



การผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่มียีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง

**Production of alkyl esters from palm oil by transesterification reaction
catalyzed by lipase-producing yeasts**

ปริมปรัชญ์ ศรีหมาน

Purimprat Srimhan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่มีอีสต์ผลิตเอทิลไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่ง

ผู้เขียน นางสาวปริมปรัชญ์ ศรีหมาน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพรรัตน์ หงษ์ทระศิริ)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงษ์ศักดิ์กุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพรรัตน์ หงษ์ทระศิริ)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เชียรศิลป์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เชียรศิลป์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฏฐภัทร จินดา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันที่มี
ยีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง
ผู้เขียน นางสาวปริมปรัชญ์ ศรีหมาน
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

การแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน, น้ำ และกากปาล์ม จากโรงงานน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทย โดยใช้อาหาร yeast-malt medium (YM) และอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ rhodamine B เพื่อแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในขั้นตอนเดียว โดยเลือกโคโลนีที่เรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร สามารถแยกยีสต์ที่ผลิตไลเปสได้ 206 สายพันธุ์ โดยแยกได้จากอาหาร YM 117 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 89 สายพันธุ์ เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท พบยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์จำนวน 22 และ 27 สายพันธุ์ ที่แยกจากอาหาร YM และ IMY ตามลำดับ แต่เมื่อทำการวัดกิจกรรมการย่อยสลายไขมันของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี two-phase emulsion ที่ใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท พบว่ามีเพียงยีสต์สายพันธุ์ P11I89 เท่านั้นที่สามารถวัดค่ากิจกรรมด้วยวิธีนี้ได้ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3.360 ± 0.069 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท เท่ากับ 0.026 ± 0.002 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยีสต์ทั้ง 49 สายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมทานอลได้ แต่มีเพียง 16 สายพันธุ์ เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันปาล์มได้ โดยที่ยีสต์สายพันธุ์ P11I89 สามารถผลิตโอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ และเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 64.123 และ 51.260 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส 28S rDNA ยีสต์สายพันธุ์ P11I89 คือสายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* (GenBank accession number EU637076.1) มีความเหมือน (homology) เท่ากับ 99 (523/525 bp) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเจริญในระยะ Stationary phase โดยมีค่ากิจกรรม *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) และน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท เท่ากับ 0.092 ± 0.005 และ 5.502 ± 0.094 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือสภาวะที่มี

น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล อัตราส่วนโดยโมล 1:6 เป็นสับสเตรท สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท, เชลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่ง คิดเป็นกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 2.458 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ 83.633 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ลดลงเป็น 59.092 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเชลล์ยีสต์มาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซ้ำอีกครั้ง โดยเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน คือ ปาล์มมิดิกเมทิลเอสเทอร์, โอเลอิกเมทิลเอสเทอร์, ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ และ สเตียริกเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 38.18, 34.22, 10.16 และ 4.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังคงเหลือกรดไขมันชนิดกรดปาล์มมิดิก และกรดโอเลอิก 5.41 และ 1.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Thesis Title Production of alkyl esters from palm oil by transesterification reaction
 catalyzed by lipase-producing yeasts

Author Miss Purimprat Srimhan

Major Program Biotechnology

Academic Year 2008

ABSTRACT

Lipase producing yeasts were screened and isolated from soil, water and palm pressed fiber samples collected from crude palm oil factories in southern Thailand using yeast-malt medium (YM) and isolation medium for yeast (IMY) supplemented with palm oil as a carbon source. The isolation and selection of lipase producing yeast, performed simultaneously by adding 0.01 % rhodamine B to detect orange fluorescent-halo colonies as lipase-producing strains by visualization under UV light at 350 nm, yielded 206 yeast isolates, which 117 and 89 isolates were obtained from YM and IMY medium, respectively. Only 22 and 27 isolates isolated from YM and IMY medium, respectively exhibited lipase activity assayed using *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) as a substrate. Only, yeast strain P11I89 showed lipase activity measured by two-phase emulsion method using refined palm oil as a substrate with the hydrolysis activity of 3.360±0.069 U/ml whereas the activity of 0.026±0.002 U/ml was shown with *p*-nitrophenyl palmitate as a substrate. All 49 lipase-producing yeast cells exhibited the ability to catalyze esterification reaction of oleic acid and methanol. However, only 16 strains were found to catalyze transesterification reaction of refined palm oil and methanol. P11I89 yeast strain showed the highest production of oleic methyl ester and methyl ester of 64.123 and 51.260 %, respectively. Strain P11I89 was later identified based on its 28S rDNA sequence as *Rhodotorula mucilagenosa* (99% identical over 523/525 bp; GenBank accession number EU637076.1). The highest lipase activity was reached 0.092±0.005 U/ml (using *p*-nitrophenyl palmitate as a substrate) and 5.502±0.094 U/ml (two-phase emulsion method) within 120 h when the cell growth entered stationary phase.

The maximum methyl ester production of 83.633 % was achieved, when the refined palm oil transesterification was carried out in the presence of refined palm oil and methanol at the mole ratio of 1:6 with 11.38 % water (addition of 10 % phosphate buffer pH

7.0). The reaction was catalyzed using 1×10^{10} cell/g substrate of *Rhodotorula mucilagenosa* (2.458 U/ml of lipase activity) under vigorous shaking at 30°C for 72 h. Methyl ester production decreased to 59.092 % when the transesterification reaction was catalyzed by the recycled yeast cells. Major compositions of biodiesel were 38.18 % palmitic acid methyl ester, 34.22 % oleic acid methyl ester, 10.16 % linoleic acid methyl ester and 4.64 % stearic acid methyl ester with residual of fatty acids of 5.41 % palmitic acid and 1.26 % oleic acid.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(3)
ABSTRACT.....	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
LIST OF TABLES.....	(9)
LIST OF FIGURES.....	(10)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	33
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ.....	34
วัสดุ อุปกรณ์.....	34
วิธีการทดลอง.....	37
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	48
ผลการทดลอง.....	48
4. สรุปผลการทดลอง.....	110
เอกสารอ้างอิง.....	112
ภาคผนวก.....	121
ภาคผนวก ก.....	122
ภาคผนวก ข.....	125
ภาคผนวก ค.....	136
ประวัติผู้เขียน.....	147

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Comparison of biodiesel production between alkali-catalysis process and lipase-catalysis process.....	6
2. Enzymatic transesterification reactions using various types of alcohols and lipases	8
3. Properties of palm oils.....	16
4. Classification of fatty acid arrangement in triacylglycerol structure of palm oil by saturation properties.....	17
5. Percent and propertie of fatty acid of palm olein.....	20
6. Property and free fatty acid component of plant oils.....	21
7. Physical and chemical property of plant oils compared with diesel oil.....	22
8. Chemicals properties of fats and oils.....	26
9. Reported lipase producing yeasts, their cellular localization.....	31
10. Effect of pH on numbers of yeast strains obtained from water, palm pressed fiber and soil.....	50
11. Effect of temperature on numbers of yeast strains obtained from water, palm pressed fiber and soil.....	50
12. Lipase activity of lipase-producing yeasts.....	53
13. Methyl ester production from transesterification reaction and oleic methyl ester production from esterification reaction catalyzed by lipase-producing yeast cells..	57
14. Properties and fatty acid composition of palm oil.....	63
15. Fatty acid composition of palm oil.....	63
16. Qualitative compositions of fatty acid methyl ester in biodiesel.....	109
17. The appropriate weight of sample for peroxide analysis.....	128
18. The appropriate weight of sample for iodine analysis.....	130
19. Characteristics of samples collected from palm oil factories and numbers of yeast isolates isolated from YM and IMY medium.....	136

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The transesterification reactions of triglyceride with alcohol to FAME and glycerol.....	4
2. The saponification reactions of fatty acid with potassium hydroxide to potassium soap and water.....	5
3. Mechanism of the lipase-catalyzed transesterification of fatty acid to alkyl ester..	5
4. Comparison of lipase production processes for methanolysis with extracellular (a) and intracellular lipases (b).....	10
5. Structures of acylglycerol.....	17
6. Reactions between glycerol and fatty acid to triacylglycerol (a), samples of simple triacylglycerols and mixed triacylglycerols (b).....	18
7. Reactions of lipase enzyme.....	27
8. Types and reactions of lipase enzyme.....	29
9. The orange fluorescent-halo colonies were detected as lipase-producing strains by visualization under UV light at 350 nm.....	51
10. Growth of <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	60
11. Activity of lipolytic activity when used <i>p</i> -nitrophenyl palmitate as substrate (■) and two-phase emulsion method (△).....	60
12. Effect of water on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.210 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	67
13. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.210 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	67
14. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.210 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	68

LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure	Page
15. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.210 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	69
16. Effect of yeast cell concentrations on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.829, 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 and 0.003 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	72
17. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.829, 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 and 0.003 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	72
18. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.829, 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 and 0.003 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	73
19. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.829, 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 and 0.003 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	74
20. Effect of yeast cell concentrations and supernatant on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate (yeast cells) and 3.700 unit/g substrate (yeast cells+ supernatant) in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	76

LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure	Page
21. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate (yeast cells) and 3.700 unit/g substrate (yeast cells+ supernatant)in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	76
22. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate (yeast cells) and 3.700 unit/g substrate (yeast cells+supernatant) in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	77
23. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate (yeast cells) and 3.700 unit/g substrate (yeast cells + supernatant) in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	78
24. Effect of temperature on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	81
25. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	81
26. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 3.100 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	82

LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure	Page
27. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 3.100 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	83
28. Effect of pH on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.999 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	85
29. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.999 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	85
30. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.999 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	86
31. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.999 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.....	87
32. Effect of alcohol on alkyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.999 unit/g substrate in the presence of palm oil and alcohol with mole ratio 1:3 as substrates.....	90
33. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.999 unit/g substrate in the presence of palm oil and alcohol with mole ratio 1:3 as substrates.....	90

LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure	Page
34. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.999 U/g substrate in the presence of palm oil and alcohol with mole ratio 1:3 as substrates.....	91
35. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.999 U/g substrate in the presence of palm oil and alcohol with mole ratio 1:3 as substrates.....	92
36. Effect of mole ratio on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.875 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol as substrates.....	95
37. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.875 unit/g substrate in the presence of palm oil and alcohol as substrates.....	95
38. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.875 U/g substrate in the presence of palm oil and alcohol as substrates.....	96
39. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.875 U/g substrate in the presence of palm oil and alcohol as substrates.....	97
40. Type of palm oil on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	100
41. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	100

LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure	Page
42. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	101
43. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	102
44. Effect of repeated yeast cells on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 unit/g substrate in the presence of refined palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	104
45. Effect of recycled yeast cells on methyl ester production by transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	105
46. Triglyceride (A) and free fatty acid (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	106
47. 1-3 Diglyceride (A) and 1-2 Diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	107
48. Monoglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	108

LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure		Page
49.	Standard curve of palmitic acid.....	128
50.	Retention time of standard glyceride and methyl esters.....	134
51.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of standard qualitative from palm oil.....	141
52.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of qualitative from refined palm oil.....	141
53.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of qualitative from crude palm oil.....	141
54.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of qualitative from waste palm oil.....	142
55.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of standard quantitative from palm oil.....	142
56.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of quantitative from refined palm oil.....	142
57.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of quantitative from crude palm oil.....	143
58.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of quantitative from waste palm oil.....	143
59.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of standard qualitative from biodiesel.....	143
60.	Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of qualitative from biodiesel.....	144
61.	Chromatogram of GC-MS analysis of biodiesel reaction mixture.....	144
62.	Chromatogram of GC-MS of oleic acid methyl ester from reaction mixture.....	145
63.	Chromatogram of GC-MS of palmitic acid methyl ester from reaction mixture...	145
64.	Chromatogram of GC-MS of palmitic acid from reaction mixture.....	146
65.	Chromatogram of GC-MS of oleic acid from reaction mixture.....	146

บทที่ 1

บทนำ

บทนำสั้นเรื่อง

ในปัจจุบันมีความต้องการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นที่จะต้องมีการแสวงหาพลังงานจากแหล่งต่างๆ เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการ โดยเฉพาะเชื้อเพลิงที่ใช้สำหรับเครื่องยนต์ การผลิตไบโอดีเซลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเชื้อเพลิงที่ใช้สำหรับเครื่องยนต์ โดยนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาทำปฏิกิริยาเคมีด้วยแอลกอฮอล์ที่เรียกว่าปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริเฟอชัน โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งอาจจะเป็นสารเคมีที่เป็นกรด (เอซิคะตะลิสต์) หรือสารเคมีที่เป็นเบส (อัลคาไลอะดะลิสต์) แต่ปฏิกิริยาเคมีมีข้อจำกัดในการใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันได้เป็นผลิตภัณฑ์พวกสบู่ ทำให้การนำกลีเซอรอลกลับคืนมาทำได้ยาก จึงมีการนำเอนไซม์ไลเปสเข้ามาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าได้ผลดีกว่าเพราะได้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ในปริมาณสูงและนำกลีเซอรอลกลับคืนมาได้ง่าย ไม่เกิดปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันจากการที่มีกรดไขมันอยู่ในน้ำมันหรือไขมัน แต่กรดไขมันสามารถเปลี่ยนเป็นอัลคิลเอสเทอร์ได้อย่างสมบูรณ์ สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิห้องจึงทำให้ประหยัดพลังงาน แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ค่อนข้างที่จะมีต้นทุนในการผลิตสูง เพราะต้องผ่านขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และผ่านการตรึง จึงทำให้มีการศึกษาหาจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส จะได้ลดต้นทุนและขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลให้น้อยลง

ปาล์มน้ำมันเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการนำน้ำมันปาล์มไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ในภาคใต้ของไทยรัฐบาลได้ส่งเสริมให้มีการปลูกปาล์มน้ำมันกันอย่างแพร่หลาย เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในอุตสาหกรรมต่างๆ การนำน้ำมันปาล์มมาผลิตไบโอดีเซลนั้น เป็นการช่วยลดการนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศ ทำให้ประเทศไทยมีความมั่นคงทางพลังงานมากขึ้น สามารถที่จะพึ่งพาตนเองในด้านพลังงานได้ด้วยทรัพยากรที่มีอยู่แล้วในประเทศ และนำไปสู่การรักษาสภาพแวดล้อมในอีกทางหนึ่งด้วย

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น มีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ และในปัจจุบันในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มีการนำยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร สารซักฟอก ยารักษาโรค เครื่องสำอาง สิ่งทอ ฯลฯ เนื่องจากยีสต์เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงได้ง่ายและเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนั้นเอนไซม์ไลเปสที่ยีสต์ผลิตได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูง ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ โดยยีสต์จะ

ผลิตเอโนไซม์เกาะบริเวณผิวเซลล์ (cell bound) จึงทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากตัวเซลล์ในการเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (whole cell biocatalyst) ในการผลิตไบโอดีเซลได้

การตรวจเอกสาร

1. ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือ น้ำมันเชื้อเพลิงที่ผลิตจากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ โดยผ่านกระบวนการที่ทำให้โมเลกุลเล็กลง ให้อยู่ในรูปของ เอทิลเอสเทอร์ (Ethyl esters) หรือ เมทิลเอสเทอร์ (Methyl esters) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก สามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยตรง

ไบโอดีเซลได้มาจากการนำน้ำมันหรือไขมันสัตว์มาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และเอมิลแอลกอฮอล์ โดยส่วนใหญ่แอลกอฮอล์ที่นำมาใช้มากที่สุด คือเมทานอล เพราะราคาถูกและมีข้อได้เปรียบในทางฟิสิกส์และเคมี ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่ต้องการตัวเร่งปฏิกิริยา เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน กระบวนการผลิตไบโอดีเซลแบบนี้มีการใช้อย่างกว้างขวางเพื่อที่จะลดความหนืดของไดรคูลิเซอไรด์ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานของเครื่องยนต์ได้ (Gerpen, 2005)

1.1 สาเหตุของการพัฒนาไบโอดีเซลให้สามารถแทนที่น้ำมันปิโตรเลียมได้มีอยู่ 5 ประการด้วยกัน (Gerpen, 2005)

- 1) เพื่อเปิดตลาดรองรับให้กับการผลิตน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่มากขึ้น
 - 2) เพื่อลดการปล่อยของเสียที่ทำลายธรรมชาติในประเทศที่นำเข้าน้ำมันปิโตรเลียม
 - 3) ไบโอดีเซลสามารถผลิตขึ้นมาใหม่ได้และไม่ทำให้อุณหภูมิของโลกสูงขึ้นจากสาเหตุของวัฏจักรคาร์บอน จากการวิเคราะห์ไบโอดีเซลสามารถลดการปล่อย CO₂ ได้ถึง 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันปิโตรเลียม
 - 4) เครื่องยนต์จะมีการปล่อยคาร์บอนมอนอกไซด์ออกมา ซึ่งเกิดจากการสันดาปไม่สมบูรณ์และมีการปล่อยอนุภาคเล็กๆ ออกมาเมื่อใช้น้ำมันดีเซลแต่ในไบโอดีเซลจะมีการปล่อยในปริมาณที่น้อยกว่า
 - 5) เมื่อเติมน้ำมันดีเซลธรรมดาในปริมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เชื้อเพลิงมีคุณสมบัติของการหล่อลื่นลดลง เช่น ในน้ำมันดีเซลพวก Ultra-low-sulfur diesel
- ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่สามารถเผาไหม้ได้ดี เช่น มี methyl oleate ในปริมาณสูง มีระดับของ NO, HC, HCHO, CH₃CHO และ HCOOH ในปริมาณต่ำและเขม่าน้อย มี O₂ 10

เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ได้มีการวิเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซล พบว่าเหมาะที่จะนำไบโอดีเซลมาใช้เป็นเชื้อเพลิง เนื่องจากมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อเพลิงปิโตรเลียม แต่มีการคาย CO₂ เมื่อมีการเผาไหม้น้อยกว่าน้ำมันปิโตรเลียมถึง 78.45 เปอร์เซ็นต์ (Fukuda *et al.*, 2001)

1.2 การนำน้ำมันพืชมาใช้แทนน้ำมันดีเซล

การนำน้ำมันพืชมาใช้แทนน้ำมันดีเซลมีหลายวิธี คือ

1) การใช้ไขมันพืชเสมือนเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงโดยตรง

การใช้ไขมันและน้ำมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์เป็นแหล่งทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลโดยตรงมักจะใช้น้ำมันพืชเท่านั้นเนื่องจากมีคุณสมบัติที่สัมพันธ์กับการเป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่ดีและเหมาะสมกว่าไขมันสัตว์ มีประสิทธิภาพการใช้งานทดแทนสูงกว่า นอกจากนี้แล้วไขมันสัตว์มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า และมีลักษณะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญในการนำมาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลเพราะทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมไขมันสัตว์สำหรับการใช้งานโดยตรง (Ma and Hanna., 1999)

2) การเจือจางหรือการผสมตามส่วน

เชื้อเพลิงดีเซล ตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอน และแอลกอฮอล์สายสั้น ๆ การเจือจางหรือการผสมตามสัดส่วนของน้ำมันพืชสามารถนำมาละลายเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ในของเหลวบางชนิดเท่านั้น เช่น น้ำมันดีเซล ตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอนและแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่สั้น ๆ Ziejewski และคณะ (1984) ศึกษาเกี่ยวกับการเจือจางของน้ำมันดอกทานตะวัน โดยใช้น้ำมันดีเซลเป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร และผ่านการทดสอบใช้น้ำมันในเครื่องยนต์ดีเซลได้สำเร็จ แต่พบว่าน้ำมันผสมนี้ไม่ควรที่จะนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลประเภท direct injection เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากเกิดปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโค้กที่ปลายของระบบหัวฉีดอย่างรุนแรง

3) วิธีไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชันเป็นกระบวนการที่ทำให้ของเหลวมีสารแขวนลอยกระจายตัวอยู่ เช่น การผสมน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ซึ่งจะมีสภาพเป็นอิมัลชันและเมื่อนำไปใช้สามารถฉีดให้เป็นฝอยได้ แต่จะเกิดการสะสมของคาร์บอนรอบหัวฉีด จึงทำให้เกิดปัญหาต่อเครื่องยนต์ที่ใช้เชื้อเพลิงชนิดนี้ (Srivastava and Prasad, 2000)

4) วิธีการแตกตัวด้วยความร้อน

เป็นการให้ความร้อนกับน้ำมันพืชในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อให้ไขมันแตกตัวเป็น โมเลกุลที่เล็กลง ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมหรือใกล้เคียงสำหรับนำมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างเนื่องจากความร้อนของไตรกลีเซอ

ไรด์จะให้สารประกอบเคมีอินทรีย์หลายประเภท เช่น แอลเคน แอลคีน แอลคาไดอิน อะโรมาติก และกรดคาร์บอกซิลิก เป็นต้น แต่เชื้อเพลิงที่ได้จากวิธีการแตกตัวด้วยความร้อนจะไม่ใช่ที่ยอมรับ และเมื่อทดสอบเครื่องยนต์จากเชื้อเพลิงชนิดนี้ พบว่า เครื่องยนต์ใช้งานได้ในช่วงเวลาสั้นและเกิดปัญหาการกัดกร่อนเครื่องยนต์ (Srivastava and Prasad, 2000)

5) กระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์(ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน)

กระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ หมายถึง ปฏิกิริยาเคมีระหว่างไตรกลีเซอไรด์ในไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์ เพื่อก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์แอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน และกลีเซอรอล (Figure 1) กระบวนการนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อการปรับปรุงคุณภาพทางเชื้อเพลิงที่พัฒนาจากไตรกลีเซอไรด์ให้ดีขึ้น โดยเฉพาะลดค่าความหนืดของเชื้อเพลิงลง (Ma and Hanna, 1999)

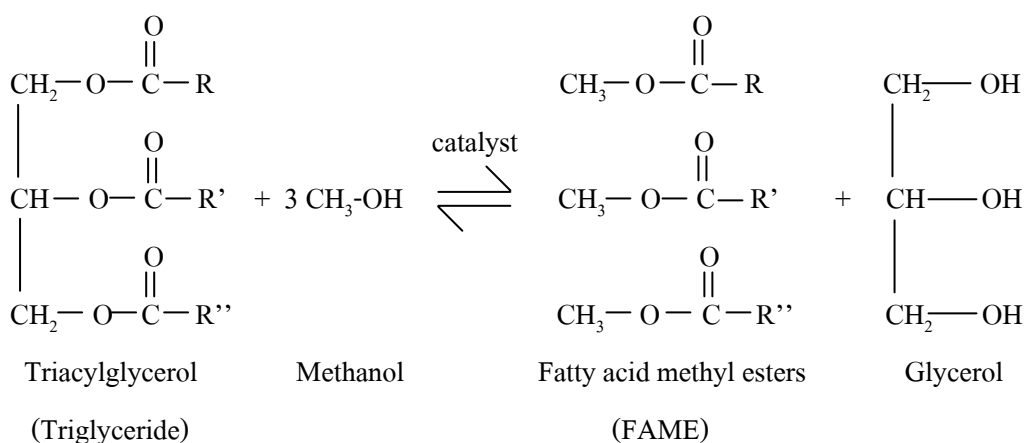


Figure 1. The transesterification reactions of triglyceride with alcohol to FAME and glycerol.

