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่เติมน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นที่ชั่วโมงที่ 12, 24, 36 และ 48 มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 11.38, 16.50, 30.71 และ 33.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นที่ชั่วโมงที่ 12, 24, 36 และ 48 เท่ากับ 13.98, 19.19, 29.06 และ 32.52 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนการทดลองที่มีการเติมน้ำ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 60 มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 40.08 และ 33.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 72 กลับพบว่าที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 48.34 ซึ่งปริมาณสูงกว่าที่เติมน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เพียง 43.20 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองที่เกิดขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าเมทานอลที่เติมลงไปเพื่อเป็นสับสเตรทนั้นไปทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เพราะเมื่อใช้เวลานานในการทำปฏิกิริยามากขึ้น โอกาสที่เอนไซม์จะถูกทำลายก็มีมาก

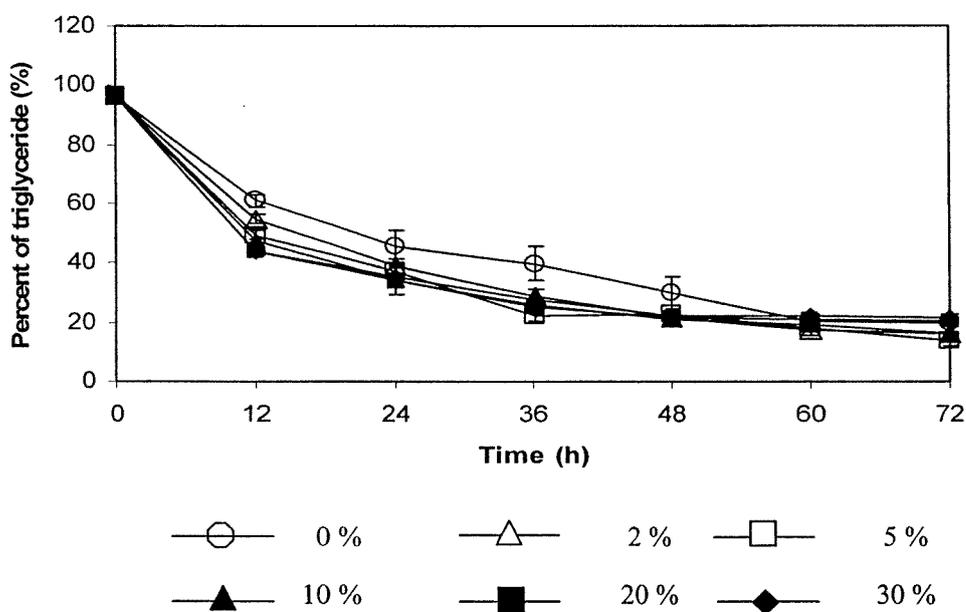
ขึ้น จึงทำให้ในการทดลองที่เติมน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 72 ในขณะที่การทดลองที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์นั้น ปริมาณน้ำที่เพิ่ม แทนที่จะเข้าไปช่วยลดการเสียดสภาพของเอนไซม์เมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นการเกิดเป็นผลิตภัณฑ์จึงยังเกิดขึ้นต่อไป (Salis *et al.*, 2005)



ภาพที่ 8 ผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (0.982 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

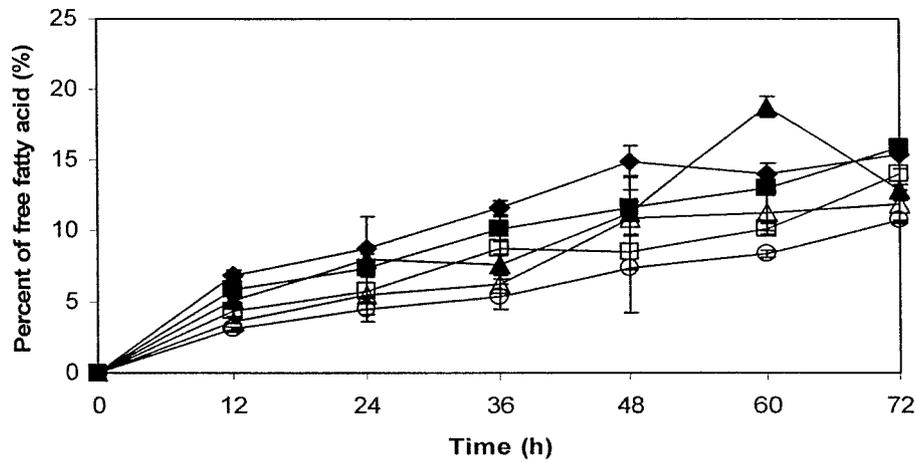
ในการทดลองที่มีการเติมน้ำ 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 72 มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 48.34, 41.93 และ 40.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเมื่อมีน้ำมากขึ้น น้ำที่อยู่ในระบบจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มากขึ้น ดังนั้นจึงอาจจะไปลดปริมาณการเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์ เห็นได้จากปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ 12 ชั่วโมงแรก ที่มีการเติมน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์และ 30 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่เพียง 43.86 และ 44.05 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่ 47.36 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในทั้งสามการทดลองใกล้เคียงกัน จนเมื่อถึงชั่วโมงที่ 60 และ 72 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ของการทดลองที่มีการเติมน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์ เหลืออยู่ 21.12 และ 20.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่เติมน้ำ 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่ 21.90 และ 21.78 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการทดลองที่มีการเติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่เพียง 18.93 และ 15.88 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9) ในชั่วโมงที่ 60 และ 72 รวมถึงปริมาณ 1-2 ไคกลีเซอไรด์, 1-3 ไคกลีเซอไรด์ และ โมโนกลีเซอไรด์ ก็มีปริมาณที่เหลือน้อยกว่าในการทดลองที่เติมน้ำ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10-11) ที่เป็นเช่นนี้เพราะเมื่อมีปริมาณน้ำในระบบมาก น้ำจะช่วยให้อนุภาคของเอนไซม์รวมตัวกันและทำให้การกระจายตัวของสับสเตรทเกิดขึ้นน้อยลง การสัมผัสกันระหว่างสับสเตรทและเอนไซม์จะเป็นไปได้ยากขึ้น การเกิดปฏิกิริยาทั้งไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจึงเกิดได้

น้อยลง (Salis *et al.*, 2005) นอกจากนั้น ปริมาณของกรดไขมันอิสระจะเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำในระบบมากขึ้น ในการทดลองที่เติมน้ำ 30, 20 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แนวโน้มของปริมาณกรดไขมันอิสระจะสูงขึ้นมากกว่าในระบบที่เติมน้ำ 5, 2 และไม่เติมน้ำ แสดงให้เห็นว่าเมื่อน้ำมากขึ้น ส่งผลให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดมากขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Kamini และ Iefuji (2001) ศึกษาผลของน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสที่มีสับสเตรทระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 (โมล:โมล) มีเอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus* spp. 2000 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในระบบ แต่ปริมาณกรดไขมันอิสระซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะสูงขึ้น โดยที่เติมน้ำ 13 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท ปริมาณกรดไขมันอิสระเท่ากับ 24.0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเติมน้ำถึง 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท กรดไขมันอิสระจะมีปริมาณสูงถึง 42.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกับการทดลองของ Kaieda และคณะ (1999) ศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมของ น้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล ในอัตราส่วนโมล 1:1 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Rhizopus oryzae* 210 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเติมสารละลายเอนไซม์ปริมาณ 1.2-9.0 มิลลิลิตร (ปริมาณน้ำ 4-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท) พบว่า ที่ปริมาณน้ำ 15 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม Li และคณะ (2007) ศึกษาผลของน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้น้ำมันเรพซิดและเมทานอลเป็นสับสเตรท ในอัตราส่วนโมล 1:4 มีการเติม *tert*-บิวทานอลในระบบ และใช้ตัวเซลล์ตรึงรูปจาก *Rhizopus oryzae* IFO 4697 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า เมื่อเติมน้ำเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 68 เปอร์เซ็นต์

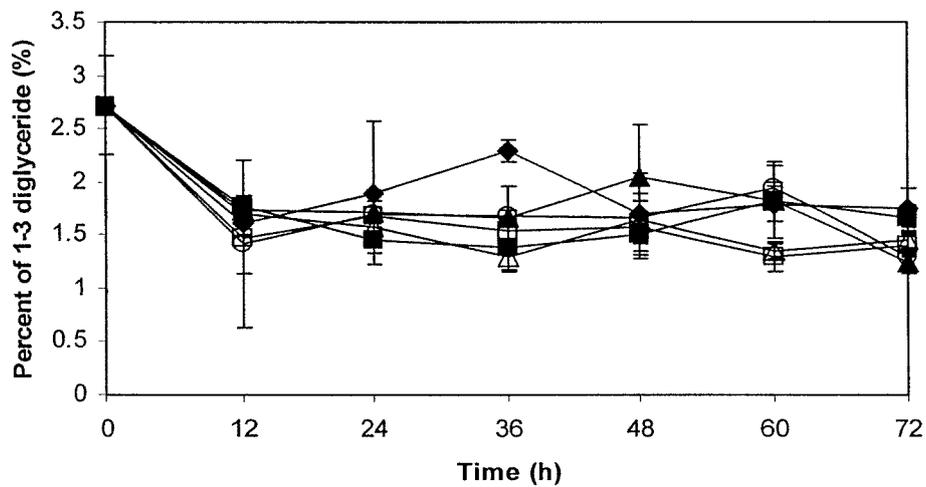


ภาพที่ 9 ผลของปริมาณน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอล อัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (0.982 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)

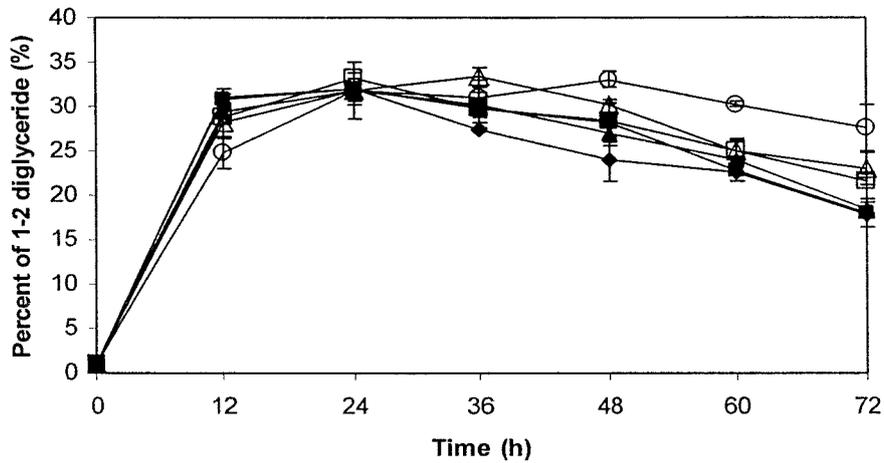


(B)

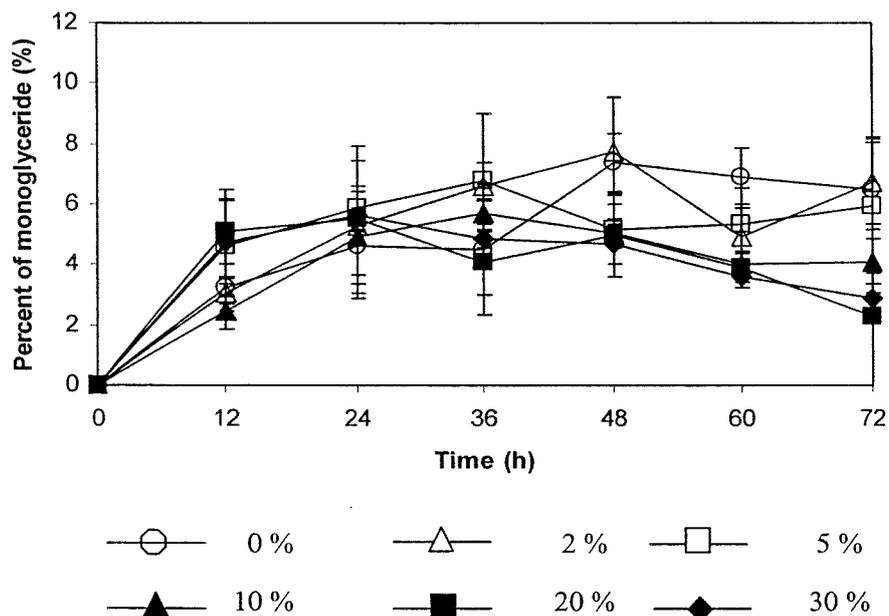


ภาพที่ 10 ผลของปริมาณน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมัน (A) และ 1-3 ไดกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอล อัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (0.982 หน่วย/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)



(B)

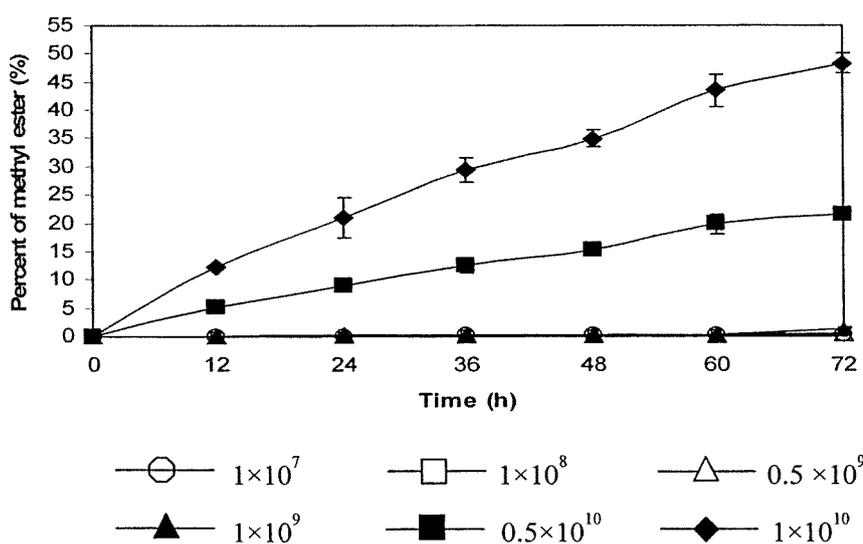


ภาพที่ 11 ผลของปริมาณน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1-2 ไดกลีเซอไรด์ (A) และ โมโนกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลที่มีอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (0.982 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

7.3 ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 1×10^{10} , 0.5×10^{10} , 1×10^9 , 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ในการเร่งปฏิกิริยาของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล อัตราส่วนโมล 1:3 และเติม

