

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

น้ำมันปาล์มโอเลอินทางการค้าตรามรกต ผลิตโดยบริษัทมรกตอินดัสตรีส์จำกัด (มหาชน)

2. จุลินทรีย์

สายพันธุ์ยีสต์ที่แยกได้จากงานวิจัยการแยกการคัดเลือกและการผลิตยีสต์จากทะเล เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาว จำนวน 77 สายพันธุ์ (ทิพรัตน์ หงษ์ทริศรี และ กิจการศุภมาตย์, 2548) จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ*

บริษัทผู้ผลิต/ประเทศ

3.1 Chloramphenicol	Sigma/Germany
3.2 D-Glucose	Ajax Finechem/Australia
3.3 Sodium chloride	Labscan/Thailand
3.4 Malt extract	Himedia/India
3.5 Peptone water	Himedia/India
3.6 Yeast extract	Himedia/India
3.7 Rhodamine	Himedia/India
3.8 Gum Arabic	Fluka/France
3.9 กรดไขมัน โอเลอิก	Nacalai/Japan
3.10 <i>p</i> -nitrophenyl palmitate (<i>p</i> PNC ₁₆)	Sigma/Germany
3.11 (Sulfuric acid) H ₂ SO ₄	Merck/Germany
3.12 Hydrochloric acid (HCl)	Lab scan/Thailand
3.13 Sodium hydroxide (NaOH)	Merck/Germany
3.14 Potassium chloride (KCl)	Ajex Finechem/Australia
3.15 Phenol	Fisher Scientific/England
3.16 Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	Ajex Finechem/Australia
3.17 Calcium chloride hexahydrate(CaCl ₂ ·6H ₂ O)	Ajex Finechem/Australia
3.18 Magnesium sulphate(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Ajex Finechem/Australia

3.19 Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3)	Lab scan/Thailand
3.20 Copper Sulphate Pentahydrate($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Lab scan/Thailand
3.21 Amonium nitrate (NH_4NO_3)	Ajex Finechem/Australia
3.22 Ferrous Sulfate Hepta Hydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Ajex Finechem/Australia
3.23 Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Ajex Finechem/Australia
3.24 Maganese II sulphate 4-hydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Ajex Finechem/Australia

* สารเคมีที่ใช้เป็นเกรดระดับวิเคราะห์

4. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทดลอง

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
4.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Mettler Toledo, USA
4.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorious, USA
4.3 Vortex mixer	Labnet, USA
4.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach, Germany
4.5 ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack	Scientific promotion, USA
(รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Tomy Seiko, Japan
4.6 หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325	Mettler Toledo, USA
4.7 พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Mettler Toledo 320	Labmate, USA
4.8 ไมโครปิเปตขนาด 10-100 ไมโครลิตร	Gilson, France
4.9 ไมโครปิเปตขนาด 1000ไมโครลิตร	Gesellschaft, Germany
4.10 เครื่องเขย่ารุ่น 3017	Hitachi, Japan
4.11 สเตปโคโตรโพโตมิเตอร์ รุ่น U-2000	
4.12 Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) รุ่น latroscan	Latron laboratories, Japan
MK-5	Ika, Japan
4.13 เครื่องปั่นผสม (Homogenizer) รุ่น T25 basic	

5. วิธีการวิจัย

5.1 การแยกและคัดเลือกลีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ทำการเก็บตัวอย่างดิน, น้ำ และกากเส้นใยปาล์ม และตัวอย่างอื่นๆ ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณต่างๆ ของโรงงานน้ำมันปาล์มบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธี จำกัด จังหวัดสงขลา, บริษัทเอเชียนปาล์มจำกัด, บริษัทยูนิวานิชน้ำมันปาล์มจำกัด และบริษัทอันดามันน้ำมันปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่