ที่มา : Zhang และคณะ (2003)

1.3 การผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เพื่อให้ได้เป็นอัลคิลเอสเทอร์ สามารถทำได้โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิด

1.3.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส

เบสที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เช่น NaOH, KOH, carbonates และ alkoxides (sodium methoxide, sodium ethoxide, sodium propoxide, sodium butoxide) สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เร็ว ใ้ช้มากในทางการค้า ในปฏิกิริยาหากมีน้ำเข้าไปก็จะเป็นสาเหตุที่ทำให้กรดไขมันส่วนหนึ่งกลายเป็นสบู่ได้ (Figure 2) เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชัน (Wright *et al.*,

1944) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน จะต้องใช้แอลกอฮอล์ 3 โมลต่อไตรกลีเซอไรด์ 1 โมลได้ เป็นกรดไขมัน 3 โมลกับกลีเซอรอล 1 โมล

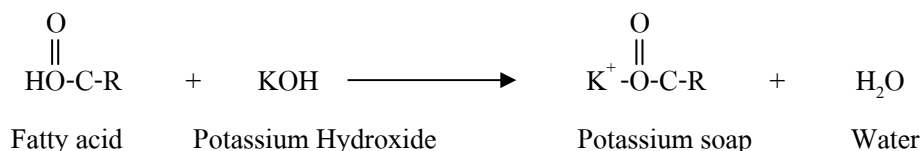


Figure 2. The saponification reactions of fatty acid with potassium hydroxide to potassium soap and water.

ที่มา : Gerpen (2005)

1.3.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด

กรดที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เช่น sulfuric, phosphoric, hydrochloric, organic acids เกิดปฏิกิริยาช้ากว่าใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันภายใต้สภาวะกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเหมาะสมสำหรับวัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนสารต่างๆ เช่น sulphur olive oil หรือ น้ำมันใช้แล้ว (Aksoy *et al.*, 1988)

1.3.3 ตัวเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์ไลเปส

การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Figure 3) มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เบสและกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาหลายประการ เช่น อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยาสามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง เก็บเกี่ยวกลีเซอรอลได้ง่าย น้ำไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชัน แต่ต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาค่อนข้างสูง (Fukuda *et al.*, 2001)

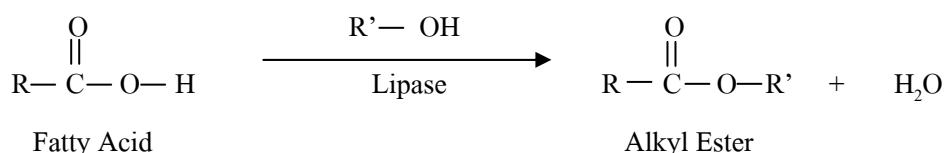


Figure 3. Mechanism of the lipase-catalyzed transesterification of fatty acid to alkyl ester.

ที่มา : Hsu และคณะ (2002)

ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Table 1) ให้มีการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ไปเป็นเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้น แต่มีข้อเสียหลายประการ เช่น แยกกลีเซอรอลออกจากเมทิลเอสเทอร์ได้ยาก กรดหรือเบสที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ จะต้องมีการบำบัดน้ำเสียที่มีเบสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย กรดไขมันอิสระและน้ำสามารถเข้าไปรบกวนปฏิกิริยา ส่วนปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไมลิปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สามารถที่จะเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ ทั้งในระบบที่มีน้ำและไม่มีน้ำ โดยเฉพาะส่วนของกลีเซอรอล สามารถที่จะแยกออกมาได้ง่าย ส่วนกรดไขมันอิสระที่อยู่ในน้ำมันที่ไม่ใช่แล้วและที่อยู่ในไขมันสามารถเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้อย่างสมบูรณ์ ในทางตรงกันข้ามต้นทุนในการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไมลิปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะมีราคาที่สูงกว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาก

Table 1. Comparison of biodiesel production between alkali-catalysis process and lipase-catalysis process.

	Alkali-catalysis process	Lipase-catalysis process
Reaction temperature	60-70 °C	30-40 °C
Free fatty acids in raw materials	Saponified products	Methyl esters
Water in raw materials	Interference with the reaction	No influence
Yield of methyl esters	Normal	Higher
Recovery of glycerol	Difficult	Easy
Purification of methyl esters	Repeated washing	None
Production cost of catalyst	Cheap	Relatively expensive

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

1.4 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเอนไซม์ไมลิปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1.4.1 Extracellular lipases

ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปลา และไขมันสัตว์กับเอทานอลได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทิลเอสเทอร์สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ไลเปสจาก *Mucor miehei* (Selmi and Thomas, 1998), *Candida antarctica* (Breivik *et al.*, 1997) และ *Pseudomonas cepacia* (Wu *et al.*, 1999) ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายยาวได้ดีกว่าแอลกอฮอล์สายสั้น (Shimada *et al.*, 1997) ดังนั้น โดยทั่วไปปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

ของไตรกลีเซอไรด์โดยใช้เมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ มีแนวโน้มที่จะได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ต่ำกว่าการใช้เอทานอลทั้งในระบบที่มีตัวทำละลายและไม่มีตัวทำละลาย ชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถใช้แอลกอฮอล์ได้ทั้งชนิดปฐมภูมิ ทุกชนิดชนิดที่เป็นแอลกอฮอล์สายตรง และแอลกอฮอล์โซ่กิ่ง (Fukuda *et al.*, 2001) ดังแสดงใน Table 2

Linko และคณะ (1998) ศึกษาผลิตภัณฑ์ของ biodegradable esters และ polyesters โดยใช้ไลเปสจาก *Candida rugosa* เป็นคะตะลิสต์ ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของ rapeseed oil ด้วย 2-ethyl-1-hexanol สามารถเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ 97 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของ De และคณะ (1999) ศึกษาการเปลี่ยน fatty alcohol esters ($C_4-C_{18:1}$) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor miehei* ที่ถูกตรึง (Lipozyme IM-20) ในระบบที่ไม่มีตัวทำละลาย ได้แอลกอฮอล์เอสเทอร์ในช่วง 86.8-99.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อมีการเพิ่มจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นสายที่ยาวขึ้นจาก C_4-C_{18} ผลผลิตที่ได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและใน fatty alcohol esters ที่ไม่อิ่มตัว ($C_{18}-C_{18:1}$) ผลิตภัณฑ์จะลดลงไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งชนิดของแอลกอฮอล์ก็เป็นส่วนสำคัญในการผลิตไบโอดีเซล

Nelson และคณะ (1996) ได้ศึกษาความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยแอลกอฮอล์สายสั้น โดยใช้ไลเปสจาก *Mucor miehei* พบว่า มีประสิทธิภาพมากในการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ไปเป็นอัลคิลเอสเทอร์ด้วยแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ในขณะที่ *Candida antarctica* มีประสิทธิภาพมากในการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ไปเป็นอัลคิลเอสเทอร์แบบโซ่กิ่งด้วย แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ อัลคิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยแอลกอฮอล์ปฐมภูมิพวกเมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และไอโซบิวทานอล จะอยู่ในช่วง 94.8-98.5 เปอร์เซ็นต์ และเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ พวกไอโซโพรพานอลและ 2-บิวทานอล จะอยู่ในช่วง 61.2-83.8 เปอร์เซ็นต์ โดยในกระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชันมีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และในระบบที่ไม่มีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย พบว่า ผลผลิตลดลงทั้งในปฏิกิริยาที่ใช้เมทานอลและเอทานอล โดยเฉพาะในปฏิกิริยาที่ใช้เมทานอล ผลผลิตลดลงถึง 19.4 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลาย ผลผลิตของอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้จะแตกต่างกันไป

ดังผลการศึกษาของ Mittelbach (1990) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ พวกเมทานอล เอทานอลและ 1-บิวทานอล ทั้งในปฏิกิริยาที่มี petroleum ether เป็นตัวทำละลายและในปฏิกิริยาที่ไม่มี petroleum ether เป็นตัวทำละลาย ได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงถึง 72 เปอร์เซ็นต์ จากปฏิกิริยาที่ใช้เอทานอล และ 1-บิวทานอล แต่ในปฏิกิริยาที่ใช้เมทานอลได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ในปริมาณน้อยเพียงแค่ว่า 15 เปอร์เซ็นต์

Table 2. Enzymatic transesterification reactions using various types of alcohols and lipases.

Oil	Alcohol	Lipase	Conversion (%)	Solvent
Rapeseed	2-Ethyl-1-hexanol	<i>C. rugosa</i>	97	None
Mowrah, Mango, Kernel, Sal	C ₁₄ - C _{18:1} alcohols	<i>M. meihei</i> (Lypozyme IM-20)	86.8-99.2	None
Sunflower	Ethanol	<i>M. meihei</i> (Lypozyme)	83	None
Fish	Ethanol	<i>C. antarctica</i>	100	None
Recycled restaurant grease	Ethanol	<i>P. cepacia</i> (Lipase PS-30) + <i>C. antarctica</i> (Lipase SP435)	85.4	None
Tallow, Soybean, Rapeseed	Primary alcohols ^a	<i>M. meihei</i> (Lypozyme IM60)	94.8-98.5	Hexane
	Secondary alcohols ^b	<i>C. antarctica</i> (SP435)	61.2-83.8	Hexane
	Methanol	<i>M. meihei</i> (Lypozyme IM60)	19.4	None
	Ethanol	<i>M. meihei</i> (Lypozyme IM60)	65.5	None
Sunflower	Methanol		3	None
	Methanol	<i>P. fluorescens</i>	79	Petroleum ether
	Ethanol		82	None
Palm kernel	Methanol	<i>P. cepacia</i> (Lipase PS-30)	15	None
	Ethanol		72	None

^a Methanol, ethanol, propanol, butanol and isobutanol

^b Isopropanol and 2-butanol

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Abigor และคณะ (2000) ศึกษาการเปลี่ยนน้ำมันปาล์มไปเป็นอัลคิลเอสเทอร์ด้วยเอทานอลโดยใช้ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ให้ผลผลิตสูงถึง 72 เปอร์เซ็นต์ แต่ในปฏิกิริยาที่ใช้เมทานอลได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์เพียง 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

1.4.2 Intracellular lipases (Whole cell biocatalyst)

ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาประเภท extracellular enzyme ต้องการเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ ซึ่งกระบวนการทำบริสุทธิ์ก่อนข้างที่จะซับซ้อน

และยุ่งยาก นอกจากนี้เอนไซม์โดยทั่วไปแล้วจะไม่เสถียรและมีราคาแพง จึงได้มีการศึกษาการนำเอนไซม์มาใช้โดยตรงที่เรียกว่า whole cell biocatalyst (Kondo *et al.*, 2000)

การใช้ประโยชน์จาก whole cell biocatalyst ควรทำให้อยู่ในรูปแบบที่สะดวกต่อการนำไปใช้ โดยการนำเซลล์มาตรึง เช่น การตรึงเซลล์ในของแข็ง และเมื่อผ่านการตรึงแล้วก็ยังสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์ทางเคมีทั่วไปได้ วิธีการตรึงเซลล์มีหลากหลายวิธีด้วยกัน อย่างเช่นการตรึงเซลล์ด้วย biomass support particles (BSPs) ซึ่งวิธีนี้ถูกพัฒนาโดย Atkinson และคณะ (อ้างโดย Fukuda *et al.*, 2001) ข้อดีของการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้ whole cell biocatalyst ที่ตรึงรูปแล้วเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตเมทิลเอสเทอร์วิธีอื่นๆ คือ

- ไม่ต้องเติมสารเคมีในปฏิกิริยา เช่น NaOH
- มีการถ่ายเทมวลของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ภายในตัวตรึง
- สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก
- มีความทนทานและทนต่อแรงเฉือนทางกล
- สามารถเพิ่มขนาดการผลิตได้ง่าย
- ต้นทุนการผลิตต่ำเมื่อเทียบกับวิธีอื่น

จาก Figure 4 เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการผลิตเอนไซม์ไลเปสแบบ extracellular และแบบ intracellular (whole cell biocatalyst) จะเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสแบบ intracellular ไม่ต้องผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์หรือกระบวนการตรึงเอนไซม์ โดยการเตรียม whole cell biocatalyst ด้วยการตรึงใน biomass support particles (BSPs) สามารถทำได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบกะ (Fukuda *et al.*, 2001)

1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

1) แอลกอฮอล์

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันชนิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส ซึ่งในการทำปฏิกิริยาแอลกอฮอล์เป็นส่วนหนึ่งของสับสเตรทที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันหรือน้ำมันแล้วได้เป็นผลผลิตในรูปแบบของเอสเทอร์และกลีเซอรอล นอกจากนั้นชนิดของแอลกอฮอล์ยังมีผลต่อผลผลิตของอัลคิลเอสเทอร์อีกด้วย โดย Kaieda และคณะ (2001) ศึกษาผลของปริมาณเมทานอลในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* พบว่าสามารถทนต่อปริมาณเมทานอลที่สูงกว่าเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เมื่อเติมเมทานอล 2 และ 3 โมลาร์

ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 66 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากความสำคัญของชนิดของ แอลกอฮอล์ Chen และคณะ (2003) ศึกษาผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้แอลกอฮอล์แบบโซ่ตรง เมทานอล, เอทานอล, โพรพานอล และบิวทานอล

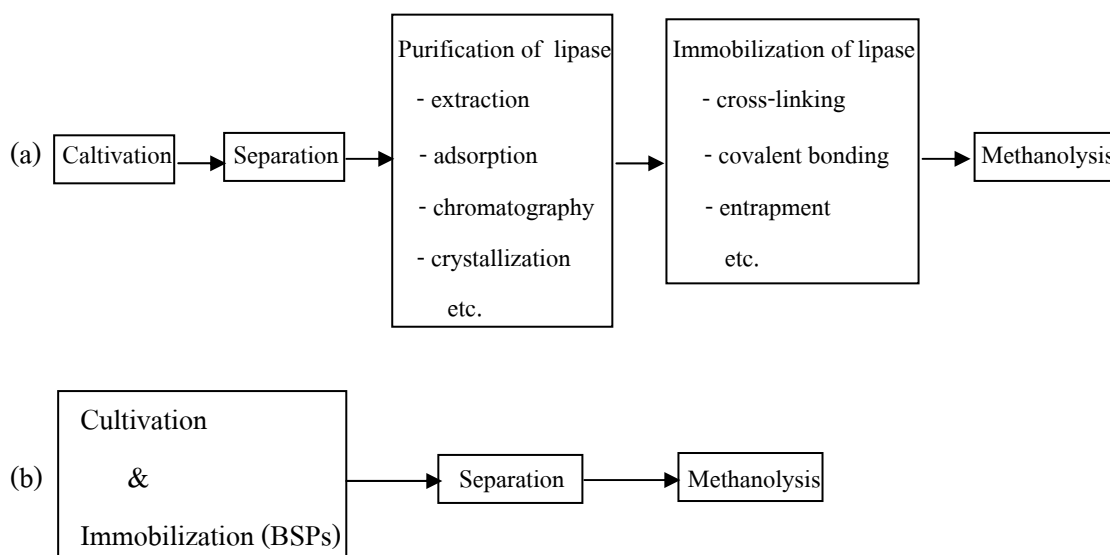


Figure 4. Comparison of lipase production processes for methanolysis with extracellular (a) and intracellular lipases (b).

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

แอลกอฮอล์แบบโซ่กิ่ง ไอโซโพรพานอล, 2-บิวทานอล และไอโซบิวทานอล พบว่าแอลกอฮอล์แบบโซ่ตรงจะทำให้เอนไซม์เกิดการเสถียรภาพเมื่อเพิ่มปริมาณของแอลกอฮอล์สูงขึ้น แต่ในแอลกอฮอล์โซ่กิ่งผลของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ทำให้เอนไซม์เสถียรภาพต่ำกว่าในแอลกอฮอล์โซ่ตรงเมื่อเพิ่มปริมาณของแอลกอฮอล์สูงขึ้น ในส่วนของ Kose และคณะ (2002) ศึกษาผลของชนิดแอลกอฮอล์ที่มีผลต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ โดยศึกษาในแอลกอฮอล์ต่อไปนี้ เมทานอล, โพรพานอล, บิวทานอล, เอมีลแอลกอฮอล์, ไอโซโพรพานอล และไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ พบว่าแอลกอฮอล์ที่ให้ผลผลิตของอัลคิลเอสเทอร์มากที่สุด คือ ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ ให้ผลผลิตเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแอลกอฮอล์ที่ให้ผลผลิตของอัลคิลเอสเทอร์ต่ำที่สุด คือ ไอโซโพรพานอล ให้ผลผลิตเท่ากับ 72.3 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Abigor และคณะ (2000) ศึกษาการเปลี่ยนน้ำมันปาล์มดิบเป็นอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้แอลกอฮอล์คือเอทานอล, *tert*-butanol, 1-butanol, n-propanal และ isopropanal จะได้ผลผลิตเป็นอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับ 72, 62, 42, 42 และ 24

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบคุณสมบัติของไบโอดีเซลมีความหนืด (Viscosity) เท่ากับ 32.40 ตารางเมตรต่อวินาที ค่าจุดน้ำมันเป็นฝ้า (Cloud point) เท่ากับ 28 องศาเซลเซียส และค่าจุดไหลเท (Pour point) เท่ากับ 8 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นการผลิตไบโอดีเซลจากไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์สายสั้น จำพวกเมทานอล เอทานอล โดยใช้ครึ่งไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น 1,4-dioxane ในปฏิกิริยาจะทำให้ได้ผลผลิตของไบโอดีเซลประมาณ 73 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าใช้แอลกอฮอล์ที่มีสายยาวขึ้นผลผลิตที่ได้ก็มีปริมาณใกล้เคียงกันโดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยา (Iso *et al.*, 2001) ในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ เมื่อใช้ไลเปสจาก *Candida cylindracea* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเมื่อใส่ตัวทำละลายอินทรีย์ *n*-hexane และใช้แอลกอฮอล์สายสั้น เมื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเป็นอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับ 78 ± 6 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้แอลกอฮอล์เป็น 1-butanol ได้ผลผลิตเป็นอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 8 ชั่วโมง (Lara and Park, 2004)

2) ปริมาณน้ำ

ในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นปริมาณน้ำมีความสำคัญ เพราะสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดสบู่จากปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชันซึ่งเกิดจากการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ ปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้เป็นตัวเร่ง Kaieda และคณะ (2001) ศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยามะทาโนไลซิสโดยใช้ไลเปสจาก *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าใน *Candida rugosa* จะสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีปริมาณน้ำ 2.4-6.0 มิลลิลิตรของน้ำหนักสับสเตรท ใน *Pseudomonas fluorescens* จะสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีปริมาณน้ำ 1.2-6.0 มิลลิลิตรของน้ำหนักสับสเตรท และใน *Pseudomonas cepacia* จะสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีปริมาณน้ำ 0.3-6.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปส Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยามะทาโนไลซิส พบว่า เมื่อเติมน้ำ 0.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรทปฏิกิริยามะทาโนไลซิสจะเกิดได้อย่างรวดเร็วกว่าการเติมน้ำที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท (Samukawa *et al.*, 2000) ในส่วนของ Kaieda และคณะ (1999) ศึกษาผลของปริมาณน้ำซึ่งมีความสัมพันธ์กับเวลาในการทำปฏิกิริยามะทาโนไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* พบว่า ที่ปริมาณน้ำ 1.2-9.0 มิลลิลิตรจะได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ 80-90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำปฏิกิริยาผ่านไป 70 ชั่วโมง เมื่อเติมน้ำ 1.8 มิลลิลิตร จะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุดที่ 90.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 67 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้ามเมื่อเติมน้ำลงไป 0.9 มิลลิลิตร จะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เพียง 73.3 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 180 ชั่วโมง เมื่อใช้ 1-โพรพานอลและไตรโอเลอินเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาโดยมีเอนไซม์

ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เป็นตัวเร่ง พบว่าเมื่อเติมน้ำปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาณสับสเตรท จะให้ผลผลิตของอัลคิลเอสเทอร์สูงสุดประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (Iso *et al.*, 2001) นอกจากนั้นปริมาณน้ำยังมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากการศึกษาปริมาณน้ำที่มีผลต่อ การผลิตอัลคิลเอสเทอร์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 40 ไมโคร โมลต่ออนาที เมื่อ เติมน้ำลงไป 0.48 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะลดลงเมื่อ เติมน้ำมากขึ้น (Salis *et al.*, 2005) โดย Kaieda และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ พบว่า เมื่อใช้ *Pseudomonas cepacia* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะใช้เวลาประมาณ 90 ชั่วโมงในการผลิตเมทิล เอสเทอร์ ได้ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีน้ำเพียง 0.3 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักสับสเตรท ในขณะที่เมื่อใช้ *Candida rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะมีเมทิลเอสเทอร์ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีน้ำ 1.2 มิลลิลิตรต่อ น้ำหนักสับสเตรท