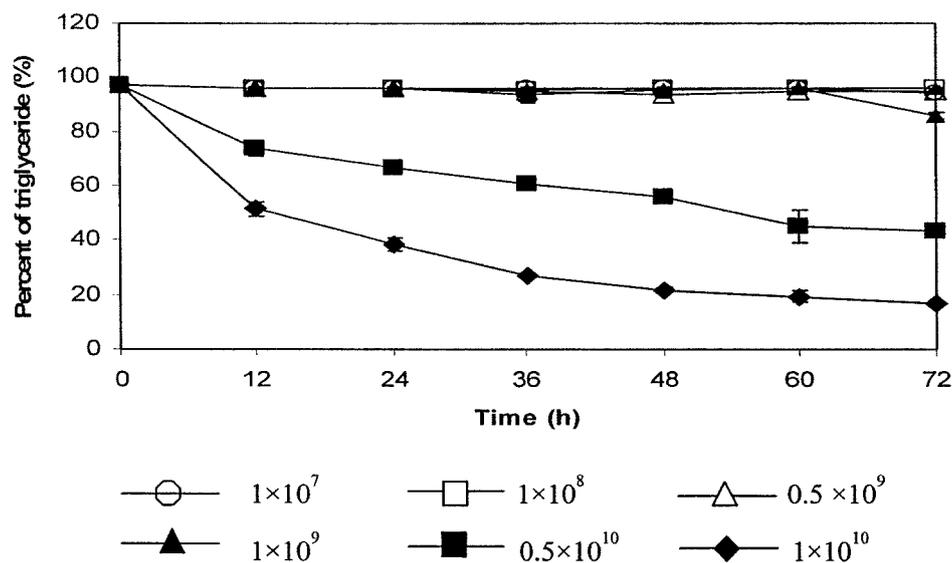
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท คิดเป็นปริมาณ น้ำในระบบ 11.38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 1.27 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท บ่มที่ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า การใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัม สับสเตรทในการเร่งปฏิกิริยา สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุด 48.32 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) แต่ การใช้ปริมาณเซลล์ 0.5×10^{10} , 1×10^9 , 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีค่า กิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.634, 0.126, 0.063, 0.012 และ 0.0012 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ใน การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพียง 21.62, 1.38, 0.46, 0.48 และ 0.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้นก็คือการเพิ่มปริมาณของ เอนไซม์ไลเปสที่จะเข้าไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันนั่นเอง



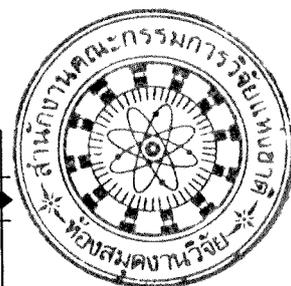
ภาพที่ 12 ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.267, 0.634, 0.126, 0.063, 0.012 and 0.0012 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นอกจากนี้ปริมาณของเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาก็มีผลต่อการย่อยไตรกลีเซอไรด์ใน ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยที่ใช้ปริมาณเซลล์ 1×10^{10} , 0.5×10^{10} , 1×10^9 , 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่ 17.02, 43.11, 85.60, 94.62, 95.87 และ 94.44 (ภาพที่ 13) จะเห็นได้ชัดเจนว่าที่ใช้ปริมาณเซลล์ 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท มีการย่อยไตรกลีเซอไรด์น้อยมาก ดังนั้นการเพิ่มอัตราส่วนปริมาณ เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทให้มากขึ้นก็จะสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ ฟิเคชัน ได้ดีขึ้น ถึงแม้ว่าการเพิ่มปริมาณเซลล์จะเป็นการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ซึ่งส่งผลให้มีการเร่ง ปฏิกิริยาให้สูงขึ้น แต่ในทางปฏิบัติการเตรียมเซลล์ที่มากกว่า 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทนั้นยังมี ข้อจำกัด ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ คือ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ที่เวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณของไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์

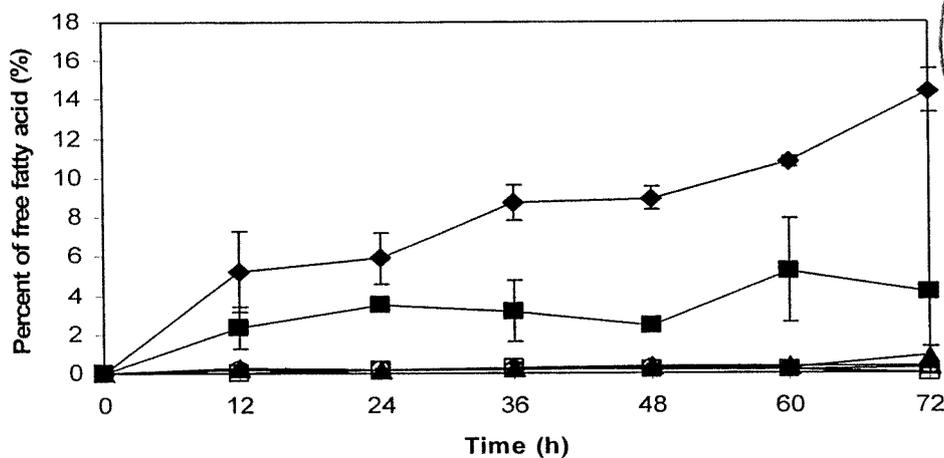
และกรดไขมันอิสระ ที่เหลืออยู่มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับผลการศึกษาปริมาณน้ำ คือ 17.02, 1.36, 15.44, 3.42 และ 14.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 13-15 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chen และคณะ (2009) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Candida antarctica* ที่ผ่านการตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันพืชและเมทานอล โดยเติมปริมาณเอนไซม์ในช่วง 5-35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมัน ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 222.5 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้นจะทำให้โมเลกุลของสับสเตรทถูกจับกับบริเวณเร่ง (active site) ได้มากขึ้น แต่เมื่อเติมปริมาณเอนไซม์ในช่วง 25-35 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นนั้นมีปริมาณใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเติมเอนไซม์ 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมัน จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามากที่สุด และเช่นเดียวกับผลการทดลองของ Kose และคณะ (2002) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันเมล็ดฝ้ายและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:3 (โมล : โมล) มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส 30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 83.6 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไลเปสเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท ความสามารถในการผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง นอกจากนั้น Qin และคณะ (2008) ศึกษาการใช้ whole-cell ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus chinensis* 24.5 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในอัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อเมทานอล 1:3 (โมล : โมล) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้มากกว่า 86 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ยังคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสมากขึ้น



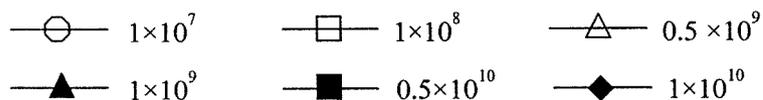
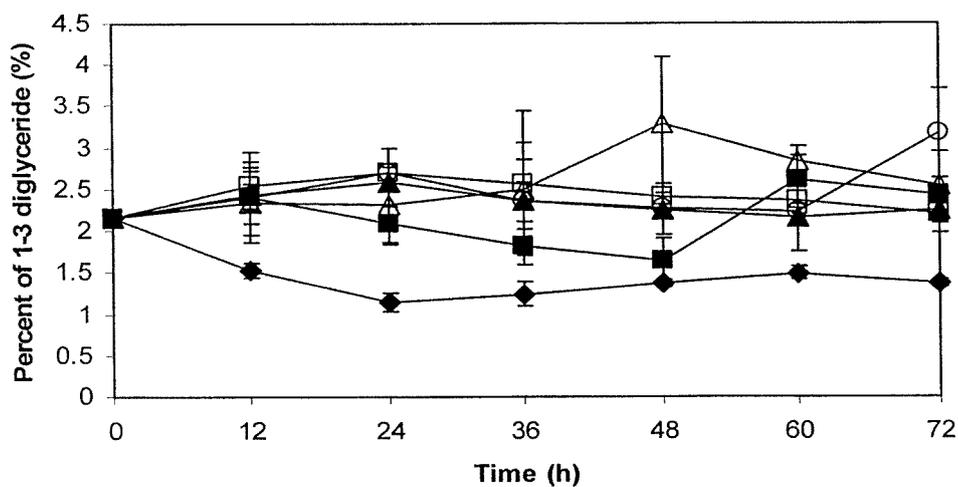
ภาพที่ 13 ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในปฏิกิริยาทรานเอสเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.267, 0.634, 0.126, 0.063, 0.012 and 0.0012 ยูนิต/ก สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



(A)

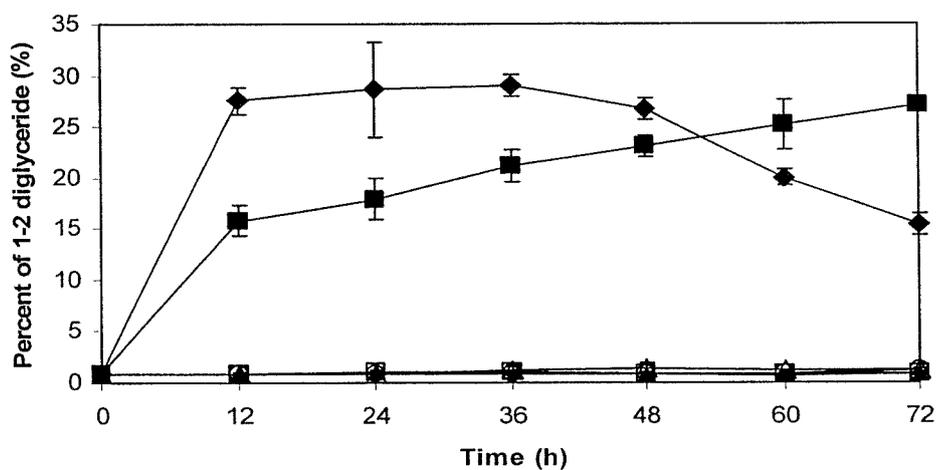


(B)

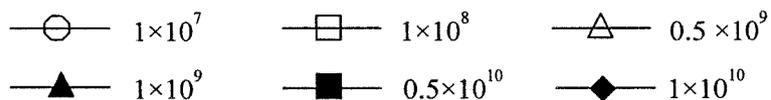
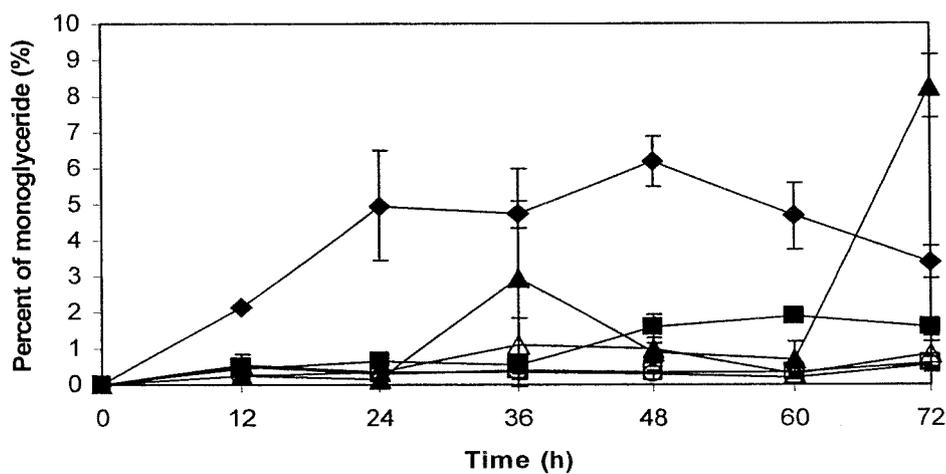


ภาพที่ 14 ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมัน (A) และ 1-3 ไดกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.267, 0.634, 0.126, 0.063, 0.012 and 0.0012 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)



(B)



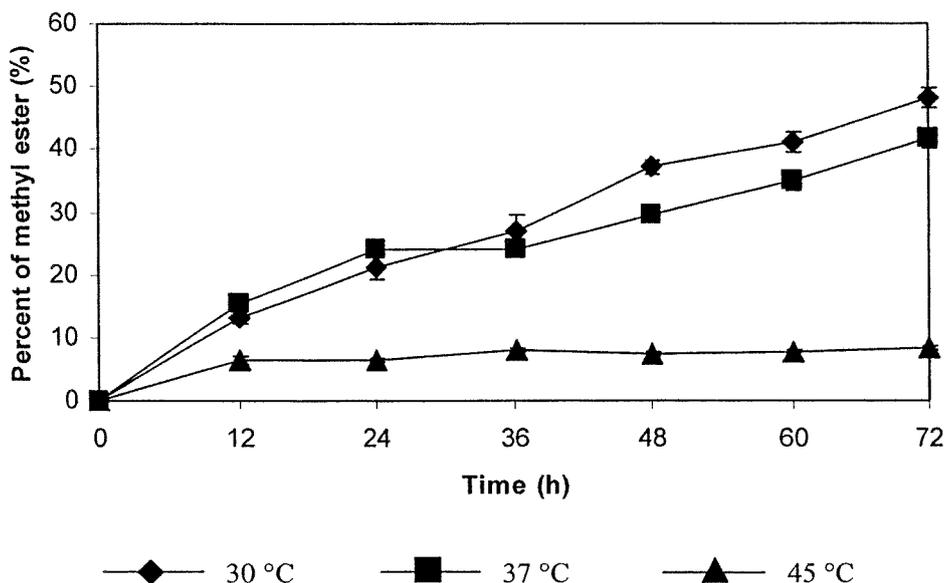
ภาพที่ 15 ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1-2 ไดกลีเซอไรด์ (A) และ โมโนกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.267, 0.634, 0.126, 0.063, 0.012 and 0.0012 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าการทดลองนี้กิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยายังมีค่าต่ำกว่าที่ใช้ในงานวิจัยอื่นอย่างมาก คือมีค่ากิจกรรมเพียง 1.267 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรท ในขณะที่การทดลองอื่นๆ ใช้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมในระดับสูงถึง 24.5-225.5 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรท จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์สูงกว่าการทดลองนี้มาก