โดยใช้ช้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตักตัวอย่างที่ต้องการประมาณ 20 กรัม/ตัวอย่าง บรรจุลงในภาชนะที่ปลอดเชื้อ ทำการวัดอุณหภูมิบริเวณที่เก็บตัวอย่างด้วยเทอร์โมมิเตอร์ ทำการบันทึกสถานที่ รหัส ลักษณะตัวอย่าง และวัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างนั้น ทำการวัดค่าพีเอชของตัวอย่างที่เก็บ โดยเครื่องวัดพีเอช หลังจากการนำตัวอย่างไปแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดดังนี้

5.1.2 การแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยน้ำมันปาล์มโดยใช้อาหาร Yeast-Malt (YM)

นำตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ใส่ในอาหาร YM broth (ดัดแปลงโดย Lagos และคณะ, 2002) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ลงบนอาหารแข็ง YM (ภาคผนวก ก) ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ chloramphenical 0.00125 เปอร์เซ็นต์ และ rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปิเปตดูดเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำแท่งแก้ว (spreader) กลี่ยเชื้อให้ทั่วบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาส่องภายใต้แสงยูวีที่ 350 นาโนเมตร เลือกลโคโลนีที่มีการเรืองแสงภายใต้แสงยูวี โดยใช้ลูปถ่ายโคโลนีที่มีการเรืองแสงลงบนอาหารแข็ง YM ด้วยวิธีการ streak plate เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นเชื้อยีสต์ โดยใช้วิธี Wet mount เลือดยีสต์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมา streak plate เพื่อให้ได้ยีสต์บริสุทธิ์ อีก 4 ครั้ง และเก็บในกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

5.1.3 การแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยน้ำมันปาล์มโดยใช้อาหาร Isolation medium for yeast (IMY)

ทำการแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยน้ำมันปาล์ม จากตัวอย่างและวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่ใช้อาหาร IMY (Koh และคณะ, 1983) (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมน้ำมันปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์ chloramphenical 0.00125 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมโดยการละลายใน ethyl alcohol absolute anhydrous และ rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ แทนอาหาร YM ในการแยกเชื้อ และใช้เวลาในการบ่มตัวอย่างที่นำมาคัดแยกยีสต์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ยีสต์ที่แยกได้เก็บในกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

5.2 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างที่เก็บจากทะเล

นำยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากทะเล (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 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาส่องเชื้อยีสต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการเรืองแสงรอบโคโลนี และมีสีชมพู-ส้ม

5.3 การคัดเลือกยีสต์โดยการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

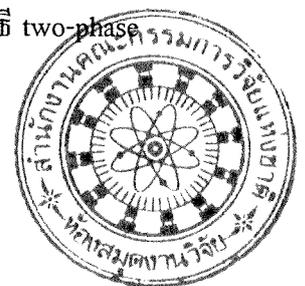
5.3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยไขมัน (hydrolysis activity)

นำยีสต์ที่แยกและคัดเลือกได้จากข้อ 5.1 และข้อ 5.2 จาก glycerol stock มาเลี้ยงในอาหารที่ใช้แยกยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ (YM หรือ IMY broth) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า คำนวณปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหาร YM broth หรือ IMY broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง นำไปบ่มโดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อแยกตะกอนและสารละลายส่วนใสออกจากกัน โดยนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการวิเคราะห์ของ Kademi และคณะ (2000) (ภาคผนวก ข) โดยนำสารละลายส่วนใสเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสับสเตรท 0.9 มิลลิลิตร 1 ส่วนกับ 9 ส่วนของสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ผสมสารละลายที่ได้อย่างรวดเร็ว วัดอัตราการย่อยสลายของ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) ที่ความยาวคลื่น 410 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ค่า extinction coefficient ของ *p*-nitrophenol เท่ากับ $12442 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ที่ pH 7.5 โดยที่ 1 ยูนิต ของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรทให้ *p*-nitrophenol อิสระ 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระด้วยวิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) (ภาคผนวก ข)

5.3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification activity) และปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification)