3) Reaction time

อัตราการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยา (Freedman *et al.*, 1984) จากที่ Kose และคณะ (2002) ศึกษาเวลาในการทำปฏิกิริยาของการเปลี่ยน น้ำมันเป็นเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ โดยศึกษาที่เวลาต่อไปนี้ 2, 4, 7, 10, 15 และ 24 ชั่วโมง พบว่าตั้งแต่เวลา 7 ชั่วโมงเป็นต้นไปจะได้เมทิลเอสเทอร์สูงขึ้นไปถึง 92.2 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่เวลา 2 ชั่วโมง ได้เมทิลเอสเทอร์เพียง 79.9 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Salis และ คณะ (2005) พบว่า การผลิตไบโอดีเซลจากไตรโอเลอิน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยที่เวลา 1, 2 และ 4 ชั่วโมง จะได้อัลคิลเอสเทอร์เท่ากับ 70, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปัจจัยในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ นอกจากชนิดของแอลกอฮอล์และ ปริมาณน้ำแล้ว เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันก็มีส่วนสัมพันธ์โดยตรงกับ ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์อีกด้วย

4) ความเข้มข้นของเอนไซม์

Sanchez และ Vasudevan (2006) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อปฏิกิริยามេทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันมะกอกและเมทานอล อัตราส่วน 1:8 (โมล:โมล) โดยใช้เอนไซม์จาก *Candida antarctica* (Novozyme 435) ปริมาณ 500, 1000, 2000 และ 3000 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ผลผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ เอนไซม์ 500-2000 ยูนิต จะได้เมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ เอนไซม์มากกว่า 2000 ยูนิต เปอร์เซ็นต์ผลผลิตจะคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณของ เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยามេทาโนไลซิสของ Kaieda และคณะ

(1999) พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 25 ยูนิตของไลเปสต่อ 10 กรัมของสับสเตรท อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะสูงขึ้นและอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นจะเริ่มคงที่เมื่อมีปริมาณเอนไซม์เป็น 60 ยูนิตของไลเปสต่อ 10 กรัมของสับสเตรท

5) อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อแอลกอฮอล์

โดยทางทฤษฎีแล้ว สมดุลมวลสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ที่สมบูรณ์นั้น ต้องประกอบด้วยอัตราส่วนโมลของสารตั้งต้นระหว่างแอลกอฮอล์และน้ำมัน เป็น 3 โมล ต่อ 1 โมล แต่ในทางปฏิบัติพบว่าปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์สามารถผันกลับได้ ถ้าต้องการอัลคิลเอสเทอร์มากขึ้น ต้องเพิ่มจำนวน โมลของแอลกอฮอล์มากขึ้นด้วย เพื่อทำให้เกิดภาวะสมดุลเลื่อนเข้าใกล้อัลคิลเอสเทอร์มากที่สุด ปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์สามารถเพิ่มอัตราเร็วด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ ทั้งเบส กรด และเอนไซม์ไลเปส (Ma and Hanna, 1999) Kose และคณะ (2002) ศึกษาอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ ซึ่งแอลกอฮอล์ที่ใช้คือเมทานอล มีเอนไซม์จาก *Candida antarctica* ที่ผ่านการตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยศึกษาอัตราส่วนโมล ดังนี้ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 พบว่า ที่อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:1 ได้ผลผลิตเพียง 29.9 เปอร์เซ็นต์ และที่อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะให้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 87.4 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ที่สัดส่วนต่างๆ ของ Lara และ Park (2004) พบว่าที่อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:4 จะได้ผลผลิตเป็นอัลคิลเอสเทอร์สูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อใช้อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:6 แอลกอฮอล์จะยับยั้งปฏิกิริยาและเกิดผลิตภัณฑ์เพียง 40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เช่นเดียวกับ Du และคณะ (2003) ศึกษาอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ โดยมีอัตราส่วน ดังนี้ 1:3, 1:4 และ 1:5 พบว่าที่อัตราส่วนโมล 1:4 จะให้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์ และที่อัตราส่วนโมล 1:3 และ 1:5 จะลดผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์เหลือเพียง 80 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการศึกษาอัตราส่วนโมลน้ำมัน (ไตรโอเลอิน) ต่อแอลกอฮอล์ (บิวทานอล) โดยมีอัตราส่วนโมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ดังนี้ 1:3, 1:6, 1:9 และ 1:12 พบว่าอัตราส่วนโมลไตรโอเลอินต่อบิวทานอลที่ดีที่สุดคือ อัตราส่วนโมล 1:3 และ 1:6 ซึ่งสามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของบิวทิลโอเลอเทปได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และในอัตราส่วนโมล 1:9 และ 1:12 จะใช้เวลาในการเกิดเป็นบิวทิลโอเลอเทปประมาณ 5-6 ชั่วโมง (Salis *et al.*, 2005) นอกจากนี้การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ใช้แล้ว โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าการใช้เมทานอลจะทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ช้า แต่ปฏิกิริยามะทาโนไลซิสดีขึ้นเมื่อใช้ระบบกะแบบ Two-step ดังนี้ ใช้อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เป็น 1:3, 2:3 ในครั้งที่หนึ่งและสองตามลำดับ ในระบบกะแบบ Three-step ใช้อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เป็น 1:3, 1:3 และ

1:3 ในครั้งที่หนึ่ง, สองและสาม ตามลำดับ ซึ่งได้ผลผลิตของไบโอดีเซลในระบบกะแบบ Two-step และ Three-step มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Shimada *et al.*, 2002) สอดคล้องกับการทดลองเปลี่ยนน้ำมันถั่วเหลืองเป็นไบโอดีเซลโดยตรงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยามทานไลซิสแบบ Three-step โดยใช้อัตราส่วนโมลของน้ำมันถั่วเหลืองต่อเมทานอลเป็น 1:3, 1:3 และ 1:3 ในหนึ่งรอบของการทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 93.8 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำเอนไซม์ไลเปส กลับมาใช้ได้อีกถึง 25 รอบของการทำปฏิกิริยาโดยที่ไม่สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ (Watanabe *et al.*, 2002)

6) อุณหภูมิ

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันที่ใช้ (Ma and Hanna, 1999) จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ มีเอนไซม์จาก *Candida antarctica* ที่ผ่านการตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์สูงสุดที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส มีผลผลิตเท่ากับ 91.5 และ 90.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง (Kose *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับผลของ Du และคณะ (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ศึกษาที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจะให้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะให้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ต่ำสุด เท่ากับ 63 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไตรโกลีอีน ที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงและผลผลิตจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 50 องศาเซลเซียส (Salis *et al.*, 2005)

2. ปาล์มน้ำมัน (Palm Oil)

ประเทศมาเลเซียเป็นประเทศที่ทำการปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุดในโลก มีพื้นที่ที่ให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันประมาณ 23 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 68 ล้านตัน สำหรับประเทศไทยมีพื้นที่การเพาะปลูกปาล์มที่ให้ผลเก็บเกี่ยวได้ประมาณ 1.94 ล้านไร่ ให้ผลผลิตทะลายปาล์มสด 5.2 ล้านตันในปี พ.ศ. 2547 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศ ในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ ตรัง สงขลา และสตูล โดยปาล์มน้ำมันที่ปลูกในประเทศไทยจะให้ผลผลิตปาล์มสดเฉลี่ย 2.7 ตันต่อไร่ ในขณะที่ประเทศมาเลเซียให้ผลผลิตเฉลี่ย 3.06 ตันต่อไร่ (พิสมัย เจนวนิชปัญญกุลและลลิตา อันทนโต, 2549)

ทะลายปาล์มสดประกอบด้วยผลปาล์มจำนวนมากเกาะติดอยู่บนก้านทะลาย น้ำมันเป็นส่วนที่ได้จากผลปาล์ม ซึ่งผลปาล์มน้ำมันจะให้ไขมัน 2 ชนิด คือน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม น้ำมันปาล์มเป็นส่วนที่สกัดได้จากส่วนเปลือกนอกของผลปาล์ม ขณะที่น้ำมันเมล็ดในปาล์มสกัดได้จากเมล็ดในของผลปาล์ม โดยทั่วไปแล้วทะลายปาล์มสดมีน้ำมันปาล์มอยู่ในปริมาณ 20-21 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการผลิตในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มของประเทศ โดยเฉลี่ยแล้วปัจจุบันสามารถสกัดน้ำมันออกได้เพียง 17 เปอร์เซ็นต์ จากทะลายปาล์มสด สำหรับเมล็ดในปาล์มมีน้ำมันอยู่ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ทะลายปาล์มสด หรือมีอยู่ในปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดในปาล์ม

น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม มีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันอย่างมากระหว่างกัน โดยน้ำมันปาล์มมีกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16 ตัว (กรดปาล์มมิก, palmitic acid) เป็นองค์ประกอบหลัก 44 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่น้ำมันเมล็ดในปาล์มจะมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับน้ำมันมะพร้าว กล่าวคือ มีกรดไขมันที่มีคาร์บอน 12 ตัว (กรดลอริก, lauric acid) เป็นองค์ประกอบหลัก 50.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันเมล็ดในปาล์มมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวถึง 78.82 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันปาล์มมีเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 48.05 และ 51.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 3) และมีลักษณะเป็นของเหลวปะปนอยู่กับของแข็ง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำน้ำมันปาล์มมาบรรจุขวดจำหน่ายเพื่อใช้ในการประกอบอาหาร จะต้องทำให้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ โดยการกำจัดกรด กำจัดสี และกลิ่นก่อน จากนั้นจึงทำการแยกส่วนของเหลวและของแข็งออกจากกัน ส่วนที่เป็นของเหลวที่แยกออกมาเรียกว่า น้ำมันปาล์มโอลีน สำหรับส่วนที่เป็นของแข็งเรียกว่า ปาล์มสเตียรีนหรือไฮสเตียรีน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทำเนยเทียม ครีมเทียม และสบู่ โดยทั่วไปแล้ว น้ำมันปาล์มโอลีน และปาล์มสเตียรีน มีปริมาณเป็นสัดส่วนระหว่าง 65-70 เปอร์เซ็นต์ ต่อ 30-35 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตของแต่ละโรงงาน

ประเทศไทยมีการนำเข้าและส่งออกน้ำมันปาล์มในรูปแบบของน้ำมันปาล์มดิบ การส่งออกน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของน้ำมันเมล็ดในปาล์มชนิดดิบและไฮปาล์มสเตียรีน (palm stearin) ถึงแม้ว่าปาล์มน้ำมันจะมีพื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตต่อไร่สูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ แต่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ปลูกขึ้นเพื่อเป็นอาหารเท่านั้น ไม่มีปริมาณมากพอที่จะใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล ในขณะที่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้มียุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมันส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมัน โดยขยายพื้นที่เพาะปลูกอีก 4 ล้านไร่ ภายในปี พ.ศ. 2552 เพื่อป้องกันการผลิตไบโอดีเซลตามแผนปฏิบัติการ ไบโอดีเซลของยุทธศาสตร์พลังงานทดแทนที่มีเป้าหมายความต้องการไบโอดีเซล 8.5 ล้านลิตรต่อวัน ภายในปี พ.ศ. 2555

Table 3. Properties of palm oils.

	Palm	Palm kernel
Iodine Value	43-59	14-20
Acid Value	15	20
Saponification Value	195-210	240-257
Unsaponification matter (%)	1	1
Total saturated fatty acid (%)	48.05	78.82
Total unsaturated fatty acid (%)	51.95	21.18

ที่มา : ดัดแปลงจาก ไพจิตร จันทรวงศ์ (2530)

3. เอซิลกลีเซอรอล

เอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) เป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อ พบได้ทั่วไปในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ สามารถแบ่งเอซิล กลีเซอรอลออกได้เป็น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และ โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) ดังแสดงใน Figure 5

3.1 ไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols)

ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์หรือไขมันและน้ำมันเป็นไตรเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 3 โมเลกุล เนื่องจากโมเลกุลของกลีเซอรอลมีตำแหน่งที่กรดไขมันจะเข้าไปเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ถึง 3 ตำแหน่ง (Figure 6a) ทำให้ได้ไตรเอซิลกลีเซอรอลหลายชนิด ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่โมเลกุลประกอบด้วยกรดไขมันชนิดเดียวกันทั้ง 3 โมเลกุลเรียกว่า simple triacylglycerols หากประกอบด้วยกรดไขมันต่างชนิดกันเรียกว่า mixed triacylglycerols (Figure 6b) ในธรรมชาติไตรกลีเซอไรด์ที่โมเลกุลประกอบด้วยกรดไขมันชนิดเดียวกันทั้งหมดมีน้อยมาก ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดไขมันต่างชนิดกันทำให้ได้ไขมันและน้ำมันต่างชนิดกันด้วย ซึ่งไขมันและน้ำมันแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และผันแปรไปตามชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ในน้ำมันปาล์มมีโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว 2 ตำแหน่งมากที่สุดร้อยละ 48 รองลงมา คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว 2 ตำแหน่งร้อยละ 34.6 ดังแสดงใน Table 4 ซึ่งลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลมีผลโดยตรงกับการตกผลึกของน้ำมัน

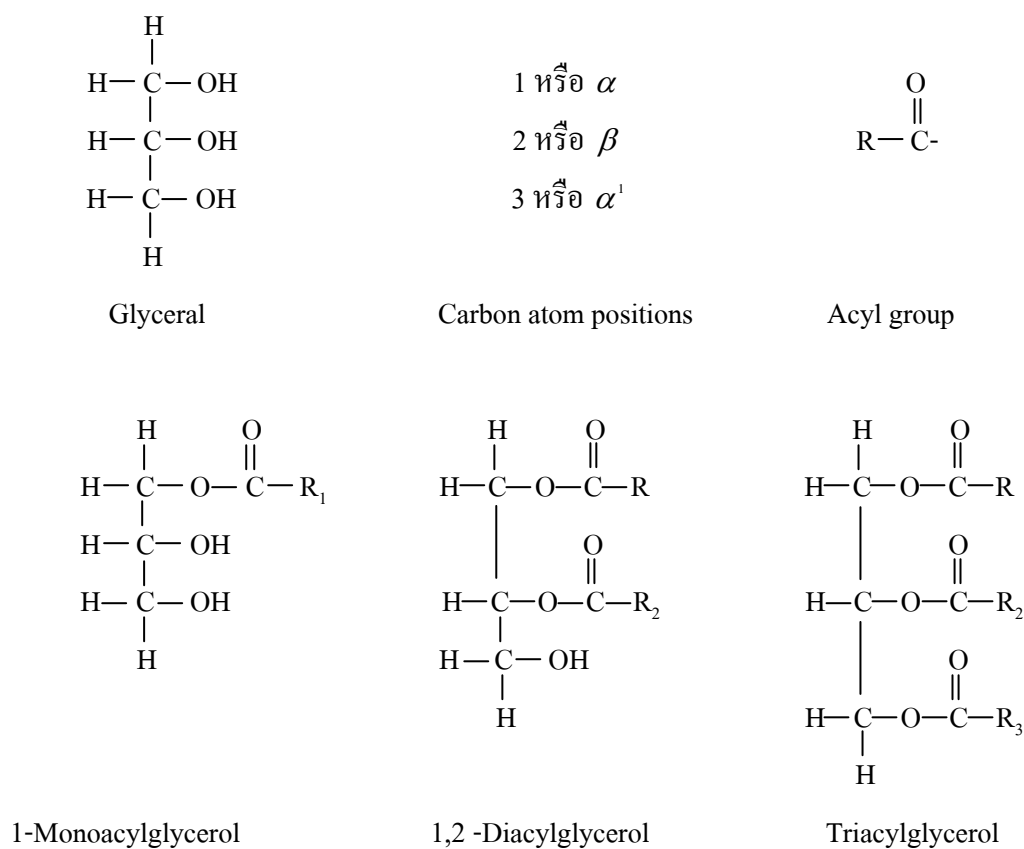


Figure 5. Structures of acylglycerol.

ที่มา : อาภัสสรฯ ชมิดท์ (2537)

Table 4. Classification of fatty acid arrangement in triacylglycerol structure of palm oil by saturation properties.

Triglyceride Types	Composition (%)
Trisaturated (GS ₃)	10.2
Disaturated (GS ₂ U)	48.0
Monosaturated (GSU ₂)	34.6
Triunsaturated (GU ₃)	6.8

ที่มา : Hui (1996)

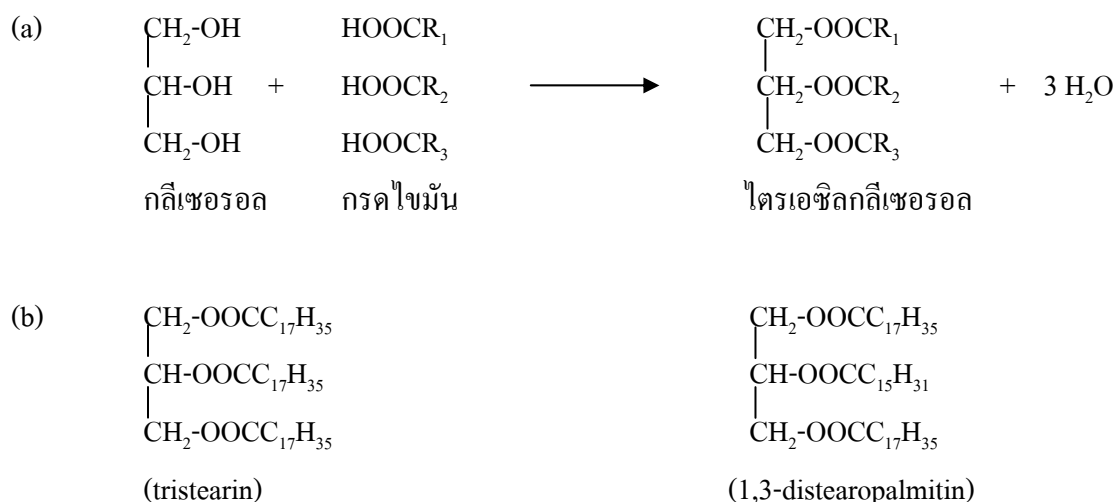


Figure 6. Reactions between glycerol and fatty acid to triacylglycerol (a), samples of simple triacylglycerols and mixed triacylglycerols (b)

ที่มา : นิธิยา รัตนานพนธ์ (2541)

3.2 โมโน-และไดเอซิลกลีเซอรอล (Mono- and Di-acylglycerols)

โมโน-และไดเอซิลกลีเซอรอล เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันเพียงหนึ่งและสองโมเลกุลตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ ถ้าเป็นไดเอซิลกลีเซอรอลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่เพียง 1 หมู่ กลีเซอไรด์ทั้งสองชนิดนี้จะไม่พบในไขมันและน้ำมันพืชที่ได้จากธรรมชาติ แต่จะพบในไขมันหรือน้ำมันที่เกิดการไฮโดรไลซิสอย่างไม่สมบูรณ์

โมโน-และไดเอซิลกลีเซอรอลนั้นเตรียมได้จากปฏิกิริยาของไขมันหรือน้ำมันกับกลีเซอรอลโดยใช้ไตรเอซิลกลีเซอรอลมา 1 ส่วน รวมกับกลีเซอรอล 5 ส่วนโดยน้ำหนัก นำส่วนผสมไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 400 องศาฟาเรนไฮด์ และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โมเลกุลของกรดไขมันจะย้ายออกจากโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลไปยังโมเลกุลของกลีเซอรอลทำให้มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ที่โมเลกุลของกลีเซอรอล ผลของปฏิกิริยาจะมีส่วนผสมของโมโน-และไดเอซิลกลีเซอรอล ปฏิกิริยานี้ต้องทำภายใต้ก๊าซเฉื่อย หรือทำภายใต้สุญญากาศเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดออกซิเดชัน ปฏิกิริยานี้เรียกว่ากลีเซอโรไลซิส (glycerolysis)

โมโนเอซิลกลีเซอรอลสามารถแยกออกจากไดเอซิลกลีเซอรอลและไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ โดยวิธีการกลั่น ในอุตสาหกรรมจะเตรียมโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้บริสุทธิ์ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แอลฟา-โมโนเอซิลกลีเซอรอลมีความคงตัวมากกว่าบีตา-โมโนเอซิลกลีเซอรอล ส่วนไดเอซิลกลีเซอรอลมักจะเป็น α และ α' ไดเอซิลกลีเซอรอล

เนื่องจากโมเลกุลของโมโน-และไดเอซิลกลีเซอรอลมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ทำให้สามารถละลายได้ในน้ำ (hydrophilic) และมีส่วนไฮโดรคาร์บอนที่ละลายได้ในไขมัน (hydrophobic หรือ lyophilic) ทำให้โมโน-และไดเอซิลกลีเซอรอล มีส่วนที่ละลายได้ทั้งในน้ำและในน้ำมันจึงมีสมบัติเป็นอิมัลซิฟายิ่งเอเจนต์ (emulsifying agent) ที่ดีทำหน้าที่ช่วยในกระบวนการย่อยและดูดซึมไขมันและน้ำมันที่ลำไส้เล็ก และใช้เติมลงในเนยขาว (shortening) และผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการให้เป็นอิมัลชันที่มีความคงตัวดี (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2541)

3.3 กรดไขมัน (Fatty Acids)

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์สายตรงที่มีหมู่คาร์บอกซิล 1 หมู่ (straight chain aliphatic monocarboxylic acid) มีสูตรโมเลกุลเป็น R-COOH โดย R-คือหมู่อัลคิล (alkyl) ในโมเลกุลของกรดไขมัน หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก จึงทำให้กรดไขมันสามารถแตกตัวออกได้เป็นประจุลบ (anionic carboxylate) และหมู่ R-มีสมบัติเป็น hydrophobic alkyl chain ซึ่งละลายในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่ไม่มีขั้ว อย่างไรก็ตามจะไม่พบโมเลกุลของกรดไขมันอิสระที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน ในธรรมชาติกรดไขมันเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในไขมัน น้ำมันและฟอสโฟกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่ ที่พบในรูปของกรดไขมันอิสระมีน้อยมาก การสังเคราะห์กรดไขมันในร่างกายมีสารเริ่มต้นเป็นหมู่อะเซทิล ซึ่งมีคาร์บอนในโมเลกุล 2 อะตอม มาต่อกันเป็น โมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นจึงทำให้จำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของกรดไขมันเป็นเลขคู่เสมอ พันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลของกรดไขมัน มีทั้งที่เป็นพันธะเดี่ยวและพันธะคู่ กรดไขมันที่มีพันธะเดี่ยวทั้งหมด เรียกว่า กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acids) ส่วนกรดไขมันที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ เรียกว่า กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids)

กรดไขมันสามารถแบ่งออกตามจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลได้เป็นกรดไขมันชนิดสายสั้นหรือมีจำนวนคาร์บอนน้อย (short chain fatty acids) คือมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุล 4-10 อะตอม สายกลาง (medium chain fatty acids) มีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุล 12-14 อะตอม และกรดไขมันชนิดสายยาว (long chain fatty acids) มีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลมากกว่า 16 อะตอมขึ้นไป สำหรับไขมันและน้ำมันจะแตกต่างกันที่ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน (Table 5) ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบกันเป็นไขมันและน้ำมัน กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ของไขมัน มักเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งตรงข้ามกับน้ำมันที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่ จำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของกรดไขมันจะเป็นเลขคู่เสมอและเป็นสายตรง แต่มีกรดไขมันบางชนิดซึ่งมีจำนวนน้อยที่เป็นเลขคี่ หรือเป็นโซ่กิ่ง (branched chain acid) (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2541)

Table 5. Percent and property of fatty acid of palm olein.