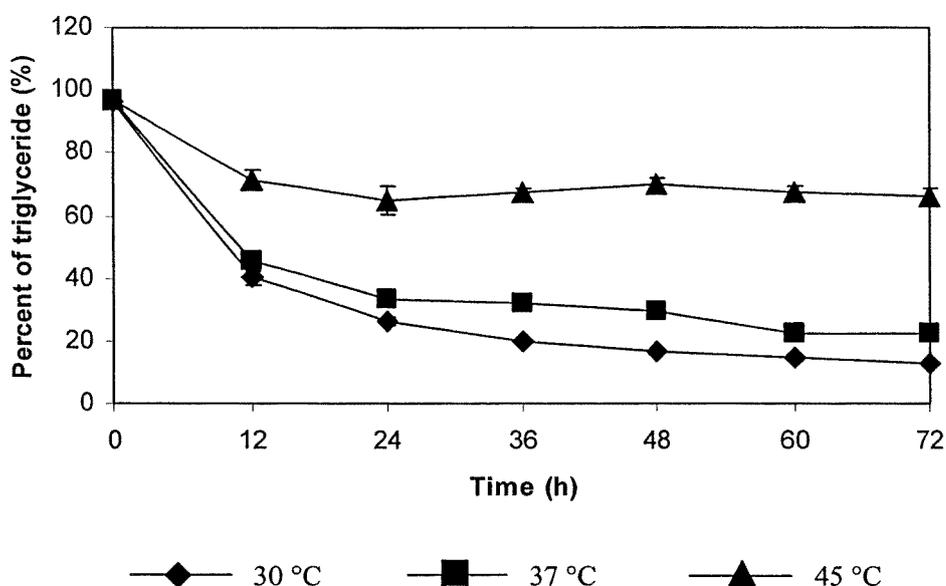
7.4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 1.394 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทรานสเอสเทอร์ฟิเคชัน มีสับสเตรท คือ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:3 (โมล : โมล) เติมน้ำตาลละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2), 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเติมน้ำตาลละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 45 และ 37 องศาเซลเซียส ได้เมทิลเอสเทอร์ 8.38 และ 41.59 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิห้อง สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุด คือ 48.17 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16) โดยทั่วไปปฏิกิริยาเคมีจะทำงานได้ดีเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์ซึ่งเป็นสารประกอบ โปรตีนมักไม่ค่อยคงตัวต่อความร้อนทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานได้ดีแตกต่างกัน (สารโวจน์ สิริคันสนีกุล, 2538) นอกจากนั้นปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ ที่เหลืออยู่ในการทดลองที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 12.76, 1.39, 19.21, 4.50 และ 13.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 17-19) ดังนั้นอุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) คืออุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kamini และ Iefuji (2001) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยามาธานโอไลซิสของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus* spp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง และที่เวลา 96 ชั่วโมง ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ก็ลดลงเช่นเดียวกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่แตกต่างจากผลการทดลองของ Sanchez และ Vasudevan (2006) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยามาธานโอไลซิสของน้ำมันมะกอก ในอัตราส่วน 1:4 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงขึ้นและสามารถผลิตได้ดีที่สุด 59.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 70 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Kose และคณะ (2002) ซึ่งศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยามาธานโอไลซิสของน้ำมันเมล็ดฝ้าย ในอัตราส่วน 1:4 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปจาก *Candida antarctica* ในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส พบว่า การผลิตเมทิลเอสเทอร์เพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 91.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ส่วน Du และ

คณะ (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส มีน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล ในอัตราส่วน โมล 1:4 เป็นสับสเตรท โดยมีเอนไซม์ไลเปสตรังรูปจาก *Thermomyces lanuginosus* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด แต่เมื่อนำเอนไซม์ตรังรูปมาใช้ซ้ำจะต้องทำปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส จึงยังคงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงเช่นเดิม

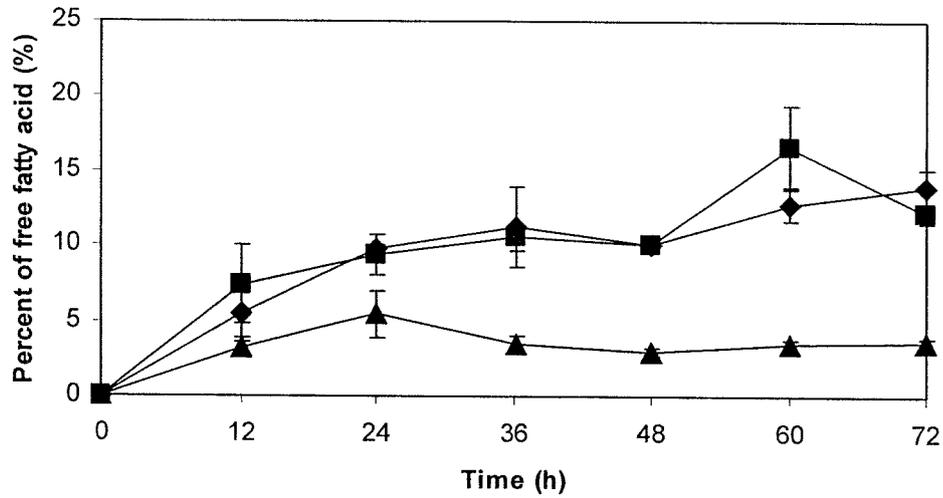


ภาพที่ 16 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.394 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

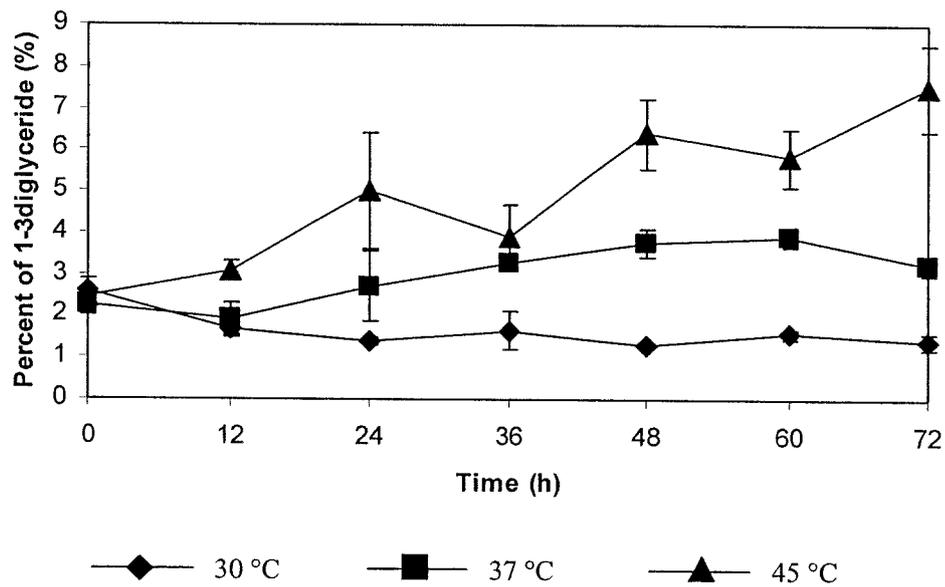


ภาพที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.394 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)

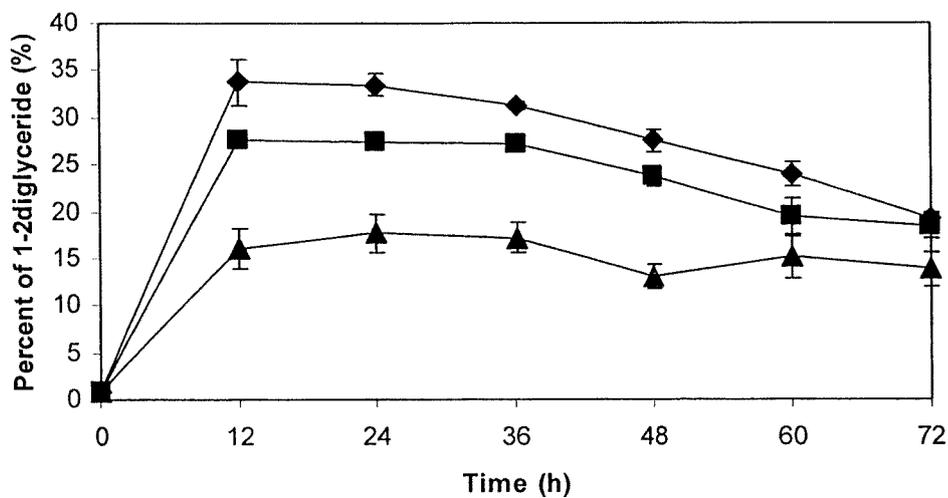


(B)

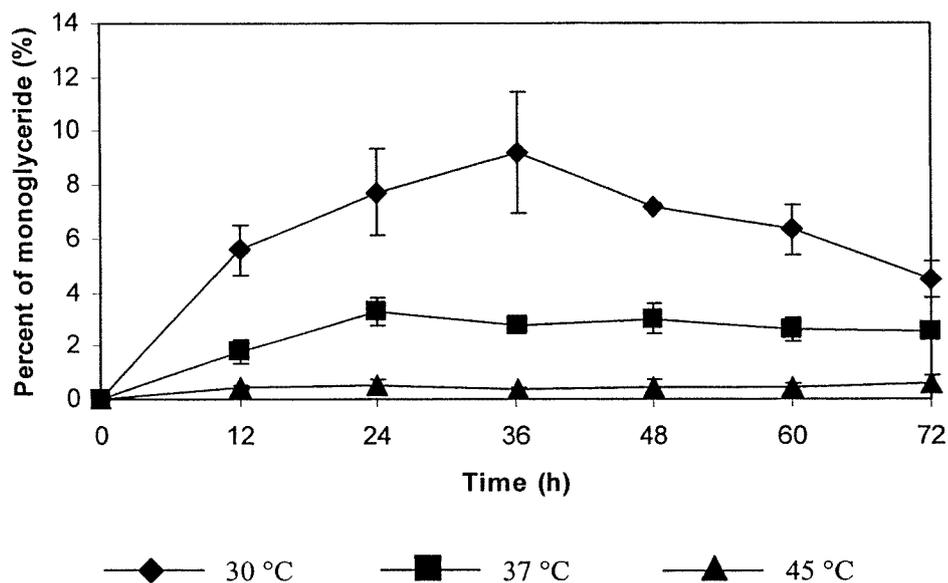


ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมัน (A) และ 1-3 ไดกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.394 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)



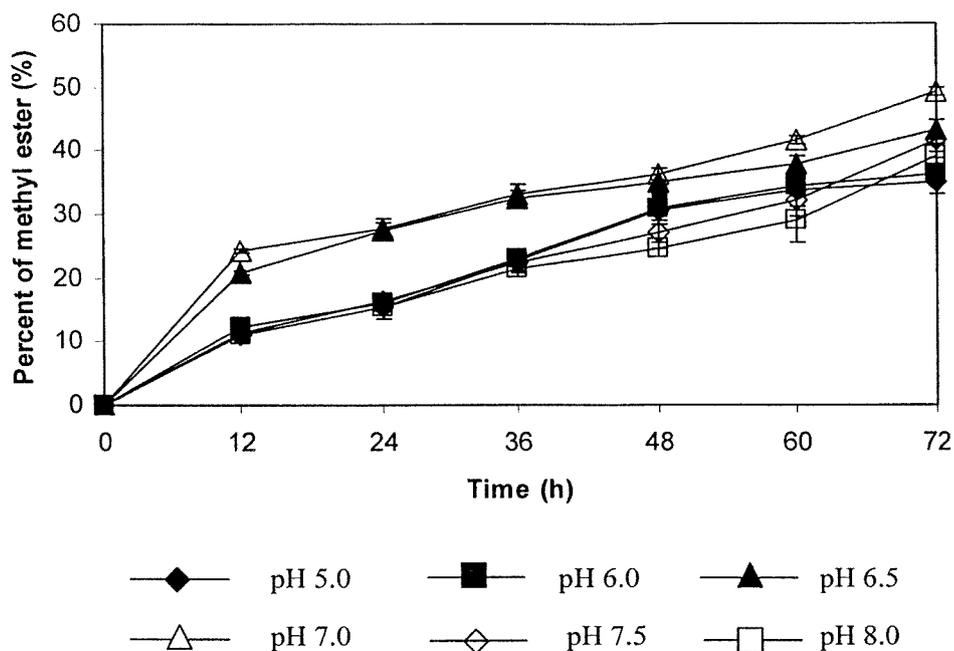
(B)



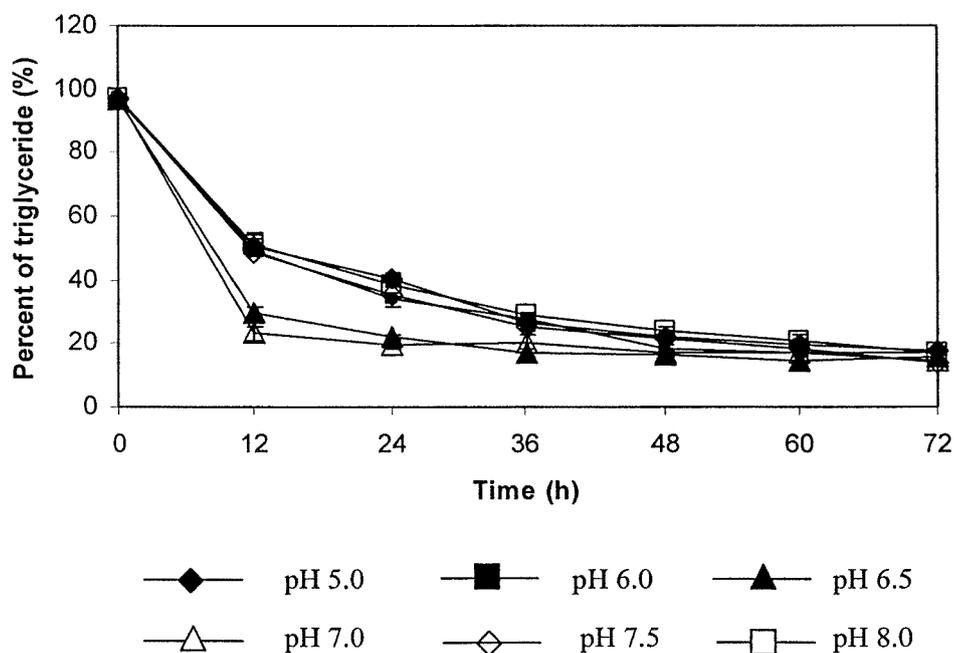
ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1-2ไดกลีเซอไรด์ (A) และ โมโนกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.394 หน่วย/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

7.5 ผลของพีเอชต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1.346 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลเป็นสับสเตรท อัตราส่วน โมล 1:3 เติมสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท บ่มที่ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ที่พีเอช 5.0 และ 6.0 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นเพียง 35.10 และ 36.42 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอช 6.5 และได้ปริมาณสูงที่สุดที่พีเอช 7.0 คือ 49.28 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 20) แต่เมื่อเติมสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 7.0 ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด การย่อยไตรกลีเซอไรด์ไปเป็น 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เกิดขึ้นได้ดีที่พีเอช 7.0 (ภาพที่ 21-23) แสดงว่ามีการผันสับสเตรทให้เกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ดี โดยเห็นได้จากปริมาณ 1-2 ไคกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ คือ 15.68 และ 2.97 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 23) ซึ่งเหลืออยู่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชอื่นๆ ดังนั้น การเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จึงเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์และการผลิตเมทิลเอสเทอร์ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกัน เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* LA-62 ทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0 ส่วนเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ATCC 14380 ทำงานได้ดีที่พีเอช 7.8 (Vakhul and Kour, 2006) การที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอชแตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นเพราะว่าความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรท และในการเร่งปฏิกิริยาอาจขึ้นอยู่กับประจุของเอนไซม์หรือของสับสเตรท ที่พีเอชต่ำหรือสูงเกินไปมักทำให้ประจุเปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากัน นอกจากนี้ที่พีเอชสูงมากหรือต่ำมาก อาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปด้วย (ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, 2542) โดยส่วนใหญ่แล้ว เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไป จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.6- 8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง จากการทดลองของ Ciafardini และคณะ (2006) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันมะกอก พบว่า พีเอชที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Williopsis californica* 1639 และ *Saccharomyces cerevisiae* คือ พีเอช 6 และ 7.5 ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับ Liu และคณะ (2008) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันมะกอกด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Aureobasidium pullulans* พบว่าที่พีเอช 8.5 เหมาะสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไลเปสมากที่สุด