การเตรียมเซลล์ยีสต์

ทำการเลี้ยงยีสต์โดยนำยีสต์สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุดจาก stock culture มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารที่คัดแยกยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มโดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า คำนวณให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารที่คัดแยกยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ อยู่ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer (ภาคผนวก ก) โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า นับจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์ จะใช้ตัวเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท คำนวณปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้จากจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรที่นับได้ (ภาคผนวก ก)



แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
 คูตสารละลายส่วนใสออกให้หมด ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วคูดส่วนของเหลวที่ค้างอยู่ออกจนหมด เพื่อนำเซลล์ไปใช้ในขั้นตอน
 ต่อไป

การทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน

ทำการเตรียมสับสเตรท โดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 โมล
 (น้ำมันปาล์ม 0.5 กรัม และเมทานอล 0.054 กรัม) โดยโมลของน้ำมันพืชบริสุทธิ์ได้จากการทำ
 ปฏิกิริยาสaponิฟิเคชัน ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ในการทำ
 ปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์ จะใช้ตัว
 เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท นำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน
 microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์ที่เตรียมไว้อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่ง
 เซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่
 อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไป
 วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย
 TLC/FID (ภาคผนวก ข)

การทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

ทำการเตรียมสับสเตรท โดยชั่งกรดโอเลอิกบริสุทธิ์และเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 โมล
 (กรดโอเลอิกบริสุทธิ์ 0.5 กรัม และเมทานอล 0.169 กรัม) โดยโมลของกรดโอเลอิกบริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ
 282.47 ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ในการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเท
 อริฟิเคชันโดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์ จะใช้ตัวเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10}
 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท นำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2
 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์ที่เตรียมไว้อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่าง
 สม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศา
 เซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอส
 เทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วยเทคนิคTLC/FID (ภาคผนวก
 ข)

5.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์

ทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.3 โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสของ
 ยีนบริเวณ 28S rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล
 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nr database ของ NCBI (National Center for Biotechnology
 Information) โดยใช้โปรแกรม BLAST

5.5 ศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

นำยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตคัดเลือกได้จากข้อ 5.3 มาเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร IMY broth 100 มิลลิลิตร บ่มโดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า คำนวณให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงใน พลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร IMY broth อยู่ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 180 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 และ 180 ชั่วโมง โดยในทุกๆ 12 ชั่วโมง ที่เก็บตัวอย่างยีสต์จะเก็บครั้งละ 2 มิลลิลิตร จากพลาสติก โดยตัวอย่างที่เก็บมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาใช้นับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วย haemocytometer (ภาคผนวก ก) นำจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้มาเขียนกราฟของการเจริญ (Growth curve) ระหว่างจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้กับเวลาโดยใช้แกนตั้งเป็นจำนวนเซลล์ยีสต์ และแกนนอนเป็นช่วงเวลา ส่วนตัวอย่างที่เก็บมาอีก 1 มิลลิลิตร นำไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์ยีสต์และสารละลายส่วนใสออกจากกัน แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการวิเคราะห์ของ Kademi และคณะ (2000) (ภาคผนวก ข) โดยนำสารละลายส่วนใสเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสับสเตรท 0.9 มิลลิลิตร 1 ส่วนกับ 9 ส่วนของสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ผสมสารละลายที่ได้อย่างรวดเร็ว วัดอัตราการย่อยสลายของ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) ที่ความยาวคลื่น 410 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ค่า extinction coefficient ของ *p*-nitrophenol เท่ากับ $12442 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ที่ pH 7.5 โดยที่ 1 ยูนิท ของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรทให้ *p*-nitrophenol อิสระ 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระด้วยวิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) (ภาคผนวก ข)

5.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

5.6.1 การวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Jham *et al.*, 1982)

ทำการเตรียมตัวอย่างโดยใช้น้ำมัน 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้น ทำปฏิกิริยากับสารละลายไฮโดรคลอริกในเมทานอล (อัตราส่วน 4:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วใส่น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เพื่อแยก organic phase และ aqueous phase ออกจากกัน ต่อจากนั้นสกัดด้วย petroleum ether ปริมาตร 3 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แยก petroleum ether ซึ่งมี fatty acid methyl ester ละลาย