Fatty acid	Melting point (°C)	Composition (%)
Lauric acid	44.2	0.1 - 1.1
Myristic acid	52	0.9 - 1.4
Palmitic acid	63.1	37.9 - 47.7
Stearic acid	69.6	4.0 - 4.8
Oleic acid	13.4	40.7 - 43.9
Linoleic acid	-17	10.4 - 13.4
Linolenic acid	-17	0.1 - 0.6

ที่มา : Mecllellan (1983)

กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์มมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน (Table 6) โดยกรดปาล์มมิติก (palmitic acid) เป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวที่มีปริมาณมากที่สุดในน้ำมันปาล์ม มีปริมาณ 37.9-47.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรดสเตียริก (stearic acid) 4.0-4.8 เปอร์เซ็นต์และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่พบมากได้แก่ กรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งมีอยู่ 40.7-43.9 เปอร์เซ็นต์ และกรดไลโนลิก (linoleic acid) 10.4- 13.4 เปอร์เซ็นต์ (Mecllellan, 1983)

3.4 คุณสมบัติของน้ำมันพืช น้ำมันดีเซล

พืชน้ำมันเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เป็นชื่อเรียกพืชที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบในเมล็ดหรือผล เช่น ถั่วเหลือง งา และทานตะวัน เป็นพืชน้ำมันที่ให้น้ำมันในส่วนที่เป็นเมล็ด ส่วนปาล์มน้ำมันและมะพร้าวจะให้ไขมันในส่วนที่เป็นผล ซึ่งปริมาณน้ำมันที่เป็นองค์ประกอบจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชน้ำมันนั้นๆ กล่าวคือ ถั่วเหลืองมีปริมาณน้ำมันเป็นองค์ประกอบร้อยละ 20 ส่วนทานตะวันมีปริมาณน้ำมันอยู่ร้อยละ 40 เป็นต้น น้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันที่กลั่นระเหยได้จากน้ำมันปิโตรเลียม โดยกำหนดปริมาณการกลั่นได้ร้อยละ 90 ให้มีอุณหภูมิไม่สูงกว่า 357 องศาเซลเซียส น้ำมันดีเซลมีเฉพาะธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างโมเลกุล ไม่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ขณะที่น้ำมันพืชมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 10-12 และมีพันธะคู่ในโครงสร้างโมเลกุล น้ำมันพืชและสัตว์เป็นสารประกอบไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 10 ถึง 30 ตัว มีโครงสร้างเป็น C_3H_5 เชื่อมต่อกับกรดไขมัน

Table 6. Property and free fatty acid component of plant oils.

Details	Oil								
	coconut	palm kernel	palm	peanut	rapeseed	soybean	sunflower	maize	rice bran
Percent of oils	50 ^{1/}	44-53 ^{2/}	20-25 ^{3/}	45-55	38-44	18-21	22-40	3-9 ^{4/}	12-16
Iodine value	7-12	11-18	50-55	84-103	110-126	123-142	130-144	127-133	91-112
Composition of fatty acid									
C< 12:0	15.0	8.1	-	-	-	-	-	-	-
C 12:0	47.5	50.4	0.2	-	-	0.1	-	-	-
C 14:0	18.1	17.3	1.1	-	0.1	0.2	0.1	-	0.3
C 16:0	8.8	7.9	44.0	8.1	3.5	10.7	6.0	12.9	15.0
C 18:0	2.6	2.3	4.5	1.5	1.5	3.9	4.0	2.5	1.7
Other (C20:0, C22:0, C24:0)	0.1	-	0.4	4.2	0.9	0.2	1.1	-	0.6
Total of saturated fatty acid (%)	92.1	86	50.2	13.8	6.0	15.0	11.2	15.4	17.6
C 16:0	-	-	0.1	-	0.2	0.3	<1.0	-	-
C 18:1	6.2	11.8	39.2	49.9	60.1	22.8	16.5	33.1	43.0
C 18:2	1.6	2.1	10.1	35.4	20.1	50.8	72.4	48.8	37.4
Other (C18:3, C20:1, C22:1, C24:1)	trace	trace	0.4	trace	11.2	6.8	0.6	2.6	1.5
Total of unsaturated fatty acid (%)	7.8	13.9	49.7	85.3	91.6	80.7	89.5	84.5	81.9

^{1/}จากเนื้อมะพร้าวแห้ง ^{2/}จากเนื้อในเมล็ด ^{3/}จากปลาค้างคาวทะเลสด ^{4/}จากเมล็ดข้าวโพด

ที่มา : ตัดแปลงจาก พิสมัย เจนวนิชปัญจกุลและลลิตา อ้วน โถ (2549)

จากการที่มีกรดไขมันอยู่ในโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ ถึงร้อยละ 94-96 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโมเลกุล ทำให้คุณสมบัติของน้ำมันแต่ละชนิดทั้งทางเคมีและกายภาพของน้ำมันพืชนั้นๆ มีคุณสมบัติเป็นไปตามกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ ส่วนใหญ่แล้วน้ำมันพืชมีองค์ประกอบของกรดไขมัน ประกอบด้วยคาร์บอนระหว่าง 12 ถึง 18 ตัว โดยมีกรดไขมันทั้งประเภทอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณที่แตกต่างกัน

Table 7. Physical and chemical property of plant oils compared with diesel oil.

Property	Plant Oils				Diesel Oil
	crude palm	palm kernel	coconut	jatropha	
1. Specific gravity	0.899	0.918	0.918	0.915	0.81-0.87 ^{1/}
2. Refraction	1.459	1.452	1.449	1.463	n/a
3. Acid value (AV), mg KOH/g oil	6.66	3.18	10.76	0.99	n/a
4. Free fatty acid, %	2.37 ^{2/}	1.13 ^{3/}	3.83 ^{3/}	n/a	n/a
6. Saponification value, mg KOH/g oil	202.67	255.00	260.60	145.20	n/a
7. Water content and volatile matter, % by weight	0.46	0.18	n/a	0.14	n/a
8. Viscosity (40 °C), centistoke	24.90	28.65	24.85	34.55	1.8-4.1
9. Flash point, 0 °C	n/a	n/a	n/a	n/a	> 52

1/ ที่ 15.6/15.6°C

2/ as palmitic acid, %FFA (as palmitic acid) = AV/2.19

3/ as lauric acid, %FFA (as lauric acid) = AV/2.81

n/a ไม่มีข้อมูล

ที่มา : พิสมัย เจนวณิชปัญจกุลและลลิตา อตัน โถ (2549)

เนื่องจากน้ำมันดีเซลและน้ำมันพืชมีโครงสร้างโมเลกุลที่แตกต่างกัน ทำให้น้ำมันทั้งสองประเภทมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างกันอย่างมาก กล่าวคือ น้ำมันพืช มีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซล 6-7 เท่า การระเหยเป็นไอได้น้อยกว่าน้ำมันดีเซล รวมถึงคุณสมบัติที่น้ำมันพืช รวมตัวเป็นก้อนที่อุณหภูมิสูง หรือที่เรียกว่าเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรซ์ได้ ซึ่งน้ำมันดีเซลไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว น้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้ถีดน้ำมันเป็นฝอยได้ยาก เกิดเป็นอุปสรรคต่อการป้อนน้ำมันเชื้อเพลิงและเกิดการสันดาปไม่สมบูรณ์ นอกจากนั้นแล้ว จากการที่ระเหยเป็นไอได้น้อยกว่าน้ำมันดีเซลมาก ทำให้เกิดการจุดระเบิดได้ยาก เครื่องยนต์ติดยากและหลงเหลือคราบเขม่าเกาะที่หัวฉีด แหวน และวาล์ว (Table 7) ซึ่งคุณสมบัติที่แตกต่างกันนี้ทำให้ไม่

สามารถใช้น้ำมันพืชเป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยตรงกับเครื่องยนต์ดีเซลที่ไม่มีการดัดแปลงส่วนของเครื่องยนต์ (พิสมัย เจนวนิชปัญญกุลและลลิตา อัครนโถ, 2549)

4. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมัน

สมบัติทางเคมีที่นิยมตรวจวิเคราะห์เพื่อใช้ชี้บ่งชนิดและคุณภาพของไขมันและน้ำมัน ได้แก่

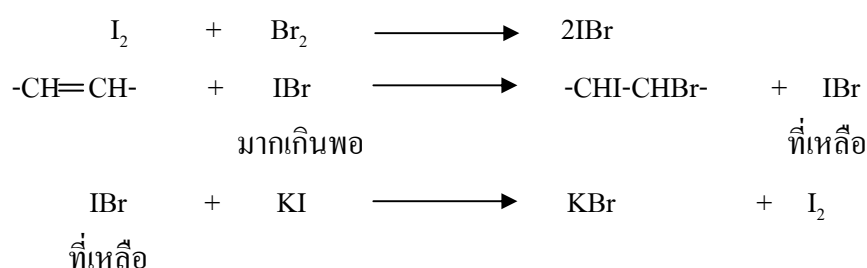
4.1 ค่าไอโอดีน (Iodine value, I.V.)

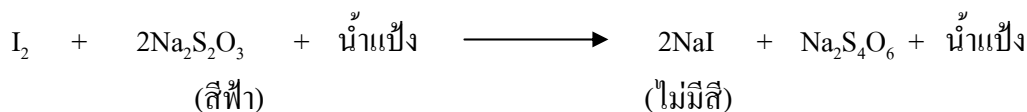
เป็นการวิเคราะห์เพื่อชี้บ่งจำนวนพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่ผสมรวมกันอยู่ในไขมันหรือน้ำมันตัวอย่าง ค่าไอโอดีนของไขมันหรือน้ำมันใดๆ คือ จำนวนกรัมของไอโอดีนที่ถูกดูดซึมโดยไขมันหรือน้ำมันจำนวน 100 กรัม โดยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์จะทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนที่มากเกินไปและทราบปริมาณแน่นอน ไอโอดีนจะถูกดูดซึมเข้าไปที่ตำแหน่งพันธะคู่ ปฏิกิริยานี้จะเกิดอย่างช้าๆ ในที่มีมืด ถ้ามีจำนวนพันธะคู่มาก ไอโอดีนจะถูกดูดซึมมาก หลังจากนั้นหาปริมาณไอโอดีนที่เหลือ เพื่อคำนวณหาปริมาณไอโอดีนที่ถูกดูดซึมไป ดังนั้นค่าไอโอดีนจึงเป็นตัวชี้บ่ง degree of unsaturation ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่รวมกันเป็นไขมันและน้ำมัน

ค่าไอโอดีนของไขมันและน้ำมันแต่ละชนิดค่อนข้างคงที่ (Table 8) แต่อาจผันแปรได้บ้างตามวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ น้ำมันที่มี degree of unsaturation สูง จะเกิดการหืนเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย คือ ไม่มีความคงตัวเมื่อสัมผัสกับอากาศหรือออกซิเจน นอกจากนั้นค่าไอโอดีนยังสัมพันธ์กับจุดหลอมเหลวของไขมันและน้ำมันอีกด้วย เพราะไขมันซึ่งเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องจะเป็นไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัวมาก ซึ่งตรงข้ามกับน้ำมันที่มีค่าไอโอดีนสูง มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลของกลีเซอไรด์มากและมีจุดหลอมเหลวดำ วิธีการหาค่าไอโอดีนที่นิยมใช้มี 2 วิธี คือ

4.1.1 Hanus method ใช้สารละลายไอโอดีนโมโนโบรไมด์ (IBr)

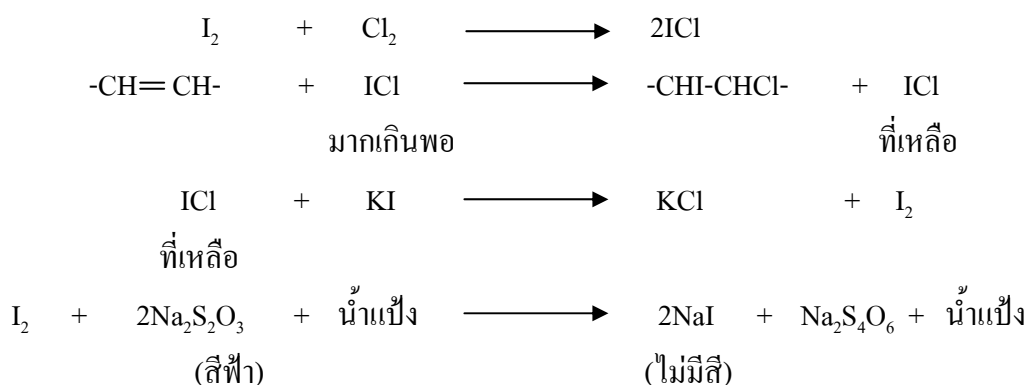
ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นมีดังนี้





4.1.2 Wijs method ใช้สารละลายไอโอดีนโมโนคลอไรด์ (ICI)

ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นมีดังนี้



วิธี Wijs นิยมใช้มากกว่าวิธี Hanus เพราะวิธี Wijs ให้ผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากกว่าวิธี Hanus ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธี Wijs ประมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ Hanus reagent (IBr) มีความคงตัวมากกว่า Wijs reagent (ICI) น้ำมันที่มีค่าไอโอดีนต่ำกว่า 100 จัดว่าเป็น non-drying oil น้ำมันที่มีค่าไอโอดีนระหว่าง 100-130 จัดว่าเป็น semi-drying oil และน้ำมันที่มีค่าไอโอดีนสูงกว่า 130 จัดว่าเป็น drying oil หรือเป็นน้ำมันที่แห้งเร็ว จึงนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมสีทาผนัง หรือผสมในน้ำมันเคลือบผิวชนิดต่าง ๆ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2541)

4.2 ค่าสaponification (Saponification value, S.V.)

ค่าสaponification คือ จำนวนมิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ไขมันหรือน้ำมันจำนวน 1 กรัม อย่างสมบูรณ์ ได้เป็นสบู่และกลีเซอรอล ค่าสaponification ใช้เป็นตัวชี้บ่งขนาดของโมเลกุล หรือน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ไขมันหรือน้ำมันนั้น ๆ (Table 8) ไขมันหรือน้ำมันที่มีค่าสaponification สูง แสดงว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจึงมีจำนวนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ต่อหน่วยน้ำหนักเป็นจำนวนมาก จึงต้องใช้ต่างเป็นจำนวนมากในการไฮโดรไลซิส ในทำนองเดียวกัน ถ้าค่าสaponification ต่ำ แสดงว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงมีจำนวนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ต่อหน่วยน้ำหนักเป็นจำนวนน้อย ทำให้ใช้ต่างในการไฮโดรไลซิสน้อย ค่าสaponification จะ

แปรผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันนั้น ค่าสปอนนิฟิเคชันยังมีประโยชน์ในการใช้ตรวจสอบการปลอมปนน้ำมันมะพร้าว (ค่าสปอนนิฟิเคชัน เท่ากับ 248-265) หรือน้ำมันปาล์มเคอเนล (ค่าสปอนนิฟิเคชัน เท่ากับ 230-254) ลงในน้ำมันพืชชนิดอื่น (นิธิยา รัตนานนท์, 2541)

4.3 ค่ากรดไขมันอิสระ (Acid Value, A.V.)

ค่ากรดไขมันอิสระของไขมันหรือน้ำมัน คือ จำนวนมิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ในการทำให้กรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันจำนวน 1 กรัมเป็นกลางพอดี ผลการทดลองอาจนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิสระได้ แต่นิยมเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดโอเลอิก ดังนั้นค่ากรดไขมันอิสระที่วิเคราะห์ได้ใช้เป็นตัวชี้บ่งว่าไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันถูกทำลายด้วยเอนไซม์ไลเปส และความชื้นเป็นกรดไขมันอิสระ (hydrolytic rancidity) มากน้อยเพียงใด สาเหตุเนื่องจากการมีกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้น และเชื้อจุลินทรีย์หลังเอนไซม์ไลเปสออกมา ทำให้ไตรกลีเซอไรด์ในไขมันและน้ำมันเกิดการสลายตัวได้เป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ โดยเฉพาะกรดไขมันอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีจำนวนคาร์บอน 4-12 อะตอม ถ้าค่ากรดไขมันอิสระสูง แสดงว่าโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ถูกสลายตัวได้เป็นกรดไขมันอิสระมาก โดยความร้อนและแสงจะช่วยเร่งให้เกิดการหืนได้เร็วขึ้น (นิธิยา รัตนานนท์, 2541)

4.4 ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide Value, P.V.)

ค่าเปอร์ออกไซด์ หมายถึง จำนวนมิลลิกรัมของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.002 นอร์มัล ที่ใช้ในการไทเทรตไขมันหรือน้ำมัน 1 กรัม หรือหมายถึงจำนวนมิลลิสมมูลของเปอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อไขมันหรือน้ำมัน 1 กิโลกรัม หรือมิลลิโมลของออกซิเจนต่อกิโลกรัมของไขมัน (1 มิลลิโมลเท่ากับ 2 มิลลิสมมูล) โดยใช้หลักการวิเคราะห์หาค่าเปอร์ออกไซด์จากการทำปฏิกิริยาของสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ในสารละลายกรดกับออกซิเจนที่เกิดจากเปอร์ออกไซด์ได้เป็นไอโอดีนอิสระ ซึ่งจะหาปริมาณไอโอดีนอิสระที่เกิดขึ้นได้โดยนำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต มีน้ำแข็งเป็นอินดิเคเตอร์ ค่าเปอร์ออกไซด์เป็นการวัด degree of lipid oxidation โดยการหาปริมาณออกไซด์ที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมัน สารเปอร์ออกไซด์จะเกิดขึ้นในไขมันหรือน้ำมันอย่างช้าๆ ในระหว่างที่ไขมันหรือน้ำมันถูกเก็บไว้ให้สัมผัสกับอากาศ เรียกว่าเกิด oxidative rancidity เป็นการเกิด autoxidation ขึ้นที่พันธะคู่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ดังนั้นไขมันหรือน้ำมันที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลมากหรือมีค่าไอโอดีนสูง จะเกิด oxidative rancidity ได้ง่าย จึงนิยมนำค่าเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ชี้บ่งการเกิดออกซิเดชันของ

ไขมันและน้ำมัน เพราะเปอร์ออกไซด์เป็นอินเทอร์มีเดียทของปฏิกิริยา autoxidation (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2541)

Table 8. Chemicals properties of fats and oils.