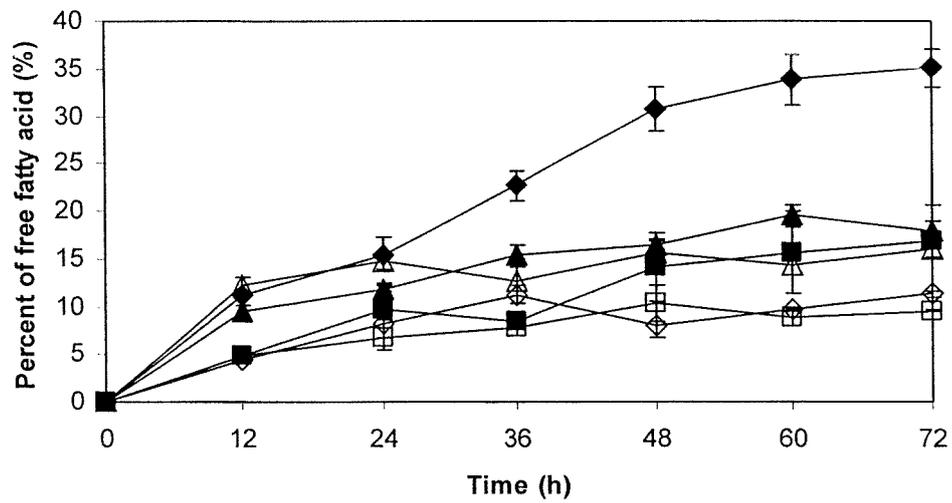


ภาพที่ 20 ผลของพีเอชต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.346 ยูนิต/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

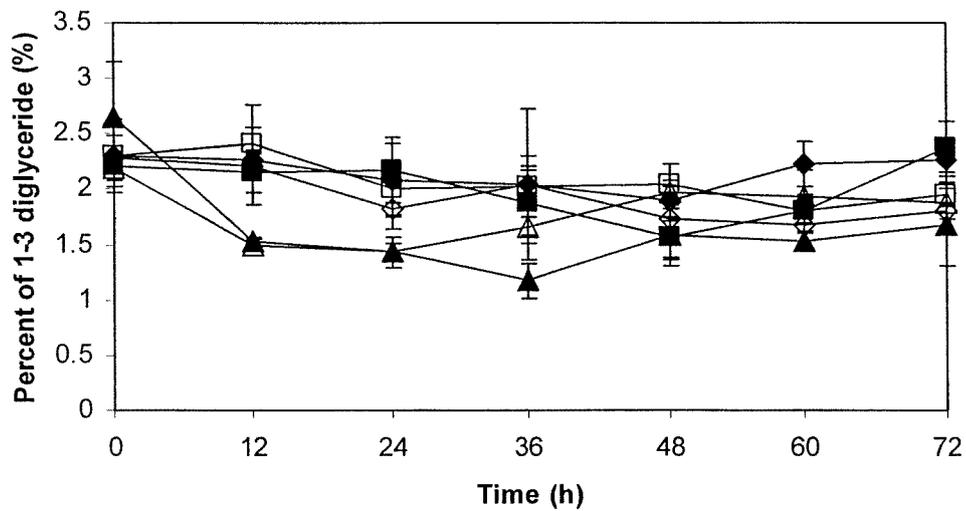


ภาพที่ 21 ผลของพีเอชต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.346 ยูนิต/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)



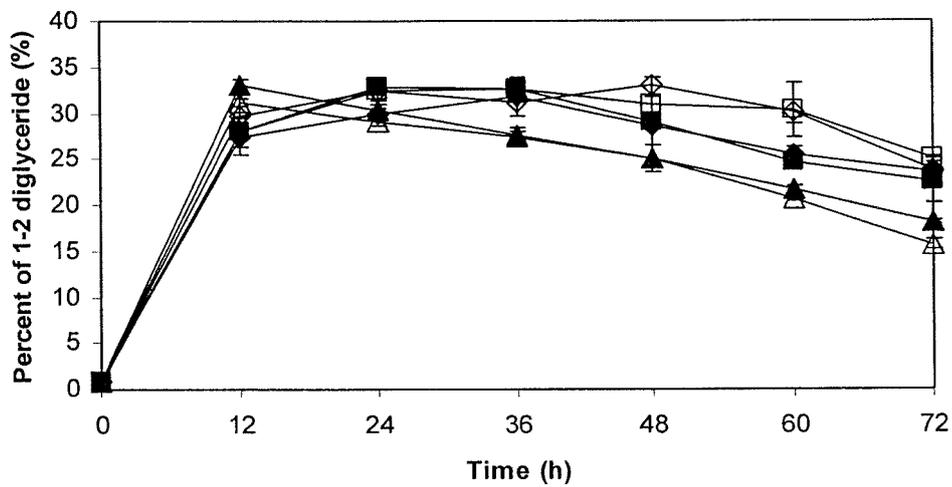
(B)



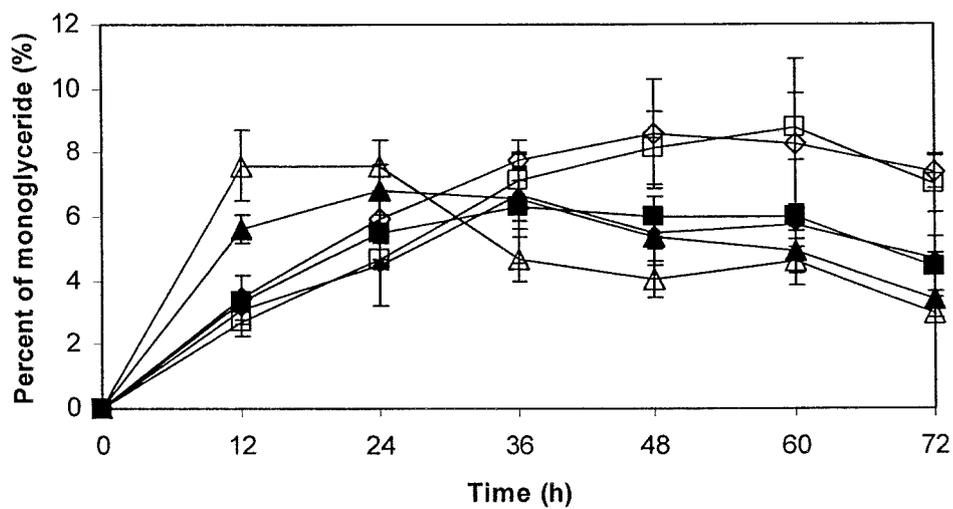
—◆— pH 5.0 —■— pH 6.0 —▲— pH 6.5
 —△— pH 7.0 —◇— pH 7.5 —□— pH 8.0

ภาพที่ 22 ผลของพีเอชต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมัน (A) และ 1-3 ไดกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.346 ยูนิต/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)



(B)



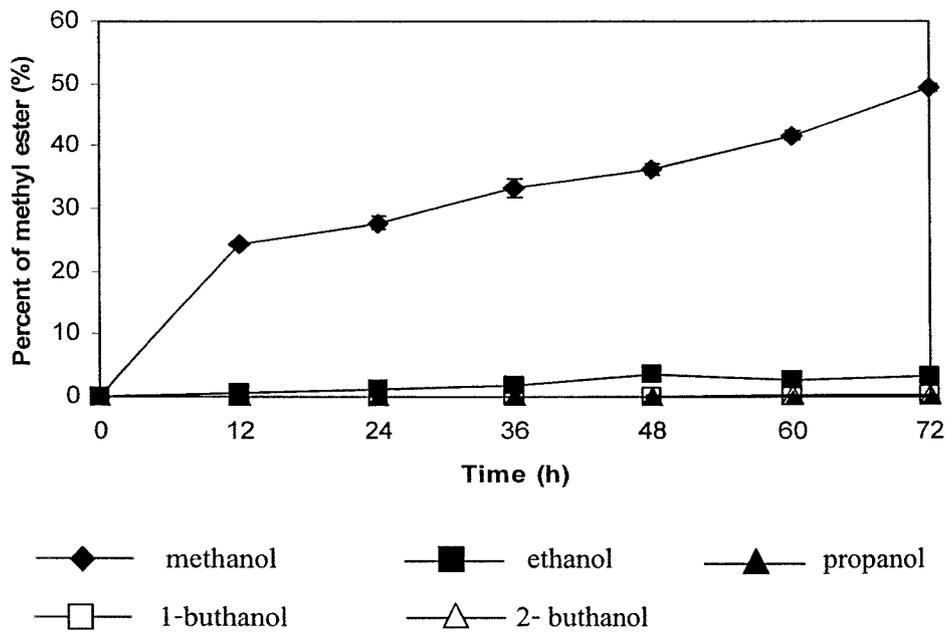
ภาพที่ 23 ผลของพีเอชต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1-2 ไดกลีเซอไรด์ (A) และ โมโนกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.346 ยูนิต/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

7.6 ผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

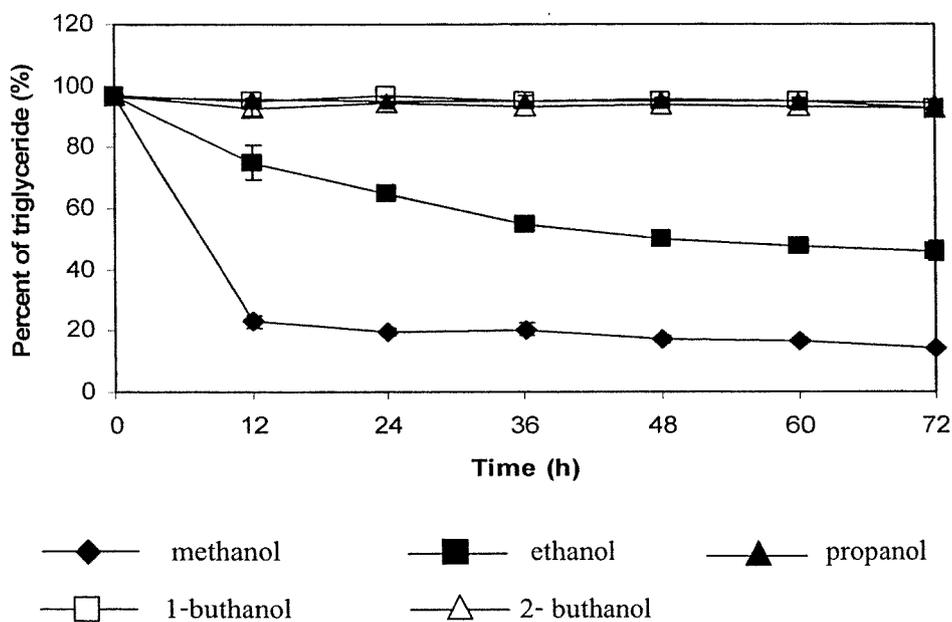
การศึกษาผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการศึกษามี 5 ชนิด ดังนี้ เมทานอล, เอทานอล, โพรพานอล, 1-บิวทานอล และ 2-บิวทานอล ปรับปริมาณน้ำให้เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้เมทานอลทำให้ได้เมทิลเอสเทอร์สูงสุด 49.28 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 24) รองลงมาเป็นเอทานอลซึ่งให้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ 3.19 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ 1-บิวทานอลและ 2-บิวทานอล สามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง และไม่พบการผลิตอัลคิลเอสเทอร์เลยเมื่อใช้โพรพานอล

ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเมื่อเติมโพรพานอล, 1-บิวทานอลและ 2-บิวทานอล แทบไม่เกิดการย่อยโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ไปเป็นองค์ประกอบอื่นๆ ของน้ำมันปาล์ม แต่ในการเติมเอทานอล ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เหลืออยู่ 46.04, 3.59, 27.52, 2.93 และ 16.71 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 25-27) แสดงให้เห็นว่าไลเปสจากยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* สามารถเร่งเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันได้น้อยกว่าในปฏิกิริยาที่มีเมทานอลเป็นสับสเตรท โดยในการทดลองที่ใช้เมทานอลมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เหลืออยู่ 14.22, 1.87, 15.68, 2.97 และ 15.98 ตามลำดับ ดังนั้นแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ คือ เมทานอลเพราะเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดี และไม่รบกวนการทำงานของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลง เมื่อใช้แอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากขึ้น ที่อุณหภูมิปกติเมทานอลซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีความเป็นขั้วสูงกว่าแอลกอฮอล์ชนิดอื่น จึงทำให้เมทานอลสามารถกระจายตัวและเข้าไปยังตำแหน่งของเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า โดยเมทานอลจะทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิล (acyl acceptor) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์มากกว่าปฏิกิริยาที่มี เอทานอล, โพรพานอล, 1-บิวทานอล และ 2-บิวทานอล อยู่ในระบบ (Hama *et al.*, 2007) เอนไซม์ไลเปสที่มาจากจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กัน จะมีความจำเพาะต่อชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่แตกต่างกัน โดยจากผลการทดลองเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotolura mucilagenosa* มีความจำเพาะต่อเมทานอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์สายตรงมากที่สุด เช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันของเมล็ด *Jatropha (Jatropha curcas)* กับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ คือ เมทานอล, เอทานอล, โพรพานอลและบิวทานอล พบว่า เมทานอลเป็นชนิดของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล ทั้งในปฏิกิริยาที่ใช้ *Rhizopus oryzae* (whole cell) และเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* (Novozyme 435) ที่ผ่านการตรึงแล้ว เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน นอกจากนั้นการผลิตไบโอดีเซลจะมีประสิทธิภาพลดลง เมื่อสายของแอลกอฮอล์ยาวขึ้น (Tamalampudi *et al.*, 2008) และยังคงคล้องกับการทดลองของ Kamini และ Iefuji (2001) ศึกษาผล

ของแอลกอฮอล์ปฐมภูมิต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันรำข้าว โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus* spp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ที่เวลา 120 ชั่วโมง เมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 80.7 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล, โพรพานอลและบิวทานอลสามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ แต่ไอโซบิวทานอลสามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้ถึง 65.0 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากการศึกษาของ Martin และคณะ (2008) ศึกษาผลของเมทานอลและเอทานอล ต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน มีน้ำมันดอกทานตะวันเป็นสารตั้งต้น และเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ผ่านการตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า เมื่อใช้เอทานอลเข้าทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน จะเกิดผลิตภัณฑ์ของเอทิลเอสเทอร์ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้เมทานอลทำปฏิกิริยาจะเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้เพียง 85 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น อย่างไรก็ตาม Iso และคณะ (2001) ศึกษาผลของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ เมื่อใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างไตรโอเลอินและแอลกอฮอล์ ชนิด โพรพานอลและบิวทานอล โดยมีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Pseudomonas fluorescens* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า สามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 25 ชั่วโมง