อยู่ในขั้นนี้ แล้ว flush N_2 จนเหลือเฉพาะส่วนของน้ำมัน ละลายส่วนน้ำมันด้วยเฮปเทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID) โดยใช้คอลัมน์ชนิด Select Biodiesel for Fame, length 30 m., 320 μ m ID, 0.25 μ m film thickness สภาวะที่ใช้ คือ ที่อัตราไหลแก๊สพาหะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะดื้อบ มีอุณหภูมิเริ่มต้น 210 องศาเซลเซียส คงที่ 12 นาที และเพิ่มอุณหภูมิ ในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส คงที่ 8 นาที ตรวจวัดสัญญาณของสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด Flame ionization

5.6.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์ม

โดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีต่างๆ ของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้ในการศึกษาชนิดน้ำมันที่เหมาะสมในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ ดังนี้

การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value) (IUPAC, 1979)

การวิเคราะห์ค่าไอโอดีนในไขมันและน้ำมัน (Iodine value) (IUPAC, 1979)

การวิเคราะห์ค่ากรดและกรดไขมันอิสระ (Acid value) (IUPAC, 1979)

การวิเคราะห์ค่าสปอนิฟิเคชัน (Saponification value) (IUPAC, 1979)

5.6.3 การเตรียมเซลล์ยีสต์

ทำการเลี้ยงยีสต์โดยนำยีสต์สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุดจาก stock culture มาเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร IMY broth 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มโดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า จำนวนให้ปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร IMY broth อยู่ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer (ภาคผนวก ก) โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า นับจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์ จะใช้ตัวเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้จากจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรที่นับได้ (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสออกให้หมด นำเซลล์ที่ได้ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสออกให้หมดอีกครั้ง เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป และเซลล์ยีสต์ที่นำไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จะ

วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระของตัวเซลล์ด้วยวิธี two-phase emulsion method ซึ่ง
ดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) (ภาคผนวก ข)

5.6.4 ผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.054 กรัม (0.07 มิลลิลิตร) โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 (โมล :โมล) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในปริมาณต่างๆ ดังนี้ 0, 2, 5, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์อยู่ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกัน อย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID analyzes (ภาคผนวก ข) เลือกปริมาณน้ำที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

5.6.5 ผลของปริมาณของเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.054 กรัม (0.07 มิลลิลิตร) โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 (โมล :โมล) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.4 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์อยู่ 1×10^{10} , 0.5×10^{10} , 1×10^9 , 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกัน อย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID analyzes (ภาคผนวก ข) เลือกปริมาณของเซลล์ยีสต์ที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

5.6.6 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.054 กรัม (0.07 มิลลิลิตร) โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 (โมล :โมล) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.4 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมี

ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2), 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID analyzes (ภาคผนวก ข) เลือกอุณหภูมิที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

5.6.7 ผลของพีเอชต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.054 กรัม (0.07 มิลลิลิตร) โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 (โมล : โมล) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.4 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 6.7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID analyzes (ภาคผนวก ข) เลือกพีเอชที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

5.6.8 ผลของชนิดของแอลกอฮอล์ที่มีผลต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม กับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ คือ เมทานอล, เอทานอล, โพรพานอล, 1-บิวทานอล และ 2-บิวทานอล ปริมาณ 0.054, 0.078, 0.102, 0.126 และ 0.126 กรัม (0.07, 0.099, 0.127, 0.156 และ 0.156 มิลลิลิตร) ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 (โมล : โมล) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสมจากข้อ 5.6.4 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.7 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 6.7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID analyzes (ภาคผนวก ข) เลือกชนิดของแอลกอฮอล์ที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