Oil	Saponification Number	Iodine number
Butter	216-233	26-42
Tallow	190-200	40-48
Lard	190-202	53-77
Whale oil	185-194	110-135
Lanoline oil	192-198	35-46
Coca butter	190-200	35-40
Coconut oil	250-264	7-10
Palm kernel oil	245-255	14-23
Palm oil	195-205	44-54
Maize oil	187-193	103-130
Cotton seed oil	189-198	99-113
Linseed oil	188-196	170-204
Olive oil	188-196	80-88
Peanut oil	188-196	84-100
Rapeseed oil	170-180	97-108
Sesame oil	188-195	103-116
Soybean oil	189-195	120-141
Sunflower oil	188-194	125-136

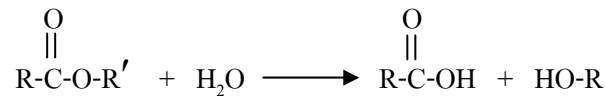
ที่มา : นิธิยา รัตนาปนนท์ (2541)

5. การผลิตเอนไซม์ไลเปส

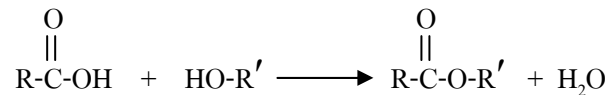
5.1 เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolase, glycerol ester hydrolase)

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลาย (Hydrolysis) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Synthesis of ester) และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification)

1. Hydrolysis of ester

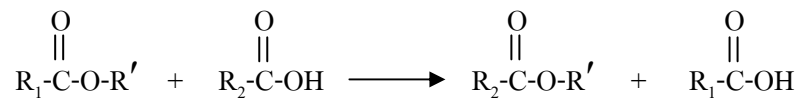


2. Synthesis of ester

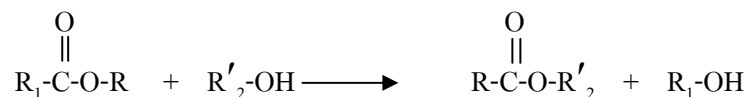


3. Transesterification

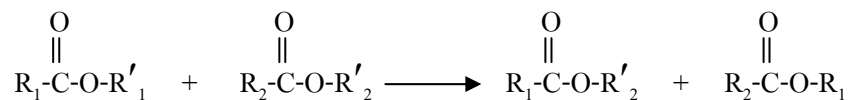
3.1 Acidolysis



3.2 Alcoholysis



3.3 Interesterification



3.4 Aminolysis

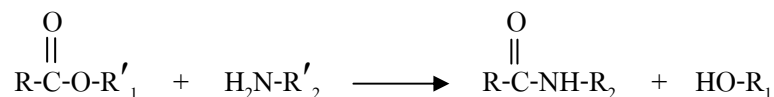


Figure 7. Reactions of lipase enzyme.

ที่มา : Yamane (1987)

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอรอล กรดไขมัน และ partial glycerides ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ย้อนกลับได้ โดยทั่วไปไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันโมเลกุลยาว (long chain fatty acid) จะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ไลเปสสามารถที่จะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับกลีเซอรอลบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ตรงผิวร่วมระหว่างส่วนที่ไม่ละลายน้ำของสับสเตรทและส่วนที่ละลายน้ำได้มีการแบ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่ม (Macrae, 1983) ดังนี้

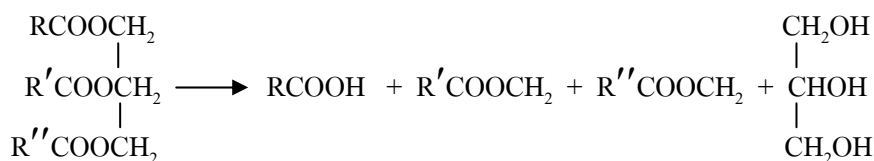
เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์พวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบโคกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ เป็นอินเทอร์มีเดียท ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1, 2, (2, 3) โคกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ 1, 2, (2, 3) โคกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ นั้นเป็นพวกไม่คงตัว ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอ จะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1, 3-โคกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ซึ่งจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันกับกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และในพวก *Rhizopus*

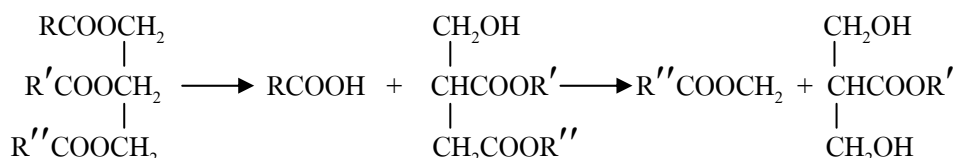
เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสจาก จุลินทรีย์บางพวก เช่น *Geotrichum candidum* ที่ย่อยไตรกลีเซอไรด์ ที่มี *cis* double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มี double bond ตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี

5.2 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

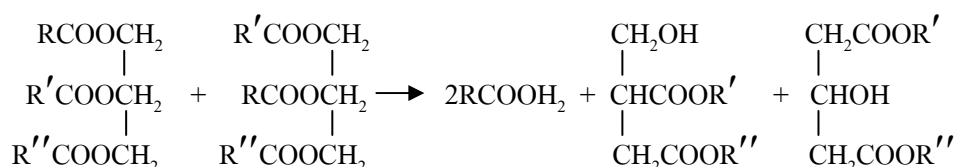
เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติหรือได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งอาจผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายในเซลล์และปลดปล่อยออกมาออกเซลล์ (Shahani, 1975) เอนไซม์ไลเปสจากพืช เช่น เอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย ธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ ข้าวบาร์เลย์ เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์มักพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน หัวใจ สมอง กล้ามเนื้อและซีรัม เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน เพราะมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์ สามารถผลิตได้ในปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่าย และมีคุณภาพสม่ำเสมอ



1. เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



2. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



3. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

Figure 8. Types and reactions of lipase enzyme.

ที่มา : Macrae (1983)

จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการผลิต จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดี ในสภาวะพีเอชเป็นกลาง (neutral lipase) เช่น *Pseudomonas* sp. (Yamamoto *et al.*, 1988) บางสายพันธุ์ผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (alkaline lipase) เช่น *Pseudomonas nitroreducens nov var. thermotolerans* (Watanabe *et al.*, 1977) บางสายพันธุ์ผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermostable lipase) เช่น *Bacillus* sp. (Handelsman *et al.*, 1994) ยีสต์และราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Aspergillus niger* โดยมีการแยกเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger* และทำให้บริสุทธิ์ พบว่าไลเปสจาก *Aspergillus niger* ไม่ต้องการ co-factor ช่วยในการทำงาน ระดับความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของไลเปสชนิดนี้ คือ 5.6 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนช่วงความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เอนไซม์ทนได้ คือ 3.2-6.8 และ 50 องศาเซลเซียส 15 นาที ตามลำดับ

5.3 เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์

ยีสต์จัดเป็นราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดี่ยวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสายและมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่า ยีสต์ต่างจากสาหร่ายเนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้และไม่เหมือนโพรทิสต์เพราะมีผนังที่แข็งแรง นอกจากนี้ยังแตกต่างไปจากแบคทีเรียส่วนใหญ่เพราะมีขนาดใหญ่กว่าและสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันด้วย ยีสต์เกี่ยวข้องกับมนุษย์มาเป็นเวลาหลายศตวรรษ โดยมีบทบาทเกี่ยวกับการหมักน้ำผลไม้ การทำให้ขนมปังขึ้นฟู ทำให้อาหารบางชนิดมีคุณค่าทางอาหาร ในปัจจุบันยีสต์ยังมีความสำคัญมากขึ้นเพราะใช้ในกระบวนการหมักต่างๆ การสังเคราะห์สาร เช่น วิตามิน ไขมัน และ โปรตีน จากน้ำตาลอย่างง่ายและแอมโมเนียมไนโตรเจน นอกจากนี้ยังใช้ยีสต์เพื่อการศึกษาทางด้านชีวเคมีพื้นฐานและกระบวนการทางเมแทบอลิซึมของยูคาริโอตเซลล์ อย่างไรก็ตามมียีสต์บางชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับพืชและสัตว์ และทำความเสียหายให้แก่อาหาร เสื้อผ้า และวัสดุอื่นๆ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นเห็ดราโทรอป ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน มีทั้งพวกที่เป็นซาโพรไฟต์และปรสิต พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น พบอาศัยอยู่กับส่วนต่างๆ ของพืช ตามดอก ผล ใบ ลำต้น ขางไม้ พบในดิน น้ำจืด น้ำทะเล และน้ำทิ้ง อาจพบอยู่กับแมลงและกระเพาะของสัตว์บางชนิด เช่น กระจ่าง แต่จริงแล้วแหล่งที่พบยีสต์อยู่เป็นประจำ คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์หลายชนิดพบอยู่ในดินชนิดต่างๆ ที่มีความแตกต่างกันทั้งองค์ประกอบทางเคมี ลักษณะทางกายภาพ ความชื้น พีเอช และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ ยีสต์ที่พบบ่อยในดิน เช่น *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Schizoblastosporion* และ *Cryptococcus* (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2540)

โดยยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ (Table 9) นอกจากนั้นยีสต์ยังเป็นกลุ่มที่ง่ายต่อการเลี้ยง และเจริญเติบโตเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย (Vakhlu and Kour, 2006) เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสที่ทำปฏิกิริยากับ carboxylic ester bond โดยเอนไซม์จะย่อยไตรกลีเซอไรด์เป็น ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสยังสามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งจากประโยชน์เหล่านี้ จึงทำให้เป็นทางเลือกในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งอุตสาหกรรมอาหาร สารซักฟอก ยารักษาโรค หนังสัตว์ สิ่งทอ เครื่องสำอาง และกระดาษ

Table 9. Reported lipase producing yeasts, their cellular localization.

Source	Cellular-location
<i>Arxulaaden inivorans</i>	Extra-cellular
<i>Candida albicans</i>	Extra-cellular
<i>Candida antractica</i>	Extra-cellular
<i>Candida ernobii</i>	Extra-cellular
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604	Cell bound
<i>Candida rugosa</i>	Extra-cellular
<i>Candida curvata</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-
<i>Candida deformans</i> CBS 2071	Extra-cellular
<i>Geotrichum asteroides</i> FKMF 144	Extra-cellular
<i>Geotrichum candidum</i>	Extra-cellular
<i>Geotrichum</i> sp. FO401B	Extra-cellular
<i>Kurtzmanomyces</i> sp. I-11	Extra-cellular
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Extra-cellular
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Saccharomyces fibuligera</i>	-
<i>Trichosporon asteroides</i>	Extra-cellular
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Extra-cellular
<i>Trichosporon fermentans</i> WU-C12	Extra-cellular
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Extra-cellular and cell bound

ที่มา : Vakhul และ Kour (2006)

เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida rugosa* เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในอุตสาหกรรมมากที่สุด สามารถใช้ได้หลายๆ กระบวนการในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ (Redondo *et al*, 1995) มีการใช้เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida rugosa* เพื่อผลิตกรดไขมันจากเมล็ดละหุ่ง (Macrae and Hammond, 1985) ยีสต์สายพันธุ์ *Candida antractica* AY 30 เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ได้ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์ lipophilic antioxidants ด้วยปฏิกิริยาเอส

เทอร์ฟิเคชั่น (Pandey *et al.*, 1999) ในอุตสาหกรรมสารซักฟอก เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* และ *Candida lipolytica* (*Yarrowia lipolytica*) ได้ถูกใช้ในการย่อยสลายคราบไขมัน (Vakhul and Kour, 2006)

มีการศึกษาการใช้เอนไซม์จากยีสต์ในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชั่นในการผลิตไบโอดีเซล โดย Kose และคณะ (2001) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชั่น ใช้น้ำมันเมล็ดฝ้ายและแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ มีเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงแล้วจาก *Candida antarctica* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปริมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักน้ำมัน อัตราส่วน โมลน้ำมันเมล็ดฝ้ายต่อเมทานอล เท่ากับ 1:4 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 91.5 เปอร์เซ็นต์ Chen และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงแล้วจาก *Candida antarctica* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 222.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร พบว่าผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ถึง 91.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำมันใช้แล้วกับเมทานอลเป็นสับสเตรท อัตราส่วน 1:1 เติมเมทานอล 3 ขั้นตอน น้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก และเติมสารละลายเฮกเซน 15 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนั้น Lara และ Park (2004) ศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชั่น ที่มีเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida cylindracea* และ *Candida rugosa* ที่ตรึงแล้ว มีค่ากิจกรรม 50 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีน้ำมันพืชใช้แล้วกับเมทานอลเป็นสับสเตรท อัตราส่วน 1:3 เติมตัวทำละลายอินทรีย์ *n*-hexane ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ 78 และ 13 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* และ *Candida rugosa* ที่ตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอโนไซม์ไลเปสจากโรงงานน้ำมันปาล์ม
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอโนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์

1. สถานที่เก็บตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อ

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการทดลองนี้ คือ ดิน, น้ำ และกากเส้นใยปาล์ม และตัวอย่างอื่นๆ ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณต่างๆ ของโรงงานน้ำมันปาล์มบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด จังหวัดสงขลา, บริษัทเอเชียนปาล์มจำกัด, บริษัทยูนิวาณิช น้ำมันปาล์มจำกัด และบริษัทอันดามันน้ำมันปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่

2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต/เกรด/ประเทศ
1. Sulfuric acid	Merck/Aalytical/Germany
2. Hydrochloric acid	Lab scan/Aalytical/Thailand
3. Sodium hydroxide	Merck/Aalytical/Germany
4. Chloramphenical ($C_{11}H_{12}C_{12}N_2O_5$)	Sigma/Aalytical/Germany
5. Potassium chloride	Ajex Finechem/Aalytical/Australia
6. Sodium chloride	Merck/Aalytical/Germany
7. D-Glucose	Ajex Finechem/Aalytical/Australia
8. Phenol	Fisher Scientific/Aalytical/England
9. Potassium dihydrogen orthophosphate	Ajex Finechem/Aalytical/Australia
10. Calcium chloride dehydrate	Ajex Finechem/Aalytical/Australia
11. Magnesium sulphate hydrate	Ajex Finechem/Aalytical/Australia
12. Yeast extract	Himedia/Aalytical/India
13. <i>p</i> -nitrophenyl palmitate (<i>p</i> PNC ₁₆)	Sigma/Aalytical/Germany
14. 2-Propanol (iso-propanol)	Merck/Aalytical/Germany
15. Triton X-100	Sigma/Aalytical/Germany
16. Gum Arabic	Fluka/Aalytical/France

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต/เกรด/ประเทศ
17. Sodium carbonate	Lab scan/Analytical/Thailand
18. Iron (II) sulphate	Lab scan/Analytical/Thailand
19. Glycerol	Ajex Finechem/Analytical/Australia
20. Ethyl alcohol absolute anhydrous	J.T.Beker/Analytical/USA.
21. Potassium hydroxide	Lab scan/Analytical/Thailand
22. Ethyl alcohol	Lab scan/Analytical/Thailand
23. Phenolphthalene	Lab scan/Analytical/Thailand
24. Malt extract	Himedia/Analytical/India
25. Peptone	Himedia/Analytical/India
26. Rhodamine B	Himedia/Analytical/India
27. Ammonium nitrate	Ajex Finechem/Analytical/Australia
28. Disodium hydrogen orthophosphate dehydrate	Ajex Finechem/Analytical/Australia
29. Starch	Ajex Finechem/Analytical/Australia
30. 95 % Ethanol	Commercial/Thailand
31. Agar power	Himedia/Analytical/India
32. Manganese (II) sulphate tetrahydrate	Ajex Finechem/Analytical/Australia
33. Benzene	Lab scan/Analytical/Ireland
34. Chloroform	Lab scan/Analytical/Ireland
35. Cupric acetate	Fluka/Analytical/Switzerland
36. Diethyl ether	Lab scan/Analytical/Ireland
37. Formic acid	Carlo Erba/Analytical/Italy
38. iso-octane	Lab scan/Analytical/Ireland
39. Methanol	BDH AnalaR/ Analytical/England
40. <i>n</i> -Hexane	J.T.Beker/Analytical/USA.
41. 4-Nitrophenyl palmitate (<i>p</i> PNC ₁₆)	Sigma-Aldrich/Analytical/Germany
42. Palmitic acid	Nacalai/Analytical/Japan
43. Potassium iodide	Merck/Analytical/Germany
44. Potassium hydroxide	Merck/Analytical/Germany

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

45. 2-Butanol
46. Acetic acid
47. น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ ยี่ห้อ มรกต

บริษัทผู้ผลิต/เกรด/ประเทศ

Fluka/Analytical/Switzerland
 Lab scan/Analytical/Ireland
 บริษัท มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด
 (มหาชน)/ Food grade/Thailand

3. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง**อุปกรณ์**

1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S
3. Haematocytometer
4. Vortex Mixer
5. กล้องจุลทรรศน์
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500
7. ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack
(รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)
8. ตู้อบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325
9. พีเอชมิเตอร์ (pH meter)
10. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)
11. ไมโครปิเปต (ขนาด 1000 ไมโครลิตร)
12. เครื่องปั่นผสม (Homogenizer) รุ่น T25 basic
13. เครื่อง TLC-FID Analyser รุ่น Iatroscan MK-5
14. Hotplate รุ่น HTS-1003
15. ตู้อบ ยี่ห้อ Memmert รุ่น Model 200
16. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น 3017
17. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Universal
รุ่น 32/32R

บริษัทผู้ผลิต/ประเทศ

Satorius, USA
 Satorius, USA
 Diamond, Taiwan
 Labnet, USA
 Nikon, US
 Schwabach, Germany
 Scientific promotion,
 Philadelphia
 Tomy, Japan
 Orion, USA
 Gilson, France
 Gilson, France
 Ika, Japan
 Iatron, Japan
 Harmony, Japan
 Schwabach, Germany
 Gesellschaft, Germany
 Hettich Zentrifugen,
 Germany

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนน้ำมันจากบริเวณ โรงงานน้ำมันปาล์ม เช่น ดิน, น้ำจาก บ่อบำบัดน้ำทิ้ง และกากเส้นใยปาล์ม ตัวอย่างละ 20 กรัม โดยใช้ช้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัก ตัวอย่างที่ต้องการ บรรจุตัวอย่างลงในภาชนะที่ปิดสนิท วัคซีน และอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ ในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง บันทึกสถานที่ และวัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างนั้น

2. การแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.1 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) ซึ่งมี ส่วนประกอบของน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ chloramphenical 0.00125 เปอร์เซ็นต์ และ rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปิเปตดูดเชื้อปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร นำแท่งแก้ว (spreader) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วบน อาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาส่องภายใต้แสงยูวีที่ 350 นาโนเมตร เลือกโคโลนีที่มีการเรืองแสงภายใต้แสงยูวี โดยใช้ลูปแตะบนผิวโคโลนีที่มีการเรืองแสง แล้วถ่ายโคโลนีลงบนอาหารแข็ง YM ด้วยวิธีการ streak plate เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นเชื้อยีสต์ โดยใช้วิธี Wet mount เลือกยีสต์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมา streak plate เพื่อให้ได้ยีสต์บริสุทธิ์ อีก 4 ครั้ง และเก็บในกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

2.2 การแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยน้ำมันปาล์มโดยใช้อาหาร Isolation medium for yeast (IMY)

ทำการแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยน้ำมันปาล์ม จากตัวอย่าง และวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 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

3. การคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

3.1 การคัดเลือกยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

นำยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 2.1 และข้อ 2.2 จาก stock culture มาเลี้ยงโดยใช้อาหารที่ใช้แยกยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ (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 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 หน่วยของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรทให้ *p*-nitrophenol อิสระ 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระด้วยวิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) (ภาคผนวก ข)

3.2 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันและปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชัน

3.2.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์

ทำการเลี้ยงยีสต์โดยนำยีสต์สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุดจาก stock culture มาเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารที่คัดแยกยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มโดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า คำนวณให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารที่คัดแยกยีสต์สายพันธุ์นั้นๆ อยู่ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็น

เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer (ภาคผนวก ก) โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า นับจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์ จะใช้ตัวเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท กำหนดปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้จากจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรที่นับได้ (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

3.2.2 การทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน

เตรียมสับสเตรท โดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 โมล (น้ำมันปาล์ม 0.5 กรัม และเมทานอล 0.054 กรัม) โดยโมลของน้ำมันพืชบริสุทธิ์ได้จากการทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชัน ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ในการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์ จะใช้ตัวเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท นำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์ที่เตรียมไว้อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไคกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID (ภาคผนวก ข)

3.2.3 การทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

เตรียมสับสเตรท โดยชั่งกรดโอเลอิกบริสุทธิ์และเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 โมล (กรดโอเลอิกบริสุทธิ์ 0.5 กรัม และเมทานอล 0.169 กรัม) โดยโมลของกรดโอเลอิกบริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 282.47 ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ในการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์ จะใช้ตัวเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท นำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์ที่เตรียมไว้อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไป

วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID (ภาคผนวก ข)

4. การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์

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

5. การศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดี

นำยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุดจาก 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 คำนวณให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในพลาสติกขนาด 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 $12442 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ที่ pH 7.5 โดยที่ 1 ยูนิต ของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรทให้ *p*-nitrophenol อิสระ 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ข)

และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระด้วยวิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) (ภาคผนวก ข)

6. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Jham *et al.*, 1982)

6.1.1 เตรียมตัวอย่างโดยใช้น้ำมัน 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 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 ละลายอยู่ในชั้นนี้แล้ว flush N_2 จนเหลือเฉพาะส่วนของน้ำมัน ละลายส่วนน้ำมันด้วยเฮปแทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.1.2 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 ที่อัตราไหลแก๊สพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะดักจับ มีอุณหภูมิเริ่มต้น 210 องศาเซลเซียส คงที่ 12 นาที และเพิ่มอุณหภูมิ ในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส คงที่ 8 นาที ตรวจวัดสัญญาณของสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด Flame ionization

6.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์ม

โดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีต่างๆ ของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้ในการศึกษาชนิดน้ำมันที่เหมาะสมในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ ดังนี้

6.2.1 การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value) (IUPAC, 1979)

6.2.2 การวิเคราะห์ค่าไอโอดีนในไขมันและน้ำมัน (Iodine value) (IUPAC, 1979)

6.2.3 การวิเคราะห์ค่ากรดและกรดไขมันอิสระ (Acid value) (IUPAC, 1979)

6.2.4 การวิเคราะห์ค่าสaponification (Saponification value) (IUPAC, 1979)