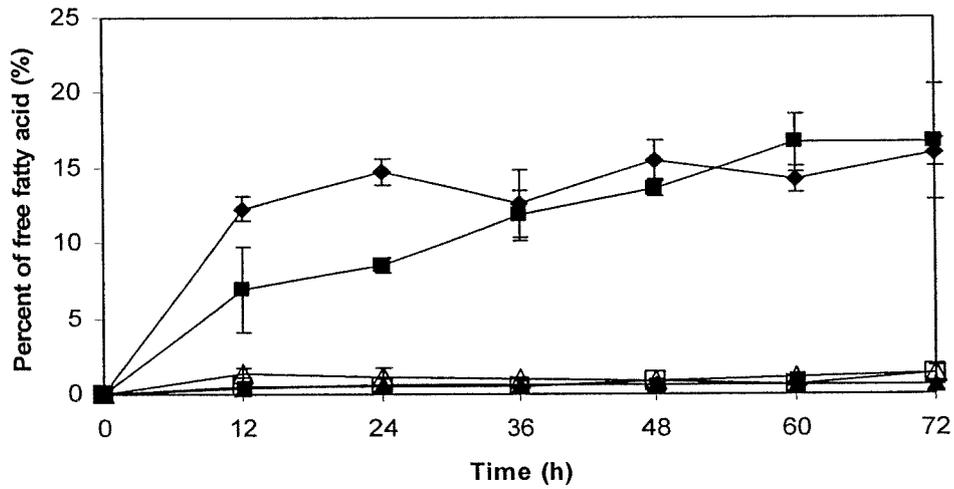


ภาพที่ 24 ผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.346 หน่วย/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

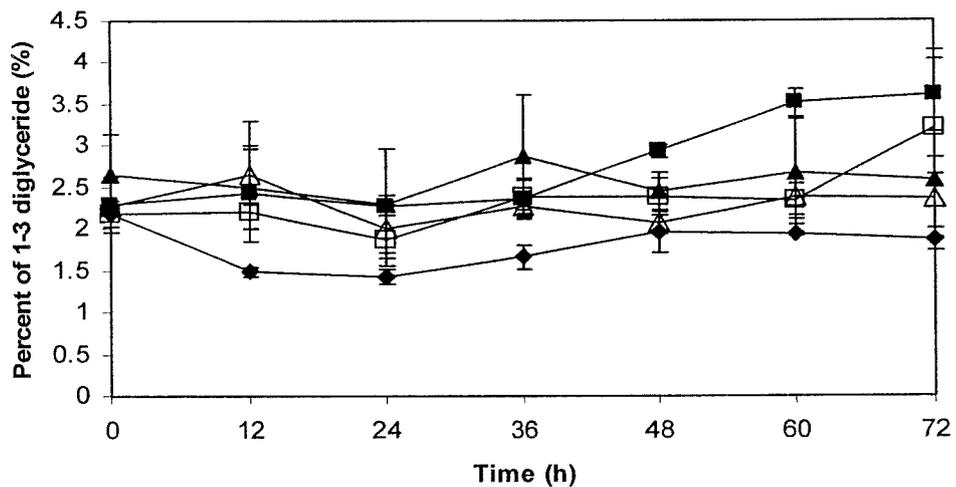


ภาพที่ 25 ผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.346 ยูนิต/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)



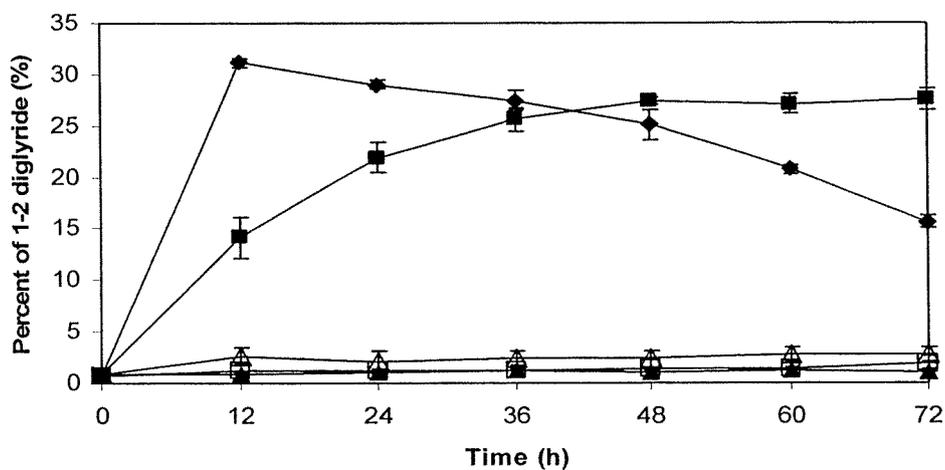
(B)



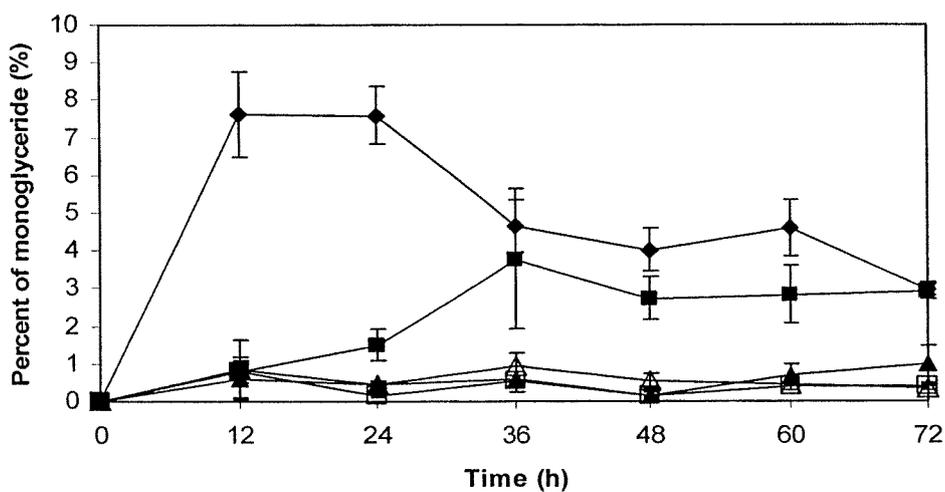
◆ methanol ■ ethanol ▲ propanol
 □ 1-butanol △ 2-butanol

ภาพที่ 26 ผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมัน (A) และ 1-3 ไคกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.346 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)



(B)



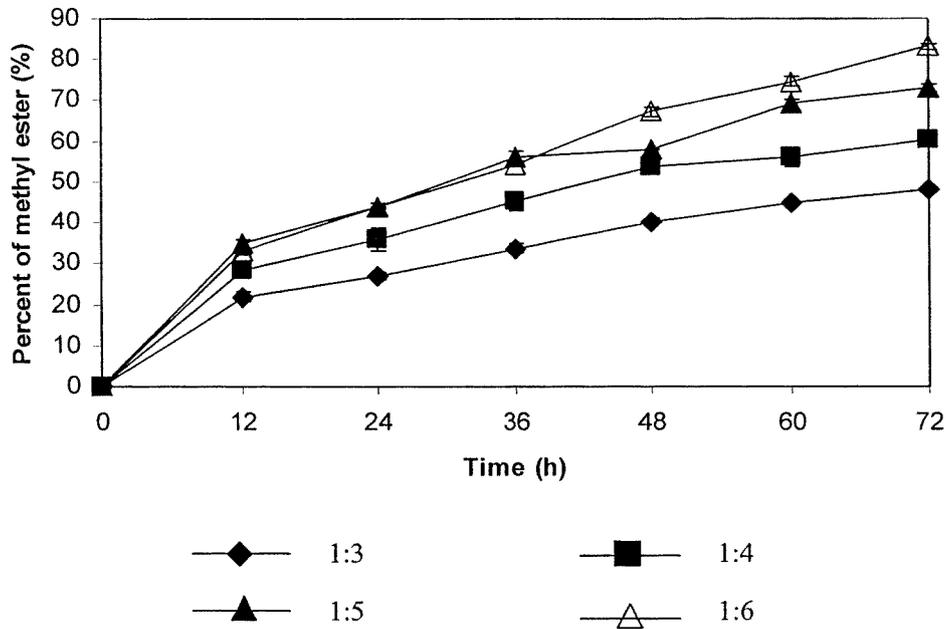
◆ methanol ■ ethanol ▲ propanol
 □ 1-butanol △ 2-butanol

ภาพที่ 27 ผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1-2 ไดกลีเซอไรด์ (A) และ โมโนกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน โมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.346 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

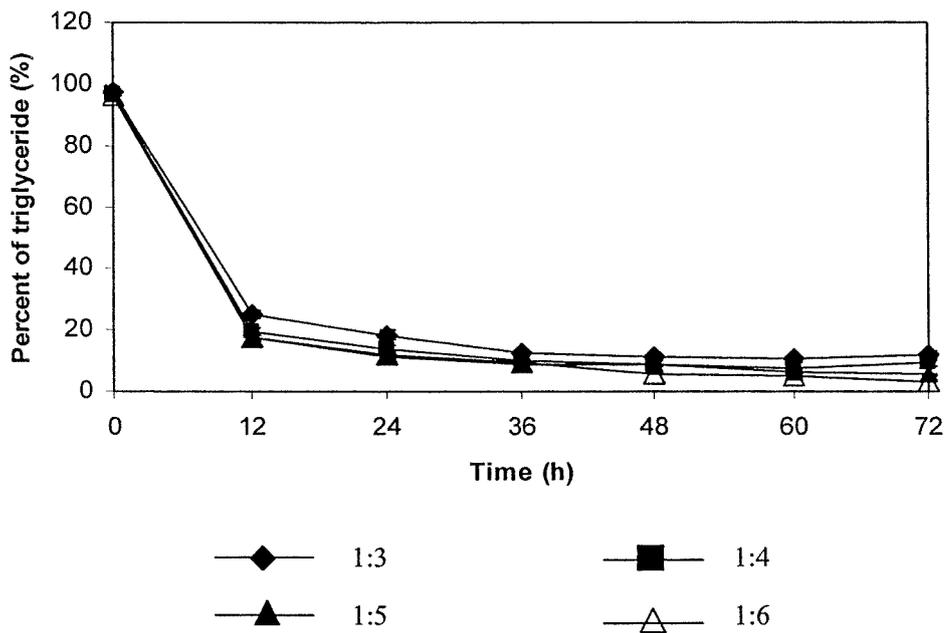
7.7 ผลของอัตราส่วนโมลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของอัตราส่วน โมลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสับสเตรทที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 ปรับให้มีปริมาณน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท โดยการสารถลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วน โมลของเมทานอลที่เข้าทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 (โมล:โมล) มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 48.19, 60.46, 73.11 และ 83.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 28) เมื่อพิจารณาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 36 จะเห็นได้ว่าในระบบที่มีอัตราส่วน โมลน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:5 มีเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นมากกว่าในระบบอื่นๆ โดยมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในชั่วโมงที่ 12, 24 และ 36 เท่ากับ 34.69, 44.04 และ 56.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่อัตราส่วน โมล 1:6 ซึ่งเป็นระบบที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 32.96, 43.72 และ 54.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48, 60 และ 72 พบว่า ในระบบที่มีอัตราส่วน โมลน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล 1:6 มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น เท่ากับ 67.30, 74.49 และ 83.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่อัตราส่วน โมล 1:5 มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 58.03, 69.04 และ 73.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การใช้สับสเตรทที่อัตราส่วน โมล 1:6 ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้สับสเตรทที่อัตราส่วน โมล 1:5 และที่อัตราส่วน โมล 1:6 ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 32.96, 43.72, 54.01, 67.31 และ 74.49 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ตามลำดับ ส่วนปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่อัตราส่วน โมล 1:6 มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่เหลืออยู่ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 72 เท่ากับ 17.70 และ 3.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 29) ซึ่งปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลือน้อยกว่าในระบบที่มีอัตราส่วน โมล 1:5 โดยส่วนใหญ่แล้วการศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์หรือตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่อัตราส่วน โมลน้ำมันและเมทานอลเท่ากับ 1:4 แต่ในระบบที่ศึกษาถึงแม้จะมีการใช้อัตราส่วน น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลที่สูงถึง 1:6 ก็ยังเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดี แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์สามารถทนเมทานอลในปริมาณที่สูงได้จึงเป็นการดีในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ เพราะฉะนั้นจะทำการเลือกอัตราส่วน โมล 1:6 ในการศึกษาปัจจัยต่อไป นอกจากนี้ในอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:6 มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระเหลืออยู่เพียง 3.45, 0.25, 4.69, 1.02 และ 7.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 29-31) ซึ่งในทางทฤษฎีสมดุลมวลสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ที่สมบูรณ์ต้องมีอัตราส่วน โมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์อย่างน้อย 1 ต่อ 3 แต่ในทางปฏิบัติ พบว่าปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์สามารถผันกลับ ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมเมทานอลมากเกินไปให้สถานะ

สมมูลเดือนเข้าใกล้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด แต่ถ้ามีปริมาณเมทานอลมากเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ (Ma and Hanna, 1999)

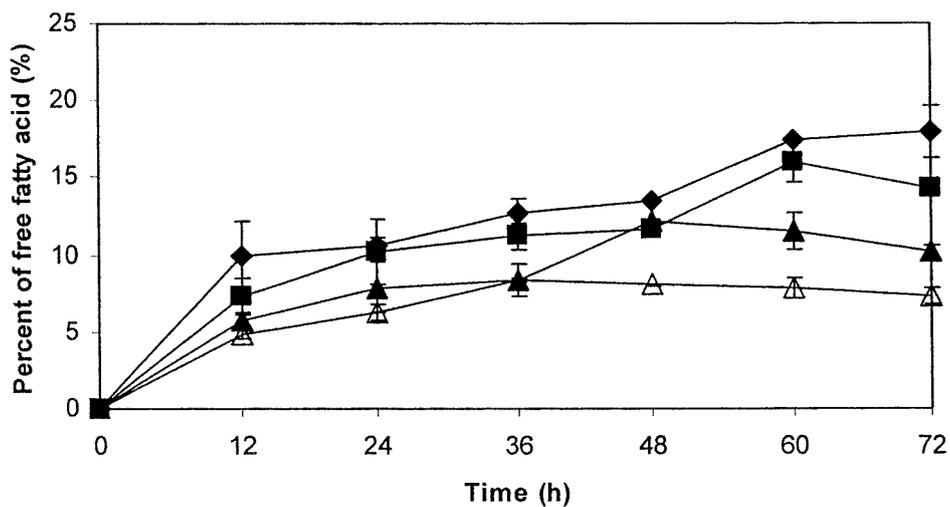


ภาพที่ 28 ผลของอัตราส่วน โมลของน้ำมันปาล์มและเมทานอล ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.288 ยูนิต/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