5.6.9 ศึกษาอัตราส่วนโมลของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.05, 0.07, 0.09 และ 0.11 กรัม (ปริมาตร 0.070, 0.094, 0.116 และ 0.140 มิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 (โมล : โมล) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสมจากข้อ 5.6.4 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.7 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 6.7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID analyzes (ภาคผนวก ข) เลือกอัตราส่วน โมลที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

5.6.10 ศึกษาผลของชนิดน้ำมันที่มีผลต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ น้ำมันปาล์มดิบ และ น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.110, 0.110 และ 0.105 กรัม (0.14, 0.14 และ 0.134 มิลลิลิตร) ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วน โมลน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลที่เหมาะสมจากข้อ 6.10 ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสมจากข้อ 5.6.4 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.7 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.6 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID analyzes (ภาคผนวก ข) เลือกชนิดน้ำมันที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

5.6.11 ผลของการใช้เซลล์ยีสต์ต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งชนิดน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมจากข้อ 6.11 ปริมาณ 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.110 กรัม (0.14 มิลลิลิตร) โดยมีอัตราส่วน โมลน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่เหมาะสมจากข้อ 6.10 ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสมจากข้อ 5.6.4 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.7 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มี

เซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.6.6 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ยีสต์มาแยกออกจากสับสเตรทเดิมด้วยการเซนตริฟิวส์ และเติมสับสเตรทในอัตราส่วนเดียวกันเพื่อทำปฏิกิริยาอีกครั้ง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมัน ด้วย TLC/FID analyzes (ภาคผนวก ข)

5.7 การศึกษาองค์ประกอบเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอล โดยใช้ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง

5.7.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของ Fatty acid methyl ester ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Jham *et al.*, 1982)

เตรียมตัวอย่างโดยเจือจางตัวอย่าง reaction mixture ที่ผลิตได้ด้วยเฮปแทน เป็น 10 เท่า แล้วนำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID) โดยใช้คอลัมน์ชนิด Select Biodiesel for Fame, length 30 m., 320 μm ID, 0.25 μm film thickness สภาวะที่ใช้ คือ ที่อัตราไหลแก๊สพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะตู้อบ มีอุณหภูมิเริ่มต้น 210 องศาเซลเซียส คงที่ 12 นาที และเพิ่มอุณหภูมิ ในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส คงที่ 8 นาที ตรวจวัดสัญญาณของสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด Flame ionization

5.7.2 การวิเคราะห์กรดไขมันที่เหลืออยู่ในไบโอดีเซลที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค Gas

Chromatography – Mass Spectrometry (Jham *et al.*, 1982)

7.2.1 เตรียมตัวอย่างโดยเจือจางตัวอย่าง reaction mixture ที่ผลิตได้ด้วยเฮปแทน เป็น 10 เท่า

7.2.2 วิเคราะห์กรดไขมันที่เหลืออยู่ตัวอย่าง reaction mixture ที่ผลิตได้ จากตัวอย่างข้อ 7.2.1 ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-HP 5972 Mass Selective Detector โดยใช้คอลัมน์ชนิด stabilwax, 30 m., film thickness 0.25 μm ., ID. 0.25 mm. (stationary phase ชนิด polyethylene glycol) ที่อัตราไหลของแก๊สพา เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะตู้อบ มีอุณหภูมิเริ่มต้น 120 องศาเซลเซียส คงที่ 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ไปถึงอุณหภูมิ 245 องศาเซลเซียส คงที่ 5 นาที ใช้ อุณหภูมิหัวฉีด และอุณหภูมิของแมสสเปกโตรมิเตอร์ที่ 240 และ 245 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ประมวลผลในแบบสแกนตั้งแต่ 35-500 amu และใช้ไอออไนเซชัน ชนิด Electron Ionization

5.8 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

แผนการทดลองเป็นแบบ CRD และนำผลการทดลองทั้งหมดใช้การประมวลผลโดยโปรแกรมทางสถิติ คือ โปรแกรม SPSS (Statistical Packages for the Social Science release, 14.0) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (analysis of variance ; One-Way ANOVA)