6.3 การเตรียมเซลล์ยีสต์

ทำการเลี้ยงยีสต์โดยนำยีสต์สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุดจาก stock culture มาเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร IMY broth 100 มิลลิลิตร นำไปบ่ม โดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่าง ประมาณ 100 เท่า คำนวณให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร IMY broth อยู่ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จึงนำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer (ภาคผนวก ก) โดยเจือจางตัวอย่าง ประมาณ 100 เท่า นับจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งในการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดเมทิลเอสเทอร์ จะใช้ตัวเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัม สับสเตรท คำนวณปริมาณเซลล์ที่ต้องการใช้จากจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรที่นับได้ (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คูดสารละลายส่วนใสออกให้หมด นำเซลล์ที่ได้ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คูดสารละลายส่วนใสออกให้หมดอีกครั้ง เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป และเซลล์ยีสต์ที่นำไปทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน จะวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระของตัวเซลล์ด้วยวิธี two-phase emulsion method ซึ่งคัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) (ภาคผนวก ข)

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} เซลล์ต่อกรัม สับสเตรท ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไดรกลีเซอไรด์ ไดรกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย

TLC/FID (ภาคผนวก ข) เลือกปริมาณน้ำที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

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 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 เซลล์ต่อกรัม สับสเตรท ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ 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 (ภาคผนวก ข) เลือกปริมาณของเซลล์ยีสต์ที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

6.6 ผลของการเพิ่มปริมาณเอนไซม์โดยใช้ supernatant ร่วมกับเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

1) 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 6.4 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ 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 (ภาคผนวก ข)

2) เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.054 กรัม (0.07 มิลลิลิตร) โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 (โมล : โมล) ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นเติมสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ (supernatant) ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 6.4 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง จนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ 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 (ภาคผนวก ข) เลือกการทดลองที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

6.7 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 ต่อจากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 6.4 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 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 (ภาคผนวก ข) เลือกอุณหภูมิที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

6.8 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 6.4 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 ผสมให้เข้ากัน

แล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์ และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ 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 (ภาคผนวก ข) เลือกพีเอชที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

6.9 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 6.4 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 6.8 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ 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 (ภาคผนวก ข) เลือกชนิดของแอลกอฮอล์ที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

6.10 ศึกษาอัตราส่วนโมลของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทโดยชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม กับเมทานอล 0.054, 0.074, 0.092 และ 0.110 กรัม (ปริมาณ 0.07, 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 6.4 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 6.8 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่าง

สม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 6.7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID (ภาคผนวก ข) เลือกอัตราส่วน โมลที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

6.11 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 6.4 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พิเอชที่เหมาะสมจากข้อ 6.8 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน 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 (ภาคผนวก ข) เลือกชนิดน้ำมันที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

6.12 ผลของการใช้เซลล์ยีสต์ซ้ำต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

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 6.4 โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พิเอชที่เหมาะสมจากข้อ 6.8 ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 6.5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำสับสเตรทที่ได้เตรียมไว้มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์ยีสต์และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่ ผสมให้เข้ากันอีกครั้งจนกระทั่งเซลล์กระจายตัวทั่วกันอย่างสม่ำเสมอ นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 6.7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ยีสต์มาแยกออกจากสับสเตรทเดิมด้วยการเซนตริฟิวส์ และเติมสับสเตรทในอัตราส่วนเดียวกันเพื่อทำปฏิกิริยาอีกครั้ง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48,

60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID (ภาคผนวก ข)

7. การศึกษาองค์ประกอบเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอล โดยใช้ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง

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

7.1.1 เตรียมตัวอย่างโดยเจือจางตัวอย่าง reaction mixture ที่ผลิตได้ด้วยเฮปเทน เป็น 10 เท่า

7.1.2 นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ 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

7.2 การวิเคราะห์กรดไขมันที่เหลืออยู่ในไบโอดีเซลที่ผลิตได้ ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Mass Spectrometry (Jham *et al.*, 1982)

7.2.1 เตรียมตัวอย่างโดยเจือจางตัวอย่าง reaction mixture ที่ผลิตได้ด้วยเฮปเทน 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 ใช้อุณหภูมิหัวฉีด และอุณหภูมิของแมสสเปกโตรมิเตอร์ที่ 240 และ 245 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ประมวลผลในแบบสแกนตั้งแต่ 35-500 amu และใช้ไอออไนเซชัน ชนิด Electron Ionization

บทที่ 3

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการนำตัวอย่าง ดิน, น้ำ และกากปาล์ม ที่เก็บจากโรงงานน้ำมันปาล์มบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน มาตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะปรากฏ, พิเอช และอุณหภูมิ (ภาคผนวก ค) ก่อนนำมาแยกเชื้อ ยีสต์บนอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถแยกยีสต์ได้จากตัวอย่างจากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธ์จำกัด 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 ตัวอย่างจากบริษัทนิวน้ำมันปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่ ได้ยีสต์ 41 สายพันธุ์ แยกได้จากอาหาร YM 21 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 20 สายพันธุ์ และ 8 ตัวอย่างจากบริษัทอันดามันน้ำมันปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่ ได้ยีสต์จำนวน 50 สายพันธุ์ แยกได้จากอาหาร YM 30 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 20 สายพันธุ์ รวมจำนวนยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้ทั้งหมด 206 สายพันธุ์ โดย แยกได้จากอาหาร 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 หลายชนิดที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไกลโคไลปิโดของยีสต์ (Walker, 1998) ในขณะที่อาหาร IMY เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งสังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วย yeast extract และสารประกอบอนินทรีย์ที่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน (semi-synthetic media) (นงลักษณ์และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) ซึ่งอาหาร IMY มีองค์ประกอบที่เป็นสารเคมีที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม เป็นต้น อาหารทั้งสองชนิดมีการเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและ แกรมลบ ซึ่งเจริญได้เร็วกว่ายีสต์ โดยมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยการรวมกับ 50S ไรโบโซม ทำให้ขัดขวางกระบวนการทรานสเพปติเดชัน (transpeptidation) และทรานสโลเคชัน (translocation) (นงลักษณ์และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) จากการที่อาหาร YM มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนและ

แหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายและมีความเข้มข้นของสารอาหารสูงกว่าอาหาร IMY ซึ่งมีเฉพาะน้ำมันปาล์มที่เป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น เป็นผลให้เมื่อใช้อาหาร YM แยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ยีสต์หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีและพบจำนวนยีสต์มากกว่าเมื่อใช้อาหาร IMY

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 (Table 10) นอกจากนี้ อุณหภูมิของตัวอย่างต่างๆ ที่นำมาคัดแยกมีผลต่อจำนวนยีสต์ที่แยกได้เช่นกัน โดยพบว่าในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส สามารถแยกยีสต์ได้จำนวนมาก คือ จากตัวอย่างน้ำ, กากปาล์ม และดิน ได้ยีสต์ 56, 70 และ 20 สายพันธุ์ ส่วนที่อุณหภูมิ 41-70 องศาเซลเซียส พบยีสต์จำนวนน้อย (Table 11) ซึ่งการที่พบยีสต์จำนวนหลายสายพันธุ์จากตัวอย่างที่มีพีเอช 4-6 และอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการคัดแยกใกล้เคียงกับพีเอชและอุณหภูมิของตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อยีสต์ นอกจากนี้ ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญดีที่พีเอช 3.5-5.0 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของโปรตีนที่เกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์รวมทั้งเอนไซม์ และโปรตีนที่ใช้สำหรับการขนส่งสารต่างๆ ของยีสต์อีกด้วย (สาวิตรี ลิ้มทอง, 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 yeast-malt medium (YM) และอาหาร YEPG ที่มีพีเอช 4.0 พบว่า ได้ยีสต์ทั้งหมด 97 สายพันธุ์

ในการแยกยีสต์มีการเติม rhodamine B ลงไปในอาหารทั้งอาหาร Yeast-Malt (YM) และอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) เพื่อที่สามารถคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสไปพร้อมๆ กับการแยกยีสต์ โดยเติม rhodamine B 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพื่อบ่งชี้การผลิตเอนไซม์ไลเปส rhodamine B ทำให้โคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ 350 นาโนเมตรได้ ดังแสดงใน Figure 9 การเรืองแสงเกิดขึ้นได้เนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกของ rhodamine B และไอออนลบของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปส เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ uranyl-fatty acid (Mackenzie *et al.*, 1967)

Table 10. Effect of pH on numbers of yeast strains obtained from water, palm pressed fiber and soil.

Samples	Number of samples	pH range	Number of yeast strains
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

Table 11. Effect of temperature on numbers of yeast strains obtained from water, palm pressed fiber and soil.

Samples	Number of samples	Temperature	Number of yeast strains
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

อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเชิงปริมาณที่แน่นอนได้ เพราะน้ำมันปาล์มที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อผสมกับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร ทำให้ยากต่อการดูวงใสเพื่อบอกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยตรง การใช้ rhodamine B จึงเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการคัดเลือกขั้นต้นเชิงคุณภาพ (Kouker and Jaeger, 1986) ทำให้สามารถทำการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตไลเปสไปด้วยกันกับการแยกเชื้อยีสต์ จึงสามารถแยกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในขั้นตอนเดียว แตกต่างจากการศึกษาของ Hernandez และคณะ (2007) ที่ทำการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่าง olive fruit และ olive brine จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยขั้นตอนแรกคัดแยกยีสต์ด้วยอาหาร tributyrin medium บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 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 โดยใช้อาหารแข็งที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติม rhodamine B ลงไปในอาหาร (YNB-rhodamine B) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า คัดแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 30 สายพันธุ์ และมียีสต์เพียง 3 สายพันธุ์ เท่านั้นที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้

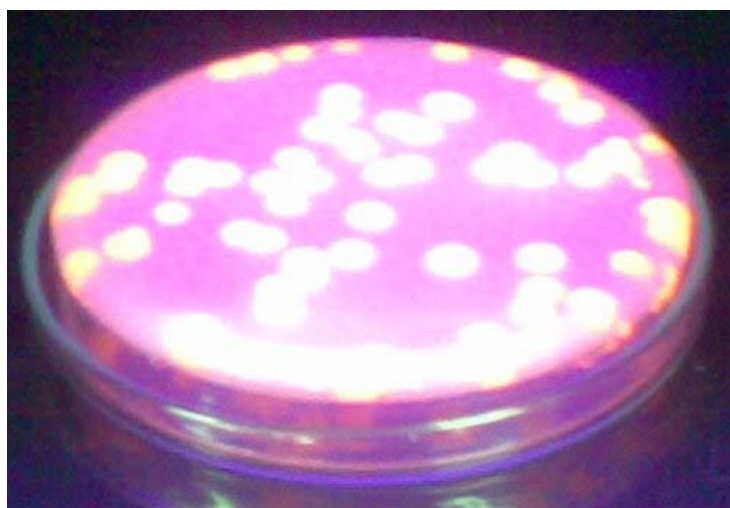


Figure 9. The orange fluorescent-halo colonies were detected as lipase-producing strains by visualization under UV light at 350 nm.

2. การคัดเลือกยีสต์โดยการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

2.1 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 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 0.406 ± 0.008 , 0.248 ± 0.002 และ 0.216 ± 0.006 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยีสต์ที่แยกได้จากอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) จำนวน 89 สายพันธุ์ มี 27 สายพันธุ์ที่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยสายพันธุ์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงคือ สายพันธุ์ D2I75, P5I07 และ U4I51 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 0.219 ± 0.015 , 0.174 ± 0.003 และ 0.124 ± 0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 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% เป็นตัวอิมัลซิฟายเออร์ นอกจากนี้การวิเคราะห์แบบโคโนติคส์โดยวัดอัตราการเกิดเป็น *p*-nitrophenol นั้น สามารถวัดได้ที่ค่าพีเอชเป็นกลางหรืออยู่ในช่วงของค่าพีเอชที่ป็นกรดจะมีผลต่อการดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol (Gilham and Lehner, 2005)

นอกจากนี้เมื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรทด้วยวิธี two-phase emulsion พบว่า มีเพียงยีสต์สายพันธุ์ P11I89 เท่านั้น ที่สามารถวัดปริมาณเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี two-phase emulsion ได้ (ดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)) 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

จากการที่เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์สายพันธุ์ P11I89 สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี two-phase emulsion ได้เพียงสายพันธุ์เดียว โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3.360 ± 0.069 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกผลิตขึ้นมาไม่ได้มีความจำเพาะต่อการย่อยตรงตำแหน่งของกรดปาล์มมิติกในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เพียงแค่ตำแหน่งเดียว แต่สามารถเข้าทำ

ปฏิกิริยาตรงตำแหน่งของกรดไขมันชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์มได้ด้วย เมื่อนำสารละลายเอนไซม์มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate จึงทำให้เกิดสีที่ชัดเจน สามารถตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ชัดเจนกว่าสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนั้นยีสต์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Kademi และคณะ (2000) พบว่า แยกได้จากตัวอย่างน้ำ, กากปาล์มและดิน จำนวน 22, 19 และ 8 สายพันธุ์ โดยพีเอชของตัวอย่างที่นำมาแยกมีค่าพีเอชอยู่ในระหว่าง 4-6 ยกเว้นยีสต์สายพันธุ์ U2Y68 และ D7Y109 ที่แยกได้จากตัวอย่างที่มีค่าพีเอช 7 เมื่อพิจารณาถึงอุณหภูมิ จะเห็นได้ว่ายีสต์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 27-64 องศาเซลเซียส โดยสายพันธุ์ P11I89 ที่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีเป็นยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินสีน้ำตาล ที่มีน้ำมันปนเปื้อน มีค่าพีเอช 5 อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ดังนั้นการคัดแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ควรเลือกเก็บตัวอย่างที่มีค่าพีเอชในช่วง 4-6 เพราะค่าความเป็นกรดต่างเป็นข้อจำกัดของการคัดแยกยีสต์มากกว่าระดับของอุณหภูมิ

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

Table 12. Lipase activity of lipase-producing yeasts.

Yeast strain	Source	pH	Temp (°C)	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	0.006±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

Table 12. Lipase activity of lipase-producing yeasts (continue).

Yeast strain	Source	pH	Temp (°C)	Activity (Unit/ml)
U8I64	Waste water	4.0	54	0.010±0.002
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±0.002
A3I37	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	31	0.016±0.004
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	0.022±0.004
P1I189	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	0.035±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	0.061±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±0.004
U4I51	Brown color waste water	4.0	64	0.124±0.002
P5I07	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	37	0.174±0.003
D2I75	Oil contaminated brown color soil	4.0	35	0.219±0.015

Table 12. Lipase activity of lipase producing yeasts (continue).

Yeast strain	Source	pH	Temp (°C)	Activity (Unit/ml)
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±0.002
A1Y40	Soil mixed palm pressed fiber	5.0	33	0.014±0.002
A2Y43	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	33	0.018±0.002
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±0.002
D1Y89	Oil contaminated brownish color water	6.0	34	0.101±0.002
U5Y75	Waste water	4.0	42	0.102±0.001
P2Y04	Floating oil on surface of yellow color water	4.0	45	0.118±0.010
A5Y54	Oil contaminated dark color soil	5.0	32	0.124±0.002
A6Y59	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	34	0.166±0.008
A4Y52	Oil contaminated palm pressed fiber	6.0	29	0.216±0.006

Table 12. Lipase activity of lipase producing yeasts (continue).

Yeast strain	Source	pH	Temp (°C)	Activity (Unit/ml)
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

2.2 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเอสเทอร์ฟิเคชันของยีสต์ผลิตไลเปสที่คัดเลือกได้เป็นตัวเร่ง

จากการนำยีสต์จำนวน 49 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) และน้ำมันปาล์ม จากข้อ 3.2.1 มาวัดความสามารถในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล อัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 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 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงอาจจะไม่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเอสเทอร์ฟิเคชันเสมอไป จาก Table 13 แสดงปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากปฏิกิริยาทรานเอสเอสเทอร์ฟิเคชัน 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

2.3 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเอสเทอร์ฟิเคชันของยีสต์ผลิตไลเปสที่คัดเลือกได้เป็นตัวเร่ง

จากการนำยีสต์จำนวน 49 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) และน้ำมันปาล์มจากข้อ 3.2.1 มาวิเคราะห์ความสามารถในการทำปฏิกิริยาเอสเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกบริสุทธิ์กับเมทานอล อัตราส่วนโมล 1:3 โดยใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) แล้ววัดปริมาณโอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น พบว่า ยีสต์ทั้ง 49 สายพันธุ์ สามารถผลิตโอเลอิก

เมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากกรดไขมันคือเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ ดังแสดงตาม Table 13 โดยยีสต์สายพันธุ์ P11I89 ผลิตโอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 64.12 ± 2.52 เปอร์เซ็นต์

จากปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มียีสต์สายพันธุ์ P11I89 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 51.26 ± 1.24 เปอร์เซ็นต์ และ โอเลอิกเมทิลเอสเทอร์สูงสุด 64.12 ± 2.52 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกยีสต์สายพันธุ์นี้มาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

Table 13. Methyl ester production from transesterification reaction and oleic methyl ester production from esterification reaction catalyzed by lipase-producing yeast cells.

Yeast strains	Hydrolysis activity (Unit/ml)	Methyl ester \pm SD (%)	Oleic methyl ester \pm SD (%)
P2I02	0.023 ± 0.004	-	1.180 ± 0.523
P4I03	0.028 ± 0.003	-	1.280 ± 0.523
P5I07	0.175 ± 0.003	2.015 ± 0.120	1.055 ± 0.827
P6I11	0.009 ± 0	0.445 ± 0.120	1.515 ± 0.007
P7I13	0.116 ± 0.005	1.265 ± 0.007	1.005 ± 0.148
P8I20	0.029 ± 0	-	1.415 ± 0.233
P8I21	0.008 ± 0.003	1.740 ± 0.127	1.065 ± 0.106
P10I24	0.062 ± 0.005	-	0.865 ± 0.021
A1I27	0.065 ± 0.002	-	1.975 ± 0.205
A2I29	0.036 ± 0.009	2.110 ± 0.919	1.910 ± 0.014
A3I35	0.040 ± 0.007	-	1.605 ± 0.360
A3I37	0.016 ± 0.005	-	1.215 ± 0.205
A5I41	0.119 ± 0	-	1.185 ± 0.233
A7I46	0.014 ± 0.001	-	1.040 ± 0.056
U3I50	0.122 ± 0.003	-	2.115 ± 0.841
U4I51	0.123 ± 0.002	0.370 ± 0.042	1.560 ± 0.028
U5I52	0.004 ± 0.001	-	1.755 ± 0.190
U6I57	0.021 ± 0.003	-	1.565 ± 0.261
U6I60	0.004 ± 0.001	-	1.805 ± 0.077

Table 13. Methyl ester production from transesterification reaction and oleic methyl ester production from esterification reaction catalyzed by lipase-producing yeast cells. (continue).

Yeast strains	Hydrolysis activity (Unit/ml)	Methyl ester ± SD (%)	Oleic methyl ester ± SD (%)
U8I64	0.010±0.001	-	1.020±0.014
U8I68	0.020±0.002	0.570 ± 0.014	1.425 ± 0.685
D1I69	0.007±0.001	3.075 ± 0.106	0.905 ± 0.063
D1I72	0.010±0.002	-	1.615±0.049
D1I73	0.010±0.002	1.845 ± 1.421	1.295 ± 0.106
D2I74	0.032±0.004	1.875 ± 0.784	1.570 ± 0.070
D2I75	0.219±0.015	-	1.990±0.014
P1I89	0.026±0.002	51.260 ± 1.247	64.123 ± 2.525
P2Y04	0.118±0.009	1.470 ± 0.197	1.545 ± 0.403
P4Y09	0.086±0.002	-	2.060±0.084
P4Y12	0.406±0.008	-	1.185±0.021
P6Y16	0.029±0	1.235 ± 0.247	2.635 ± 1.590
P6Y18	0.088±0.002	-	1.095±0.544
P6Y24	0.068±0.005	0.485 ± 0.021	1.910 ± 0.197
A1Y40	0.014±0.001	-	2.130±0.367
A2Y43	0.018±0.003	-	1.355±0.148
A3Y48	0.031±0.003	-	1.560±0.410
A4Y52	0.216±0.005	-	1.720±0.367
A5Y54	0.123±0.002	-	0.850±0.197
A6Y58	0.004±0.001	-	2.130±0.254
A6Y59	0.166±0.007	-	1.445±0.247
U2Y68	0.248±0.002	-	1.395±0.007
U3Y69	0.024±0.001	-	1.625±0.219
U4Y73	0.098±0.003	-	1.010±0.325

Table 13. Methyl ester production from transesterification reaction and oleic methyl ester production from esterification reaction catalyzed by lipase-producing yeast cells. (continue).