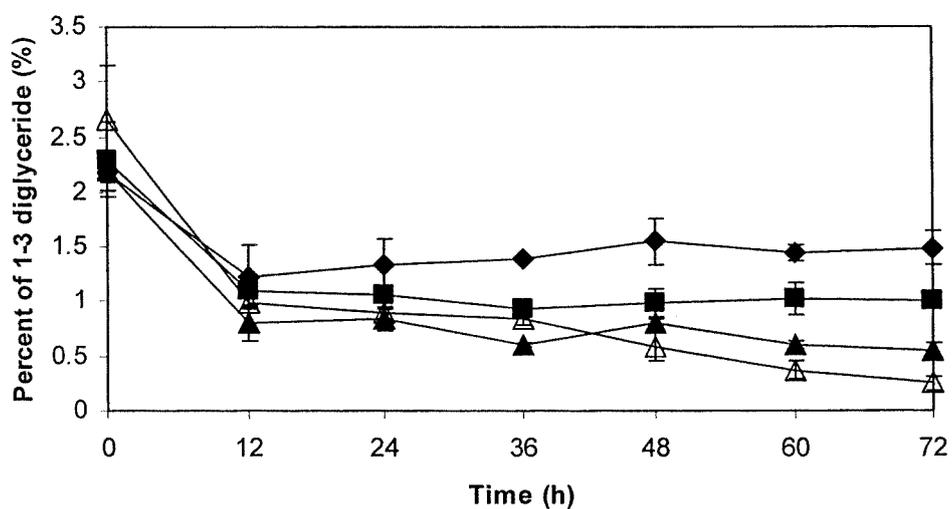


ภาพที่ 29 ผลของอัตราส่วน โมลของน้ำมันปาล์มและเมทานอล ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.288 ยูนิต/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

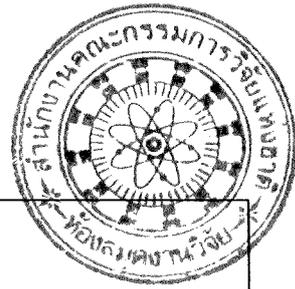
(A)



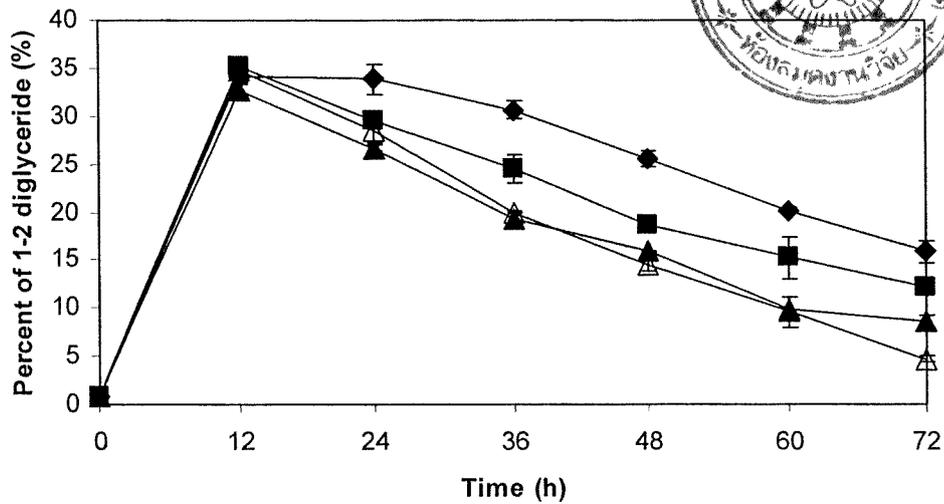
(B)



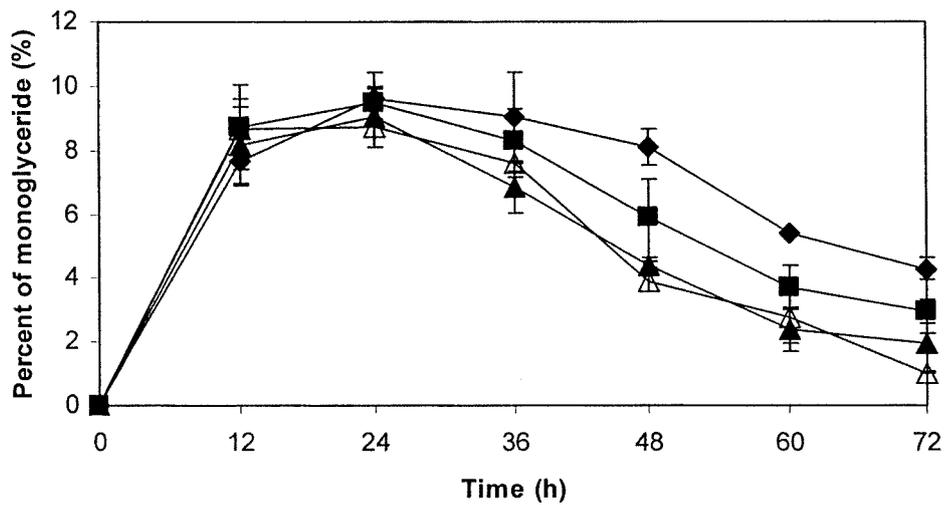
ภาพที่ 30 ผลของอัตราส่วนโมลของน้ำมันปาล์มและเมทานอล ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมัน (A) และ 1-3 ไดกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.288 หน่วย/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



(A)



(B)



ภาพที่ 31 ผลของอัตราส่วนโมลของน้ำมันปาล์มและเมทานอล ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1-2 ไดกลีเซอไรด์ (A) และ โมโนกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.288 หน่วย/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ผลการทดลองนี้พบว่าไลเปสจาก *Rhodotorula mucilagenosa* ทนต่อปริมาณเมทานอลได้สูงกว่าไลเปสที่รายงานในการทดลองอื่นๆ เช่น การทดลองของ Du และคณะ (2003) ศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยามาทาโนไลซิสมีน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลเป็นสับสเตรท โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปจาก *Thermomyces lanuginosus* พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนเป็น 1:4 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงกว่าที่อัตราส่วน 1:3 แต่ที่อัตราส่วน 1:5 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะลดลงเช่นเดียวกับการทดลองของ Kose และคณะ (2002) ศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยามาทาโนไลซิสที่มีส่วนผสมของน้ำมันเมล็ดฝ้ายและเมทานอล ในอัตราส่วนโมล 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปจาก *Candida antarctica* พบว่าที่อัตราส่วน 1:4 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 87.4 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนเป็น 1:5 และ 1:6 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้น 85.2 และ 63.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

7.8 ผลของชนิดน้ำมันปาล์มต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

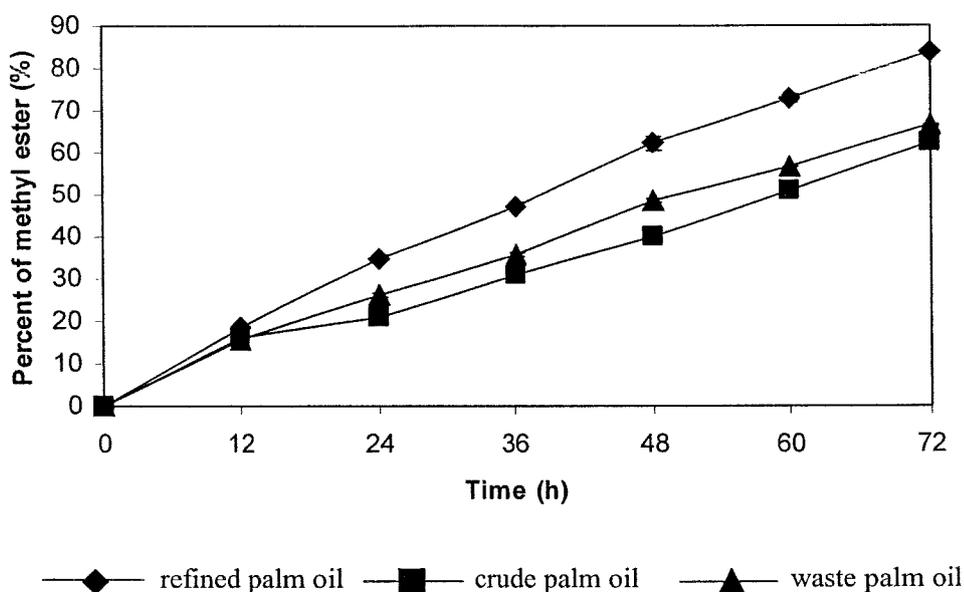
ในการศึกษาผลของชนิดน้ำมันต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 1:6 (โมล:โมล) เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำในระบบ 11.38 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ตามลำดับเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน สามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์ได้เท่ากับ 83.63, 62.34 และ 66.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 32) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นจากปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่เหลืออยู่ จะเห็นได้ว่าระบบที่ใช้ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่เพียง 3.76 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ระบบที่มีน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรท มีไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่ เท่ากับ 14.29 และ 9.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 33) ส่วน 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ มีปริมาณลดลงดังแสดงในภาพที่ 34-35)

การที่ระบบที่ใช้ น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรทมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำกว่าที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท เนื่องจากน้ำมันปาล์มใช้แล้วมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิม เช่น น้ำมันมีสีคล้ำมากขึ้น และความหนืด (viscosity) ที่เพิ่มขึ้น (นิธิยา รัตนปนนท์, 2541) เมื่อความหนืดเพิ่มมากขึ้น โอกาสที่สับสเตรทจะเข้าไปจับบริเวณเร่ง (active site) ก็จะเกิดได้ยากขึ้น จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าระบบที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท ในส่วนของน้ำมันปาล์มดิบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีลักษณะเป็นของเหลวปนของแข็ง ส่วนของเหลวจะเป็นส่วนของน้ำมันปาล์มโอลีน ส่วนที่เป็นของแข็ง เรียกว่า ปาล์มสเตียรินหรือไฮสเตียริน (พิสมัย เจนวนิชปัญจกุลและลลิตา อัดนโถ, 2549) จากการที่น้ำมันปาล์มดิบมีทั้งส่วนที่เป็นของเหลวและของแข็งจึงทำให้สับสเตรทเข้าไปจับกับบริเวณเร่ง (active site) ได้ไม่ดีเท่ากับสับสเตรทที่เป็นของเหลวเพียงอย่างเดียว ดังนั้น

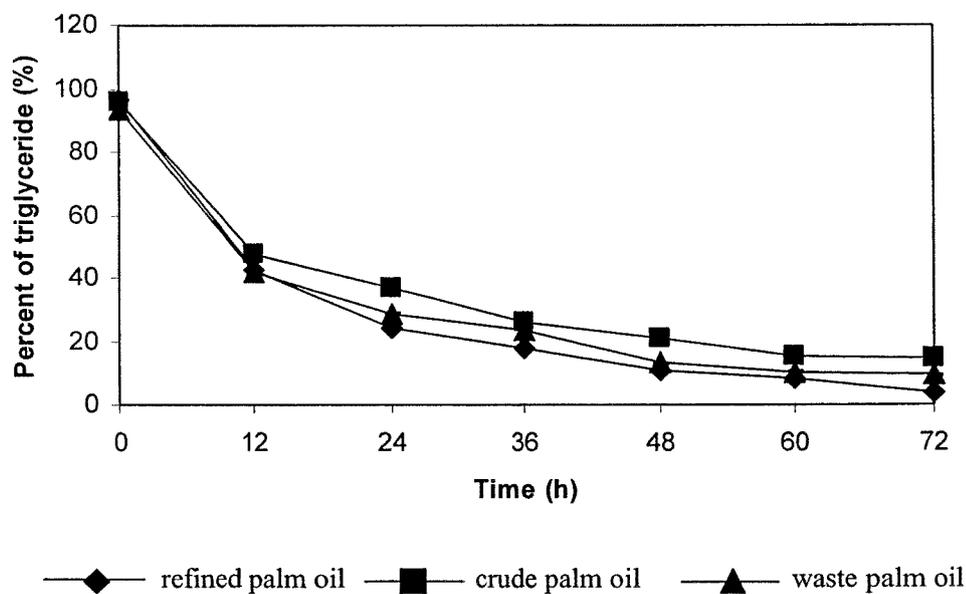
ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จึงน้อยกว่าในระบบที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลของ Nie และคณะ (2006) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* 99-125 มีค่ากิจกรรม 7000 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรท ที่ผ่านการตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 ปริมาณน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 25 ชั่วโมง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 90 และ 92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำมันสลัด (salad oil) และน้ำมันใช้แล้วเป็นสับสเตรท ตามลำดับ ส่วน Chen และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้ว (waste cooking oil) แบบเติมเมทานอล 3 ขั้นตอน ใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท เดิมเฮกเซน 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 222.5 ยูนิต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท พบว่า เกิดปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด 91.08 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Watanabe และคณะ (2002) ศึกษาผลผลิตจากการทำปฏิกิริยามะทาโนไลซิส โดยมีน้ำมันถั่วเหลืองดิบ (crude oil) และน้ำมันถั่วเหลือง (refined oil) โดยมีเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ผ่านการตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราส่วน โมลน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 10.3 และ 30.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

7.9 ผลของการนำเซลล์ยีสต์มาใช้ซ้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของการใช้เซลล์ยีสต์ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาใช้ซ้ำอีกครั้ง เพื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วต่อแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:6 (โมล:โมล) โดยปรับปริมาณน้ำให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรท เท่ากับ 59.31, 36.39 และ 55.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 36-37) แสดงว่าเซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาได้ แต่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลง ซึ่งเห็นได้จากปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ลดลงจากที่ใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในครั้งแรก โดยผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในครั้งแรก ที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรท เท่ากับ 83.63, 62.34 และ 66.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเมื่อใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในครั้งแรก ที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรท มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่ 3.76, 14.29 และ 9.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาอีกครั้ง มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่ 11.38, 30.06 และ 9.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 38A)

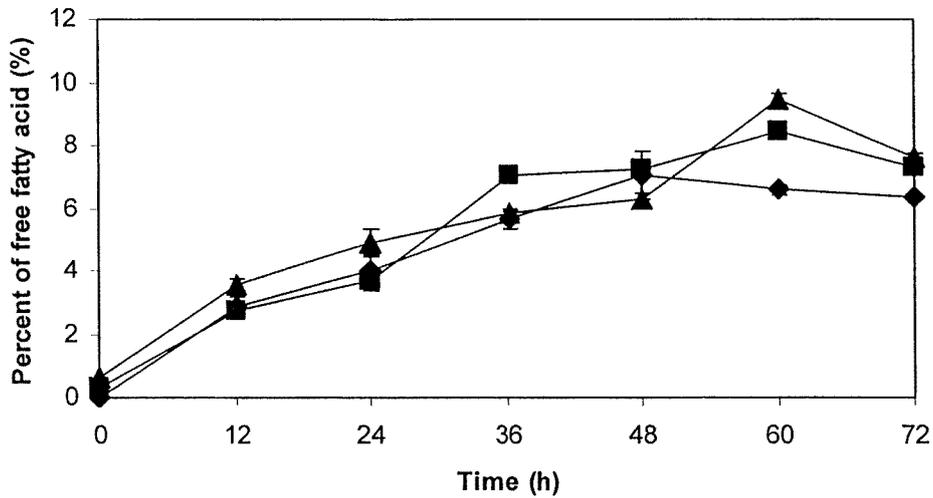


ภาพที่ 32 ผลของชนิดน้ำมันปาล์มต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:6 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 หน่วย/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

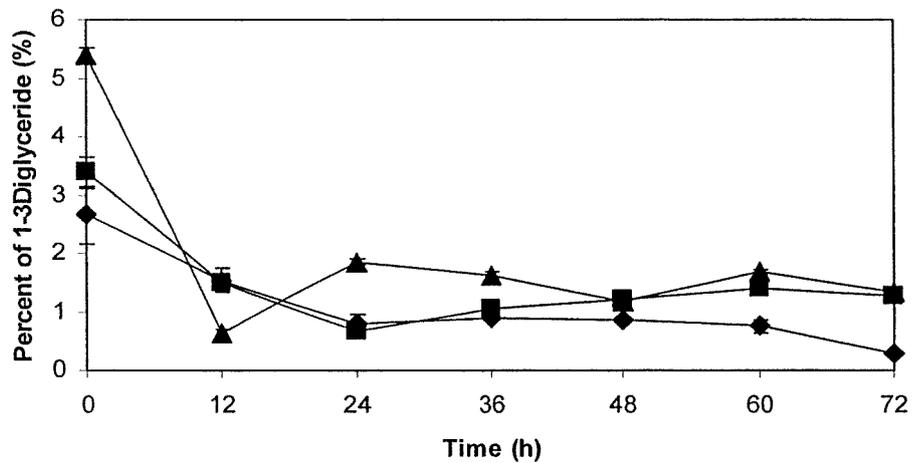


ภาพที่ 33 ผลของชนิดน้ำมันปาล์มต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:6 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 หน่วย/กรัม สับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)



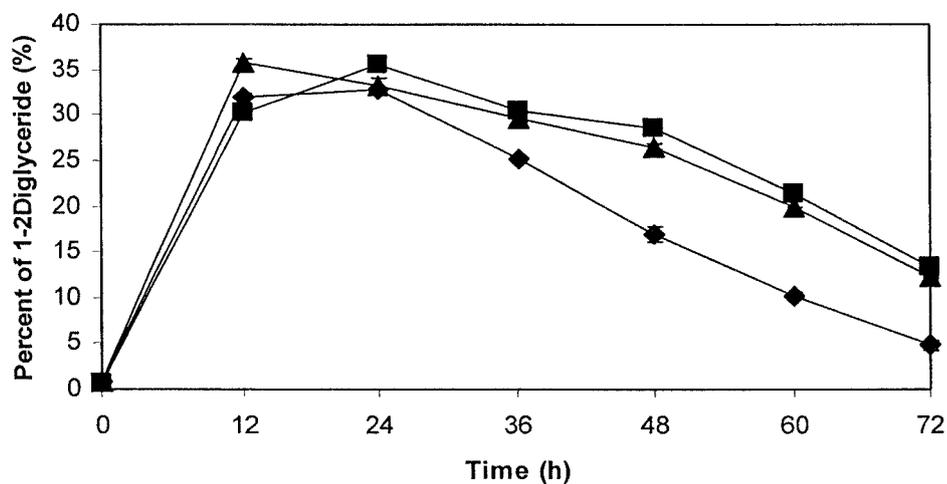
(B)



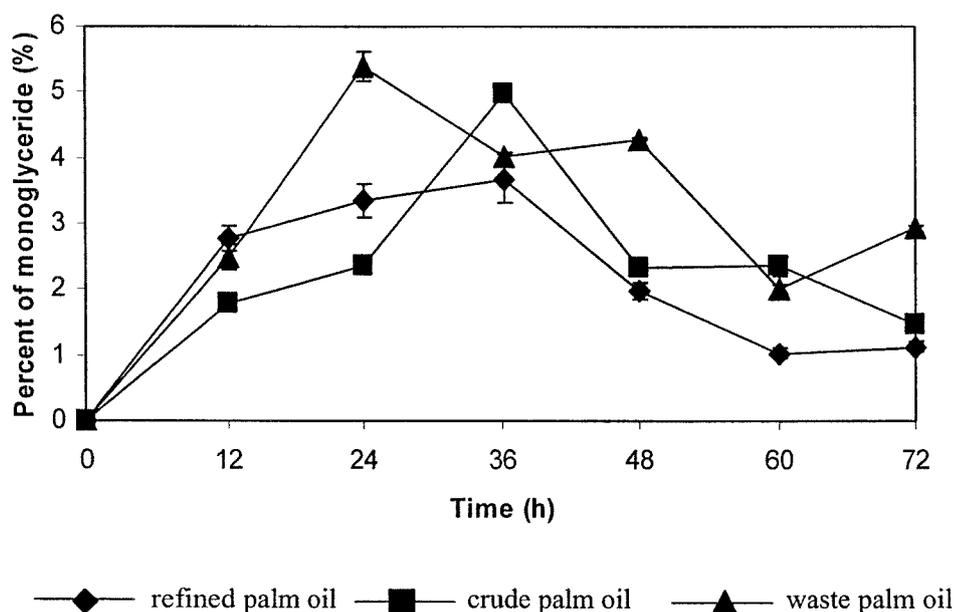
—◆— refined palm oil —■— crude palm oil —▲— waste palm oil

ภาพที่ 34 ผลของชนิดน้ำมันปาล์มต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมัน (A) และ 1-3-ไดกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:6 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

(A)

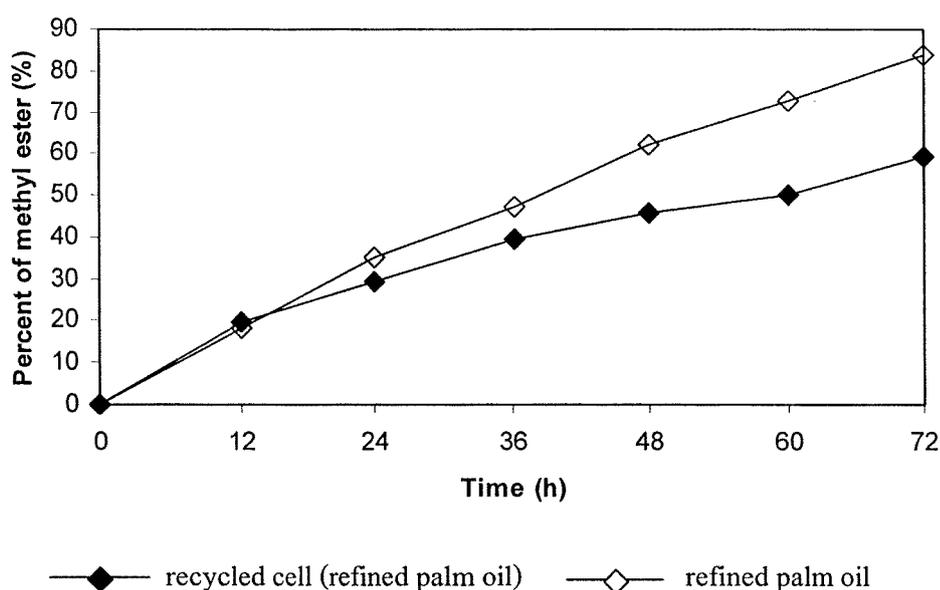


(B)

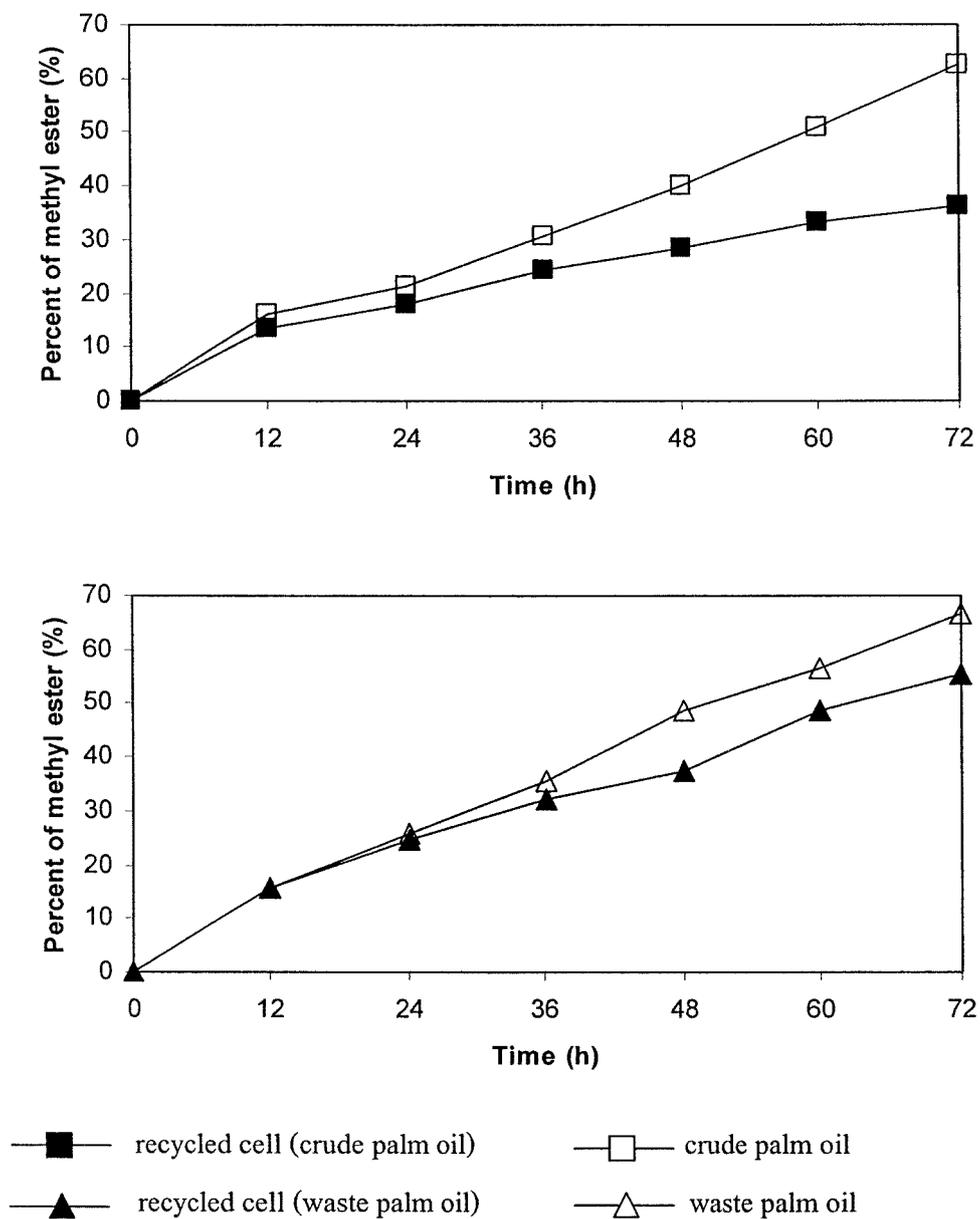


ภาพที่ 35 ผลของชนิดน้ำมันปาล์มต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ 1-2 ไดกลีเซอไรด์ (A) และ โมโนกลีเซอไรด์ (B) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:6 โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ในการทดลองที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสับสเตรทยังคงความสามารถในการเกิดผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์ได้มากที่สุด โดยมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เหลืออยู่ 11.38, 1.00, 22.54, 2.80 และ 3.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 38-40) นอกจากนี้การที่ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงเมื่อใช้เซลล์ยีสต์เร่งปฏิกิริยา อาจมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ถูกทำลายด้วยเมทานอลที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา จึงทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปไม่สามารถทำงานได้ (Chen *et al.*, 2009) ซึ่งผลการทดลองการใช้เซลล์ยีสต์ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสอดคล้องกับ Tamalampudi และคณะ (2008) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ตรึงแล้วมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสซ้ำ กิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 10,000 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ไม่เติมน้ำ อัตราส่วน โมลน้ำมันจาก *Jatropha oil* ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 เป็นเวลา 90 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลง โดยผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์จากระบบที่ใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาในครั้งแรกและครั้งที่สอง เท่ากับ 75.1 และ 73.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Chen และคณะ (2009) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเมทิลเอสเทอร์เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมากขึ้น พบว่า ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ลดลง 15.74 เปอร์เซ็นต์ จาก 91.08 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 76.74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาผ่านไป 100 ชั่วโมง โดยมี น้ำมันพืชใช้แล้ว เป็นสับสเตรท เติมเมทานอล 3 ชั้นตอน อัตราส่วน โมลน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท เติมเฮกเซน 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ตรึงแล้วมาเป็นตัวเร่ง เท่ากับ 222.5 ยูนิต ต่อน้ำหนักสับสเตรท

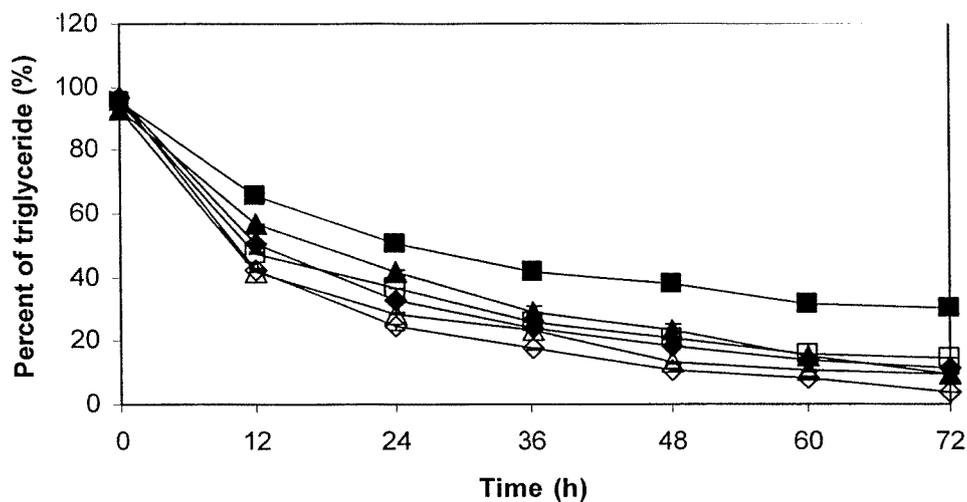


ภาพที่ 36 ผลของการนำเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) มาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:6 ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