Yeast strains	Hydrolysis activity (Unit/ml)	Methyl ester ± SD (%)	Oleic methyl ester ± SD (%)
U5Y75	0.102±0.001	1.555 ± 0.417	0.960 ± 0.268
D1Y89	0.101±0.002	-	1.700±0.070
D2Y95	0.004±0.001	-	0.985±0.007
D5Y101	0.077±0.004	-	1.525±0.445
D7Y109	0.010±0.001	-	0.875±0.176
D8Y112	0.030±0.002	1.840 ± 1.187	1.215 ± 0.021

3. 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) เปรียบเทียบกับลำดับ ซึ่งจากผลการจัดจำแนก ยีสต์สายพันธุ์ที่ทำการคัดแยกมาได้มีรายงานว่ามีการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดย Wang และคณะ (2007) ทำการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำทะเล, ตะกอนดิน, โคลน, กระจาของปลาทะเล และสาหร่ายทะเล พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมาเป็นเอนไซม์ที่เกาะบริเวณผิวเซลล์ (cell bound) ในส่วนของ Costas และคณะ (2004) ศึกษาความสามารถของยีสต์สายพันธุ์ *Issstchenkia orientalis* พบว่า ยีสต์สายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์ไลเปสแบบ extracellular มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี tributyrin เป็นแหล่ง

คาร์บอน และการศึกษาของ Haba และคณะ (2000) พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Candida tropicalis* ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยลงเมื่อมีน้ำมันมะกอกที่ใช้แล้วปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

4. การศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ P11I89

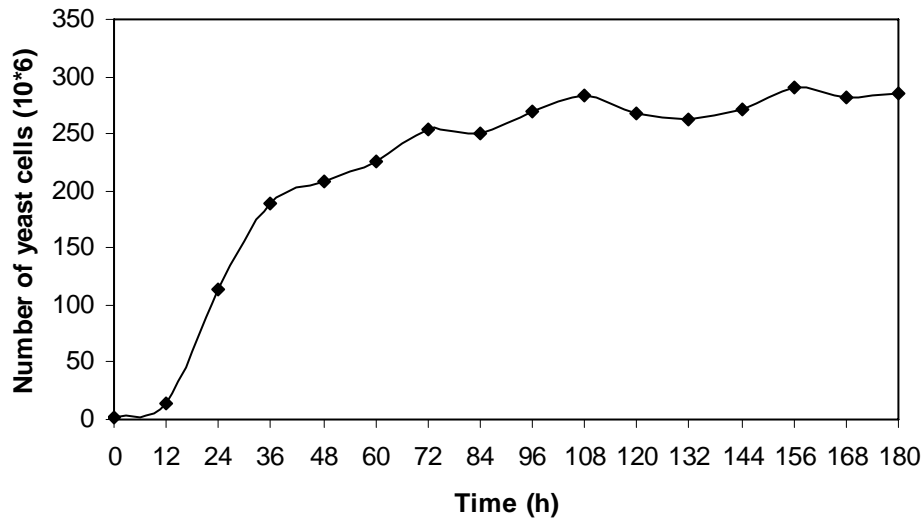


Figure 10. Growth of *Rhodotorula mucilagenosa*.

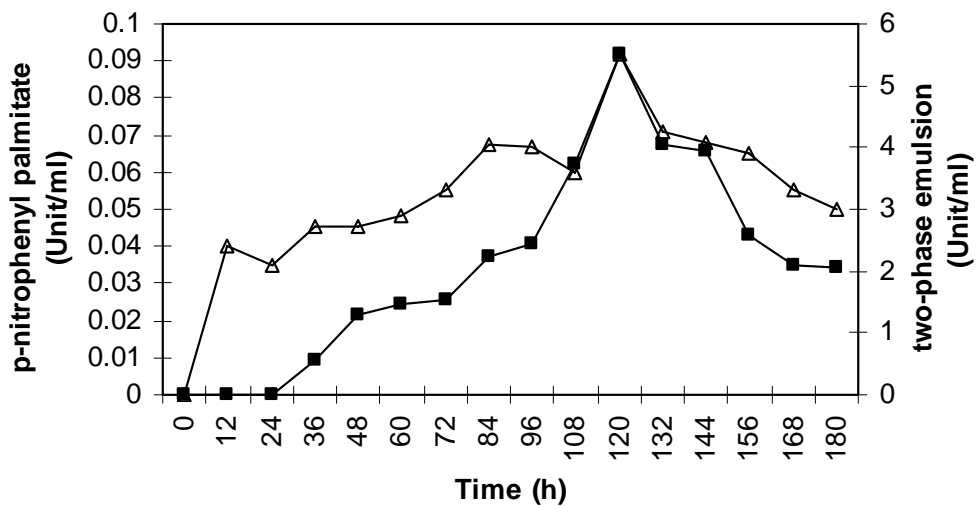


Figure 11. Activity of lipolytic activity when used *p*-nitrophenyl palmitate as substrate (■) and two-phase emulsion method (△).

ยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งดิน แหล่งน้ำ ตะกอนดิน และโคลนนี้จะมีการปรากฏกลมรี สีแดง สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ ไม่มีการสร้างเส้นใย (Barnett *et al.*, 2000) จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* (Figure 10) โดยทำการเลี้ยงในอาหาร IMY เป็นเวลา 180 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อทำการนับจำนวนเซลล์และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีวิเคราะห์ของ Kademi และคณะ (2000) และวิธี two-phase emulsion ทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่า ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเป็นช่วง Lag phase ซึ่งเป็นช่วงที่ยีสต์ยังไม่เพิ่มจำนวน มีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ แต่เซลล์จะร่วงไป และสังเคราะห์โปรตีนโทพลาซิมใหม่ รวมทั้งเอนไซม์ โคเอนไซม์ คีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เพื่อให้เพียงพอต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ หลังจากชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 72 การเจริญเติบโตของยีสต์จะเข้าสู่ระยะ Log phase ยีสต์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์ร่วงไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว หลังจากชั่วโมงที่ 72 เป็นต้นไป ยีสต์เริ่มเข้าสู่ Stationary phase คือมีการเจริญเติบโตที่คงที่ มีจำนวนเซลล์ในแต่ละชั่วโมงไม่แตกต่างกันมากนัก (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

นอกจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Kademi และคณะ (2000) (Figure 11) และวิธี two-phase emulsion ซึ่งการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนั้นเป็นการวิเคราะห์ส่วนของ extracellular lipase เพื่อบ่งบอกการผลิตเอนไซม์ พบว่า เมื่อใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 มีค่าเท่ากับ 0.009 ± 0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 มีค่าเท่ากับ 0.092 ± 0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่าลดลง โดยชั่วโมงที่ 180 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.034 ± 0 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ในส่วนของการใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรทในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี two-phase emulsion (Figure 11) พบว่า สามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดชั่วโมงที่ 120 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 5.502 ± 0.094 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งสองวิธี จะเห็นได้ว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 เช่นเดียวกัน โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดวัดได้ระหว่างที่ยีสต์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase ดังนั้นในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยา ทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง จะทำการเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 120 เนื่องจากที่ชั่วโมงนี้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด

5. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือก เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

5.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ดังแสดงผลใน Table 14 โดยค่าสaponification ใช้เป็นตัวชี้บ่งขนาดของโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมัน จากค่าสaponification สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ได้เท่ากับ 867.97, 867.50 และ 910.52 ส่วนการหาปริมาณสารเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในน้ำมันด้วยค่าเปอร์ออกไซด์นั้น พบว่า น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์มีค่าเปอร์ออกไซด์สูงสุดรองลงมา คือ น้ำมันปาล์มดิบ 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 รองลงมาเป็นกรดปาล์มมิติกและกรดลิโนเลอิก ตามลำดับ ถ้ากรดไขมันส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว คือ กรดโอเลอิกและกรดลิโนเลอิก จะทำให้น้ำมันเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง (นิธิยา รัตนานพนธ์, 2541) ส่วนน้ำมันปาล์มดิบมีปริมาณของกรดโอเลอิกและกรดปาล์มมิติกใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบหลักใกล้เคียงกันอีกด้วย จึงทำให้น้ำมันปาล์มดิบมีลักษณะเป็นของเหลวปะปนอยู่กับของแข็งที่อุณหภูมิห้อง

Table 14. Properties and fatty acid composition of palm oil.

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

Table 15. Fatty acid composition of palm oil.

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

5.2 ผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.210 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรท มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลเป็นสับสเตรท ผสมกันในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 5, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำในระบบ 1.38, 3.38, 6.38, 11.38 และ 31.38 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในช่วง 0-10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จะลดลง (Figure 12) โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรสับสเตรท สามารถผลิตเมทิล

เอสเทอร์ได้สูงสุด 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 (Figure 13-15) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการเติมน้ำในปฏิกิริยา 10 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด

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 เปอร์เซ็นต์และไม่เติมน้ำ จะเห็นได้ว่าแต่ละชั่วโมงในระหว่างการทำปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าการทดลองที่มีการเติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ เช่น ในชั่วโมงที่ 36 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของการทดลองที่เติมน้ำ 2 เปอร์เซ็นต์และไม่เติมน้ำ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 23.86 และ 17.76 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการทดลองที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ถึง 29.06 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังมีส่วนช่วยในกลไกการทำปฏิกิริยาในหลายๆ ปฏิกิริยาที่มีสาเหตุทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ดังเช่นในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งมีเมทานอลเป็นสับสเตรท 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 ซึ่งปริมาณสูง

กว่าที่เติมน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เพียง 43.20 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองที่เกิดขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าเมทานอลที่เติมลงไปเพื่อเป็นสับสเตรทนั้นไปทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เพราะเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้น โอกาสที่เอนไซม์จะถูกทำลายก็มีมากขึ้น จึงทำให้ในการทดลองที่เติมน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 72 ในขณะที่การทดลองที่เติมน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์นั้น ปริมาณน้ำที่มากกว่าจะเข้าไปช่วยลดการเสียดสภาพของเอนไซม์เมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นการเกิดเป็นผลิตภัณฑ์จึงยังเกิดขึ้นต่อไป (Salis *et al.*, 2005)

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 ในชั่วโมงที่ 60 และ 72 รวมถึงปริมาณ 1-2 ไดกลีเซอไรด์, 1-3 ไดกลีเซอไรด์ และ โมโนกลีเซอไรด์ ก็มีปริมาณที่เหลือน้อยกว่าในการทดลองที่เติมน้ำ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นเช่นนี้เพราะเมื่อมีปริมาณน้ำในระบบมาก น้ำจะช่วยให้อนุภาคของเอนไซม์รวมตัวกันและทำให้การกระจายตัวของสับสเตรทเกิดขึ้นน้อยลง การสัมผัสกันระหว่างสับสเตรทและเอนไซม์จะเป็นไปได้ยากขึ้น การเกิดปฏิกิริยาทั้งไฮโดรไลซิสและทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันจึงเกิดได้น้อยลง (Salis *et al.*, 2005) นอกจากนี้ ปริมาณของกรดไขมันอิสระจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีน้ำในระบบมากขึ้น ในการทดลองที่เติมน้ำ 30, 20 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แนวโน้มของปริมาณกรดไขมันอิสระจะสูงขึ้นมากกว่าในระบบที่เติมน้ำ 5, 2 และไม่เติมน้ำ แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีน้ำมากขึ้น ส่งผลให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดมากขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Kamini และ Iefuji (2001) ศึกษาผลของน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสที่มีสับสเตรทระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 (โมล:โมล) มีเอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus* spp. 2000 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในระบบ แต่ปริมาณกรดไขมันอิสระซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะสูงขึ้น โดยที่เติมน้ำ 13 เปอร์เซ็นต์ค่อน้ำหนักสับสเตรท ปริมาณกรดไขมันอิสระ

เท่ากับ 24.0 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเติมน้ำถึง 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท กรดไขมันอิสระจะมี ปริมาณสูงถึง 42.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกับการ ทดลองของ Kaieda และคณะ (1999) ศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยามาเทนอลิซิสโดยใช้ สับสเตรทที่มีส่วนผสมของ น้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล ในอัตราส่วนโมล 1:1 โดยใช้เอนไซม์ไล เปสตรังรูปจาก *Rhizopus oryzae* 210 ยูนิต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเติมสารละลายเอนไซม์ปริมาณ 1.2-9.0 มิลลิลิตร (ปริมาณน้ำ 4-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท) พบว่า ที่ปริมาณน้ำ 15 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงขึ้น 80-90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม Li และคณะ (2007) ศึกษาผลของน้ำต่อปฏิกิริยามาเทนอลิซิสโดยใช้น้ำมันเรพซิดและเมทานอลเป็นสับสเตรท ในอัตราส่วนโมล 1:4 มีการเติม *tert*-บิวทานอลในระบบ และใช้ตัวเซลล์ตรังรูปจาก *Rhizopus oryzae* IFO 4697 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า เมื่อเติมน้ำเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 68 เปอร์เซ็นต์

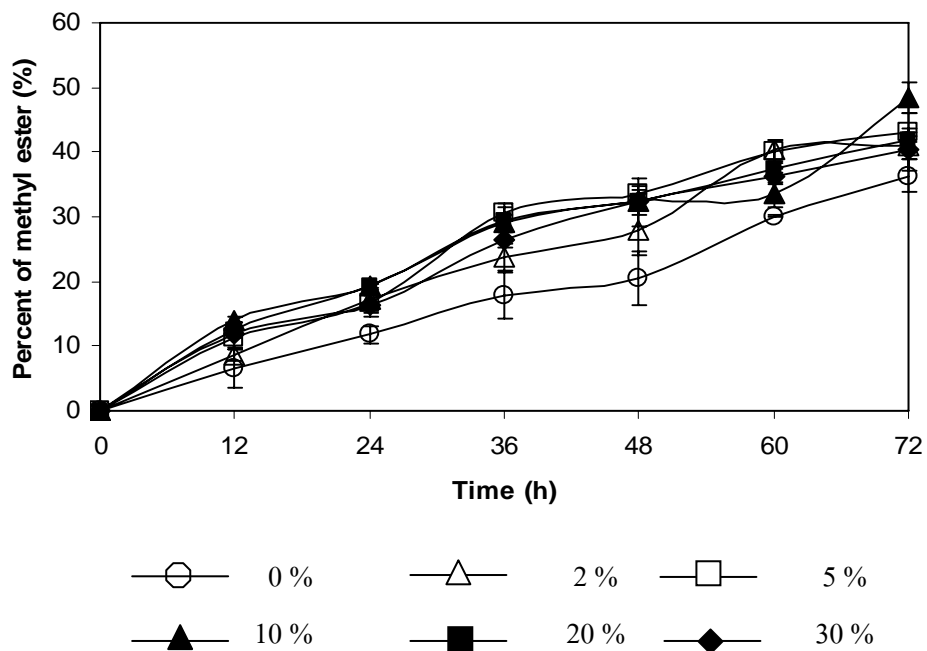


Figure 12. Effect of water on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.210 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

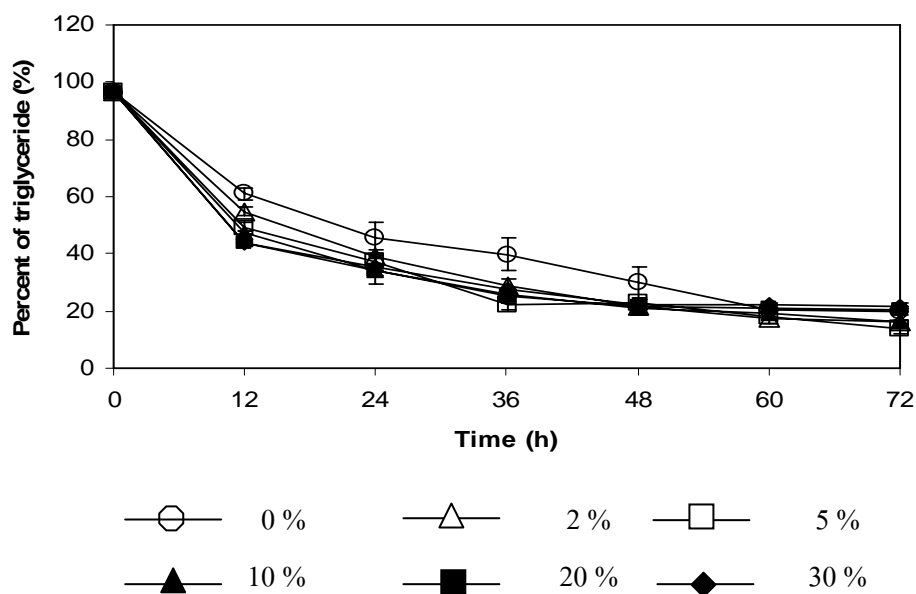
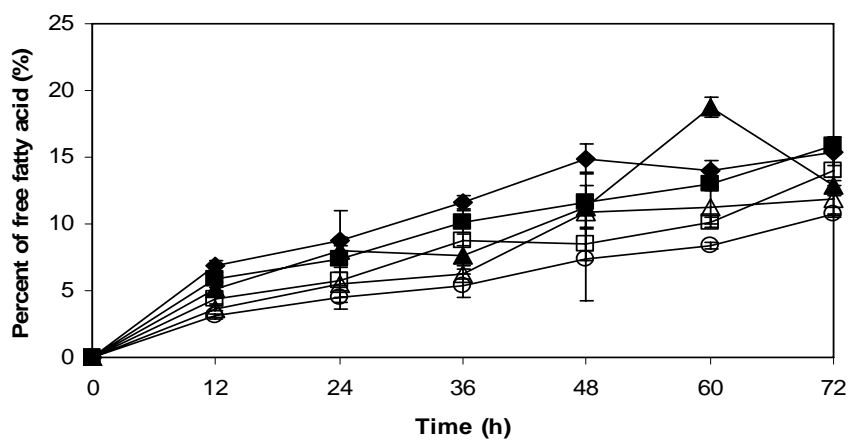


Figure 13. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.210 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

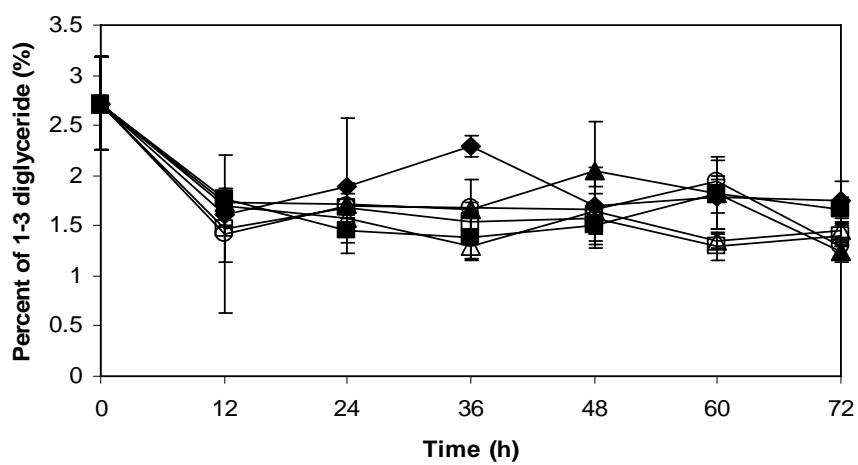
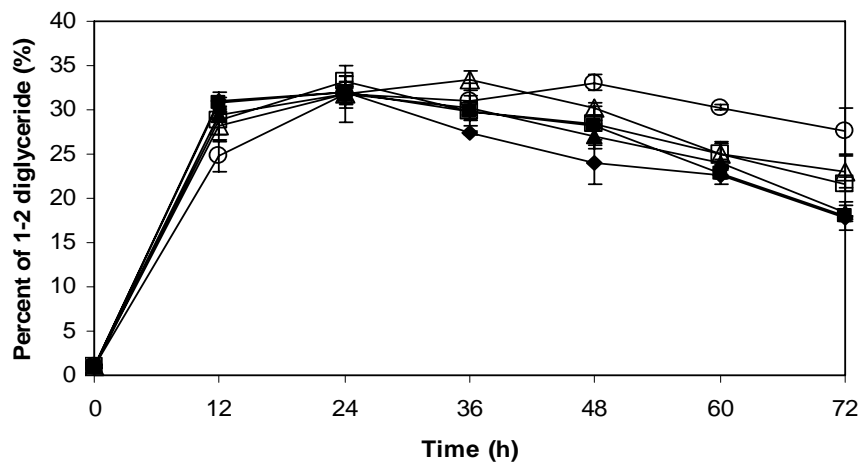


Figure 14. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.210 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

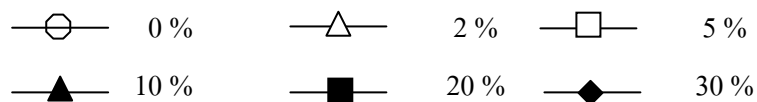
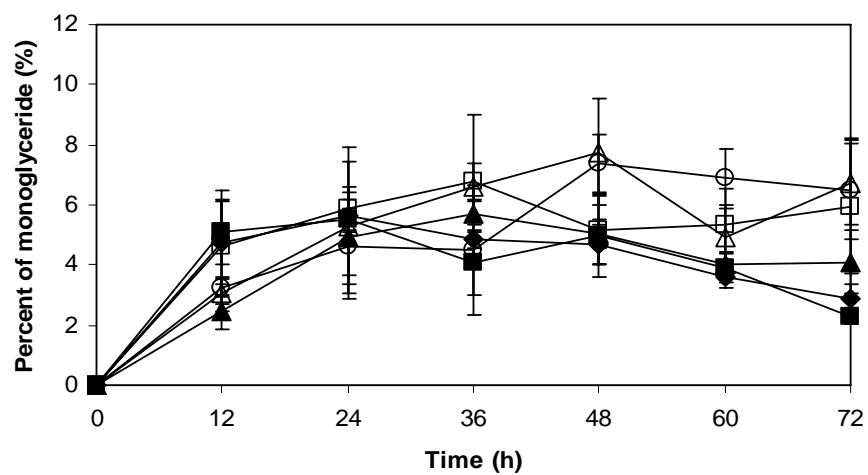


Figure 15. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.210 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

5.3 ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา ทรานสเอสเทอร์ฟิเคชัน 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 และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท คิดเป็นปริมาณน้ำในระบบ 11.38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 2.829 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า การใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทในการเร่งปฏิกิริยา สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุด 48.32 เปอร์เซ็นต์ (Figure 16) แต่การใช้ปริมาณเซลล์ 0.5×10^{10} , 1×10^9 , 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 และ 0.003 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในการเร่งปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ฟิเคชันสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพียง 21.62, 1.38, 0.46, 0.48 และ 0.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้นก็คือการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่จะเข้าไปทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ฟิเคชันนั่นเอง

นอกจากนี้ปริมาณของเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาก็มีผลต่อการย่อยไตรกลีเซอไรด์ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 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 (Figure 17) จะเห็นได้ชัดเจนว่าที่ใช้ปริมาณเซลล์ 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท มีการย่อยไตรกลีเซอไรด์น้อยมาก ดังนั้นการเพิ่มอัตราส่วนปริมาณเซลล์ต่อกรัมสับสเตรทให้มากขึ้นก็จะสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีขึ้น ถึงแม้ว่าการเพิ่มปริมาณเซลล์จะเป็นการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ซึ่งส่งผลให้มีการเร่งปฏิกิริยาให้สูงขึ้น แต่ในทางปฏิบัติการเตรียมเซลล์ที่มากกว่า 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทนั้นยังมีข้อจำกัด ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์คือ 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 ดังแสดงใน Figure 17-19 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chen และคณะ (2009) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปส *Candida antarctica* ที่ตรึงแล้ว ในการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยเติมปริมาณเอนไซม์ในช่วง 5-35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมัน มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 222.5 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้นจะทำให้โมเลกุลของสับสเตรทถูกจับกับบริเวณเร่ง (active site)