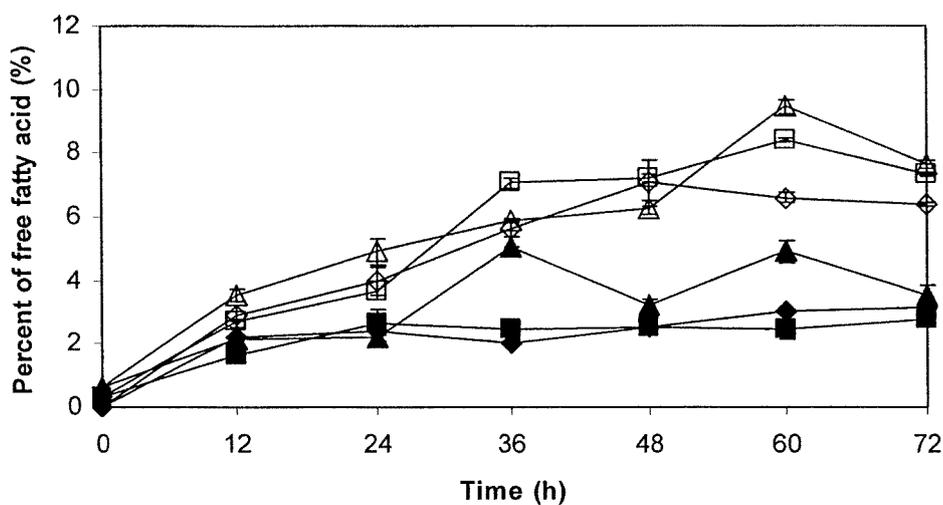


ภาพที่ 37 ผลของการนำเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) มาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มดิบ/น้ำมันปาล์มใช้แล้วและเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:6 ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

(A)



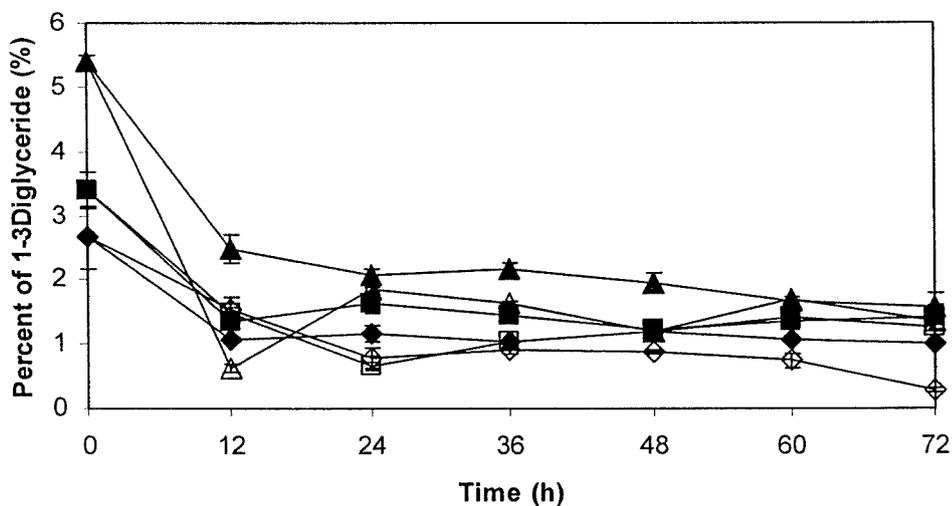
(B)



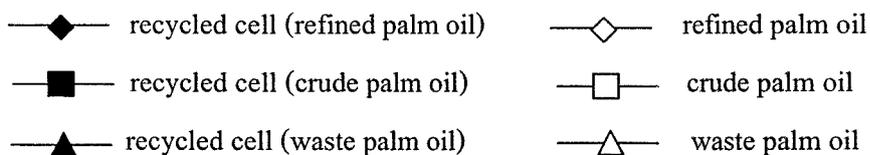
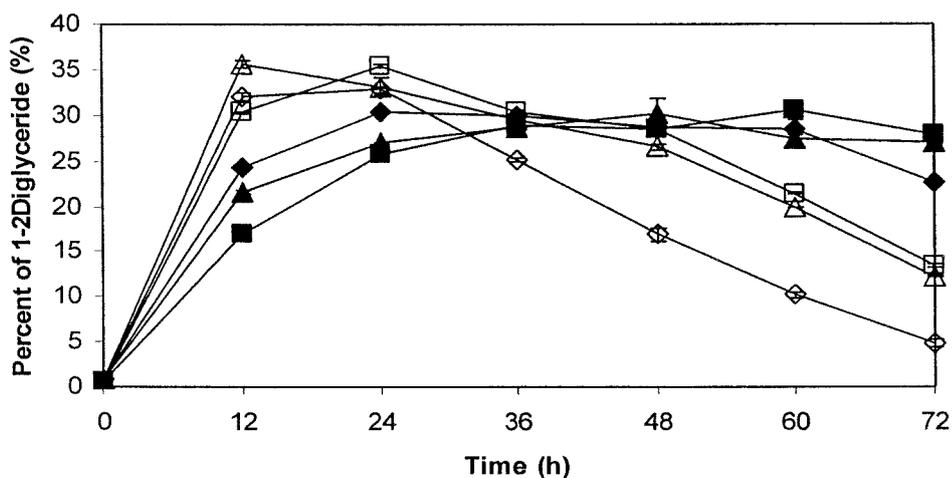
◆ recycled cell (refined palm oil) ◇ refined palm oil
 ■ recycled cell (crude palm oil) □ crude palm oil
 ▲ recycled cell (waste palm oil) △ waste palm oil

ภาพที่ 38 ผลของผลของการนำเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) มาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:6 ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (A) และกรดไขมัน (B)

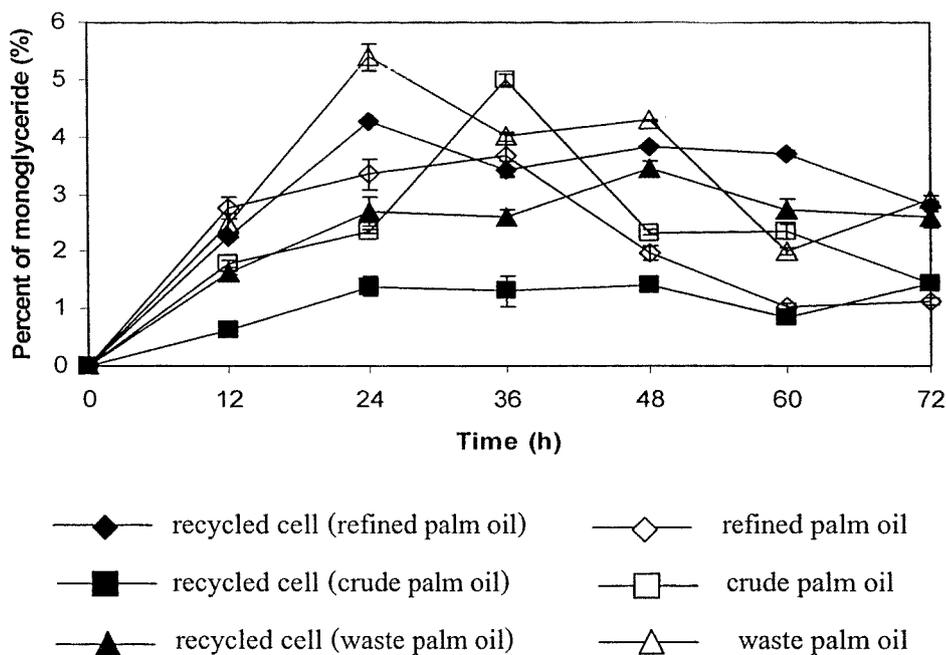
(A)



(B)



ภาพที่ 39 ผลของการนำเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) มาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:6 ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณปริมาณ 1-3 ไดกลีเซอไรด์ (A) และ 1-2 ไดกลีเซอไรด์ (B)



ภาพที่ 40 ผลของการนำเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (1.096 ยูนิต/กรัมสับสเตรท) มาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วนโมล 1:6 ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณโมโนกลีเซอไรด์

8. องค์ประกอบเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลโดยใช้ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa*

จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า สถานะที่เหมาะสมในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ คือ มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์กับเมทานอลเป็นสับสเตรท อัตราส่วน โมลน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:6 ปรับปริมาณน้ำเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อกรัมสับสเตรท โดยการเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และใช้ยีสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของอัลคิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ ปาล์มมิดิกเมทิลเอสเทอร์ 38.18 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นโอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ 34.22 เปอร์เซ็นต์ ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ 10.16 เปอร์เซ็นต์ และสเตียริกเมทิลเอสเทอร์ซึ่งมีปริมาณ 4.64 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 16 เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Mass Spectrometry พบว่ามีสัดส่วนเมทิลปาล์มมิเตทและเมทิลโอเลอิกเท่ากับ 40.12 และ 45.66 เปอร์เซ็นต์ มีกรดปาล์มมิติกและกรดโอเลอิกเหลืออยู่ในสัดส่วน 5.41 และ 1.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 16 ชนิดและปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วน โมล 1:6 ในสภาพที่มีปริมาณน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อกรัม สับสเตรท พีเอช 7.0 และเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัม สับสเตรท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Composition	Fatty acid methyl ester (%)
Caprylic acid methyl ester (C8:0)	0.04
Capric acid methyl ester (C10:0)	0.32
Lauric acid methyl ester (C12:0)	0.41
Myristic acid methyl ester (C14:0)	0.94
Palmitic acid methyl ester (C16:0)	38.18
Palmitoleic acid methyl ester (C16:1)	0.16
Stearic acid methyl ester (C18:0)	4.64
Oleic acid methyl ester (C18:1)	34.22
Linoleic acid methyl ester (C18:2)	10.16
Linolenic acid methyl ester (C18:3)	0.19
Arachidic acid methyl ester (C20:0)	0.42
Cis 11-Eicosenoic acid methyl ester (C20:1)	0.19
Behenic acid methyl ester (C22:0)	0.07
Erucic acid methyl ester (C22:1)	0.04
Lignoceric acid methyl ester (C24:0)	0.08

ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันพืชเป็นสารประกอบไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันอยู่ในโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ถึงร้อยละ 94-96 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโมเลกุล ทำให้คุณสมบัติของน้ำมันมีคุณสมบัติทั้งทางเคมีและกายภาพเป็นไปตามกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้น เมื่อนำน้ำมันพืชชนิดนั้นๆ มาเป็นวัตถุดิบในการผลิต ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จะจะมีสัดส่วนของชนิดเมทิลเอสเทอร์ตามชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบนั้นๆ ด้วย ซึ่งจากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่ากรดไขมันปาล์มติกและ โอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ คือมีอยู่ถึง 36.50 และ 43.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น เมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน จึงเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน โอเลอิกและปาล์มติกเป็นส่วนใหญ่

สรุปผลการทดลอง

การแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน, น้ำและกากปาล์ม ที่ปนเปื้อนน้ำมันเก็บจากโรงงานน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทยทั้งหมด 36 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร Yeast-malt medium (YM) และอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและเติม rhodamine B เพื่อคัดเลือดยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร พบว่า ได้ยีสต์ทั้งหมด 206 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากอาหาร YM 117 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 89 สายพันธุ์

ในการคัดเลือดยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ที่คัดแยกจากทะเล 77 สายพันธุ์ โดยการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในการย่อยน้ำมันปาล์ม โดยใช้ rhodamine B พบว่ามีเพียง 30 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยน้ำมันปาล์มได้ ซึ่งจากการวัดกิจกรรมการย่อยน้ำมันปาล์มโดยวิธี two-phase emulsion พบว่าทั้ง 30 สายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยน้ำมันปาล์มได้ในระดับต่าง ๆ กัน แต่พบกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลได้น้อยมาก และมีกิจกรรมเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันได้บ้าง ในขณะที่ยีสต์ 206 สายพันธุ์ ที่แยกจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีเพียง 22 และ 27 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากอาหาร YM และอาหาร IMY ตามลำดับ ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อย *p*-nitrophenyl palmitate แต่เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี two-phase emulsion พบว่า มีเพียงยีสต์สายพันธุ์ P11I89 เท่านั้น ที่สามารถวัดปริมาณเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีนี้ได้ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.535 ± 0.031 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท เท่ากับ 0.026 ± 0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยยีสต์สายพันธุ์ P11I89 เป็นยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินสีน้ำตาล มีน้ำมันปนเปื้อน มีค่าพีเอช 5 และมีอุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส

การนำเซลล์ยีสต์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำนวน 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลเป็นสับสเตรท อัตราส่วนโมล 1:3 ไม่เติมน้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วย TLC/FID พบว่า มียีสต์เพียง 16 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ โดยยีสต์สายพันธุ์ P11I89 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 51.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำยีสต์สายพันธุ์ P11I89 ไปวิเคราะห์ลำดับเบส 28S rDNA พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ P11I89 คือสายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa*

การศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* ในอาหาร IMY บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 180 ชั่วโมง พบว่า ในระหว่างที่ยีสต์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 ทั้งในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท และวิธี two-phase emulsion โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 0.092 ± 0.005 และ 2.534 ± 0.044 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ที่นำมาใช้เป็นสับสเตรท มีค่าสaponification value) เท่ากับ 193.90 ± 3.67 , 194.05 ± 3.54 และ 184.84 ± 0.24 ตามลำดับ ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value) เท่ากับ 3.15 ± 0.11 , 2.84 ± 0.02 และ 0.58 ± 0.09 ตามลำดับ ค่าไอโอดีน (Iodine value) เท่ากับ 53.65 ± 0.02 , 48.20 ± 1.22 และ 52.91 ± 0.18 ตามลำดับ ค่ากรด (Acid value) เท่ากับ 0.60 ± 0.02 , 2.55 ± 0.02 และ 1.24 ± 0.24 ตามลำดับ ปริมาณน้ำในน้ำมัน เท่ากับ 1.38 ± 0.02 , 1.55 ± 0.01 และ 2.99 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากค่าสaponification value สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ได้เท่ากับ 867.97, 867.50 และ 910.52 ตามลำดับ ส่วนชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มทั้งสามชนิด มีดังนี้ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ประกอบด้วย กรดโอเลอิก (C18:1), กรดปาล์มมิติก (C16:0), กรดลิโนเลอิก (C18:2) และกรดสเตียริก (C18:0) คิดเป็น 43.67, 36.50, 10.92 และ 4.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สถานะที่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือ ใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล อัตราส่วน โมล 1:6 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในปฏิกิริยา 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท ปริมาณเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน บ่มบนเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ 83.63 เปอร์เซ็นต์ มีกรดปาล์มมิติกและกรดโอเลอิกเหลืออยู่ในสัดส่วน 5.41 และ 1.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ชนิดของเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน คือ ปาล์มมิติกเมทิลเอสเทอร์, โอเลอิกเมทิลเอสเทอร์, ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ และ สเตียริกเมทิลเอสเทอร์ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 38.18, 34.22, 10.16 และ 4.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