ได้มากขึ้น แต่เมื่อเติมปริมาณเอนไซม์ในช่วง 25-35 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นนั้น มีปริมาณใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเติมเอนไซม์ 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมัน จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามากที่สุด และเช่นเดียวกับผลการทดลองของ Kose และคณะ (2002) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสต่อปฏิกิริยามะทาโนไลซิสของน้ำมันเมล็ดฝ้ายและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:3 (โม่ล : โม่ล) มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส 30 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำมันักสับสเตรท สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 83.6 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไลเปสเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำมันักสับสเตรท ความสามารถในการผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง นอกจากนี้ Qin และคณะ (2008) ศึกษาการใช้ whole-cell ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus chinensis* 24.5 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในอัตราส่วนน้ำมันถั่วเหลืองต่อเมทานอล 1:3 (โม่ล : โม่ล) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้มากกว่า 86 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ยังคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าการทดลองนี้กิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยายังมีค่าต่ำกว่าที่ใช้ในงานวิจัยอื่นอย่างมาก คือมีค่ากิจกรรมเพียง 2.829 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ในขณะที่การทดลองอื่นๆ ใช้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมในระดับสูงถึง 24.5-225.5 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์สูงกว่าการทดลองนี้มาก

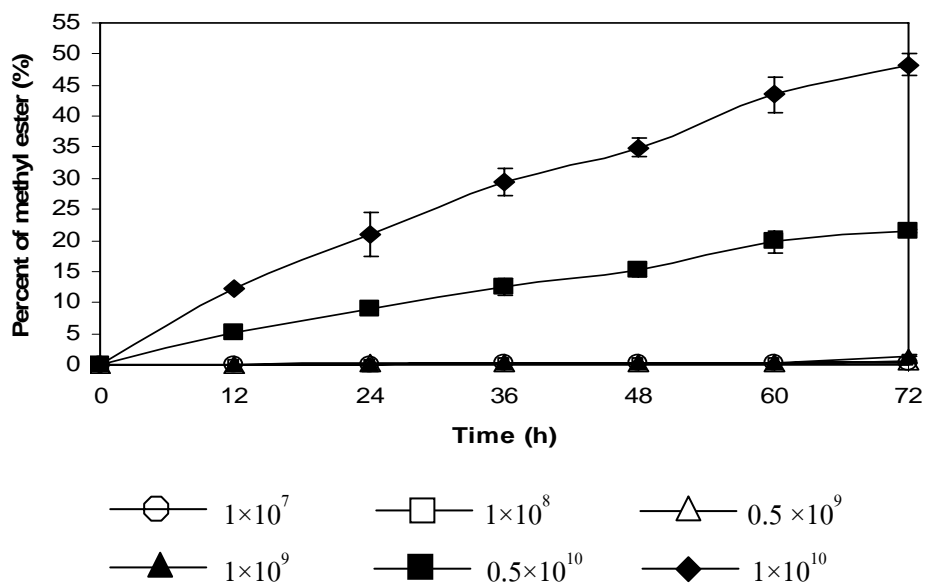


Figure 16. Effect of yeast cell concentrations on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.829, 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 and 0.003 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

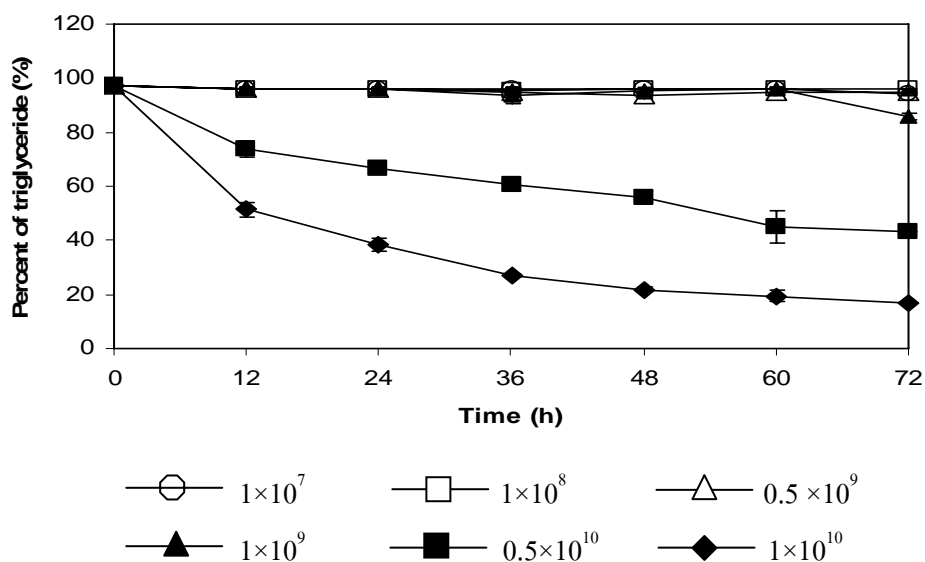
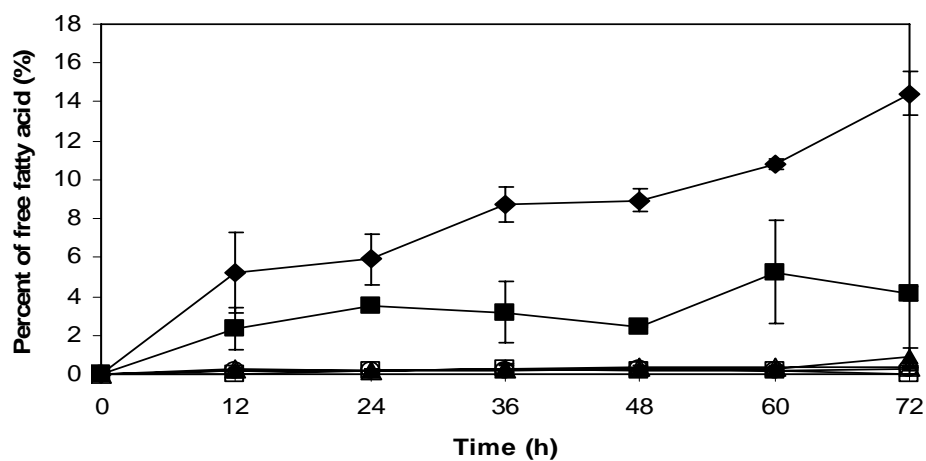


Figure 17. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.829, 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 and 0.003 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

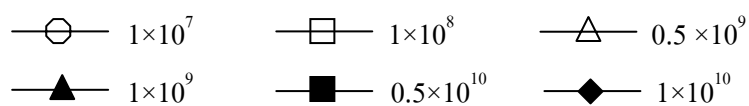
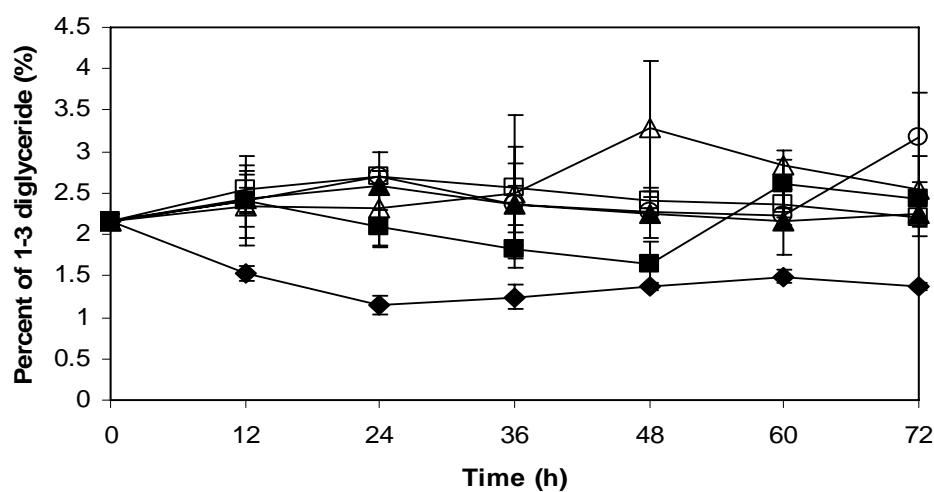
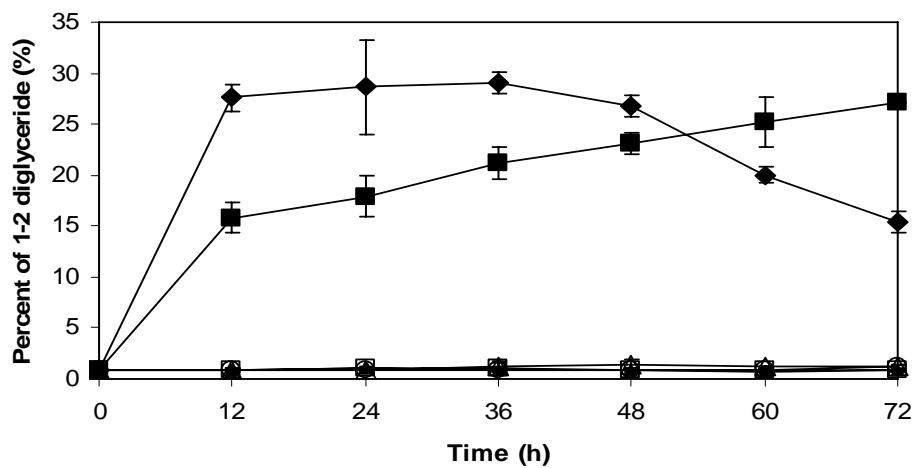


Figure 18. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.829, 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 and 0.003 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

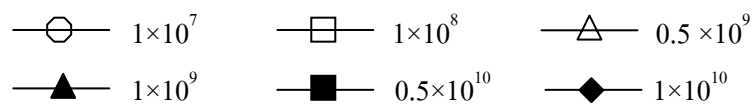
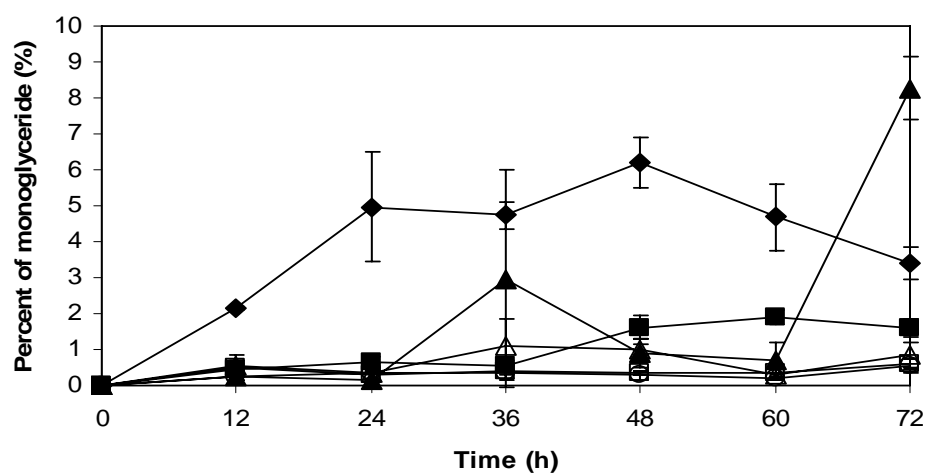


Figure 19. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.829, 1.414, 0.283, 0.141, 0.028 and 0.003 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

5.4 ผลของการเพิ่มปริมาณเอนไซม์โดยใช้ supernatant ร่วมกับเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของการเพิ่มปริมาณเอนไซม์โดยใช้ supernatant ร่วมกับเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยระบบที่มีเซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 3.100 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ฟิเคชันมีสับสเตรท คือ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:3 (โมล : โมล) เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ 48.17 เปอร์เซ็นต์ (Figure 20) ส่วนระบบที่ใช้ supernatant 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรทร่วมกับเซลล์ยีสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 3.700 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ได้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ 45.48 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 (Figure 18) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ จะเห็นได้ว่ามีกิจกรรมทั้งในส่วนของตัวเซลล์และส่วนของ supernatant แสดงว่าการทำปฏิกิริยาของระบบ เอนไซม์ไลเปสที่เกาะอยู่ที่ตัวเซลล์ของยีสต์ (cell bound) มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ฟิเคชันมากกว่าเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในส่วนของ supernatant เมื่อทำการวัดค่าพีเอชส่วนของ supernatant พบว่ามีค่าพีเอชประมาณ 4-5 จึงเป็นไปได้ว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ลดลงเป็นผลจากค่าพีเอช แต่เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ พบว่า ที่พีเอช 5.0 มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นเพียง 35.10 เปอร์เซ็นต์ (Figure 28) ซึ่งมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่น้อยกว่าการเติมส่วนของ supernatant แสดงว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ลดลงเมื่อเติมส่วนของ supernatant ไม่ได้เป็นผลจากค่าพีเอช นอกจากนั้นปริมาณ ไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไตรกลีเซอไรด์, 1-2 ไตรกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ ที่เหลืออยู่ในการทดลองที่เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เท่ากับ 12.76, 1.39, 19.21, 4.50 และ 13.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 21-23) โดยจากการศึกษาของ Wang และคณะ (2007) ในความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* พบว่า ยีสต์สายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์ขึ้นมาเกาะบริเวณผิวเซลล์ (cell bound) จึงอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ระบบที่ใช้ supernatant ร่วมกับเซลล์ยีสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้น้อยกว่าระบบที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรทของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ร่วมกับเซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

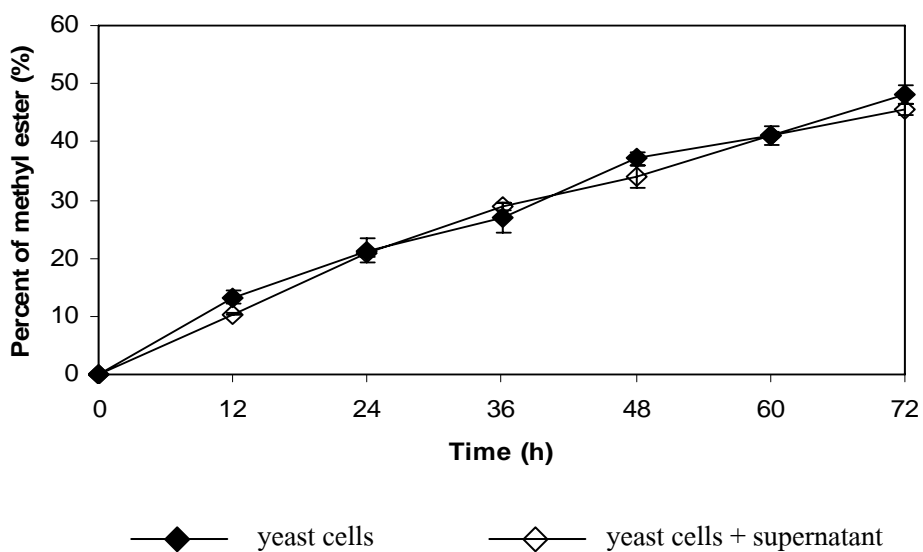


Figure 20. Effect of yeast cell concentrations and supernatant on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate (yeast cells) and 3.700 unit/g substrate (yeast cells+ supernatant) in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

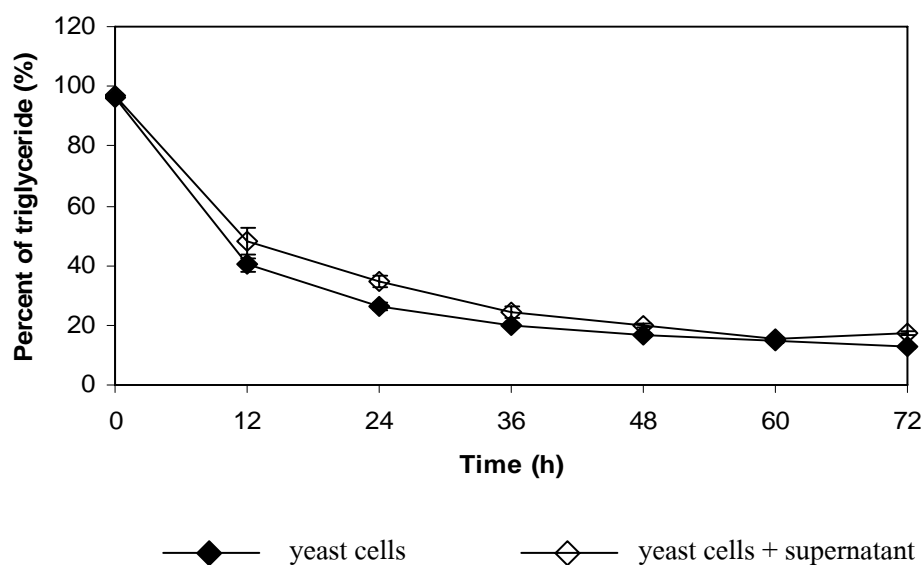
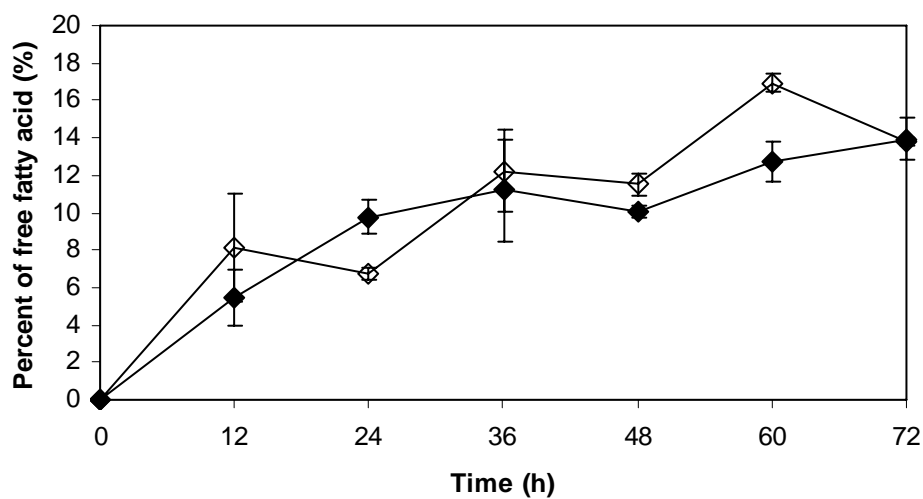


Figure 21. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate (yeast cells) and 3.700 unit/g substrate (yeast cells+ supernatant) in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

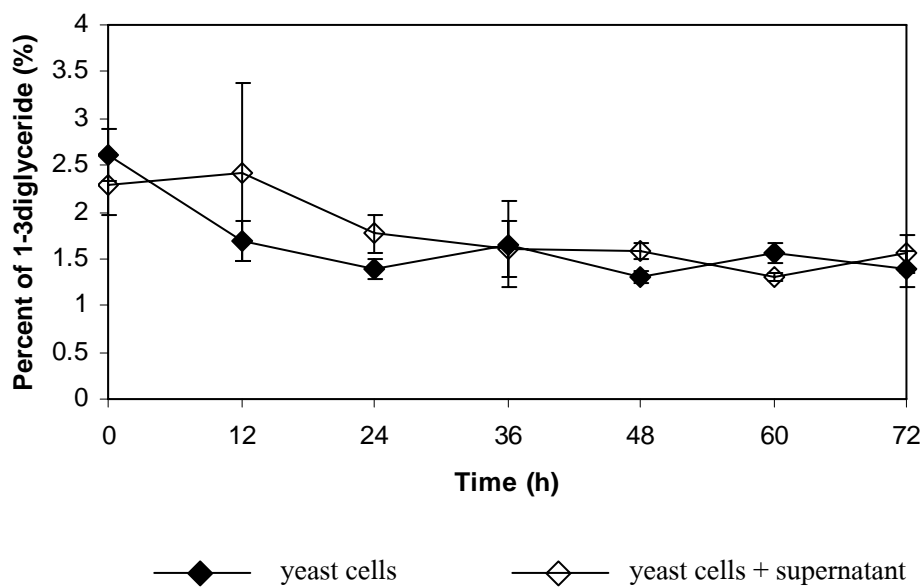
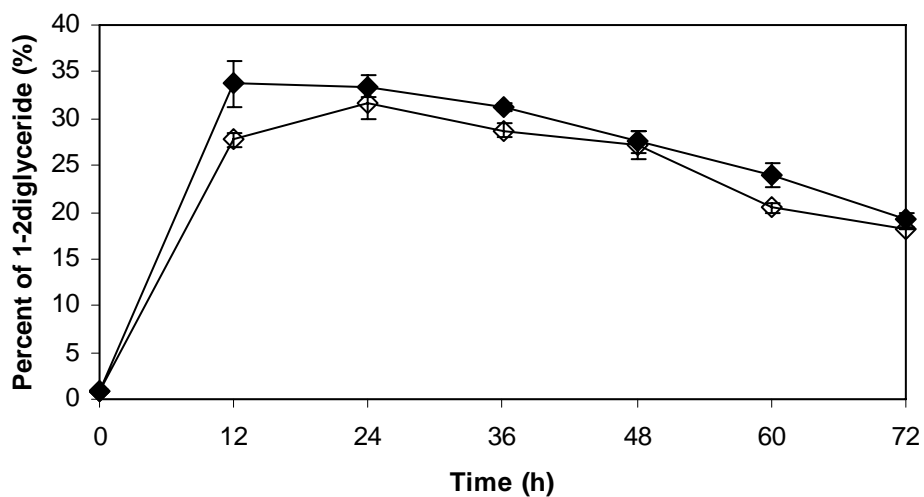
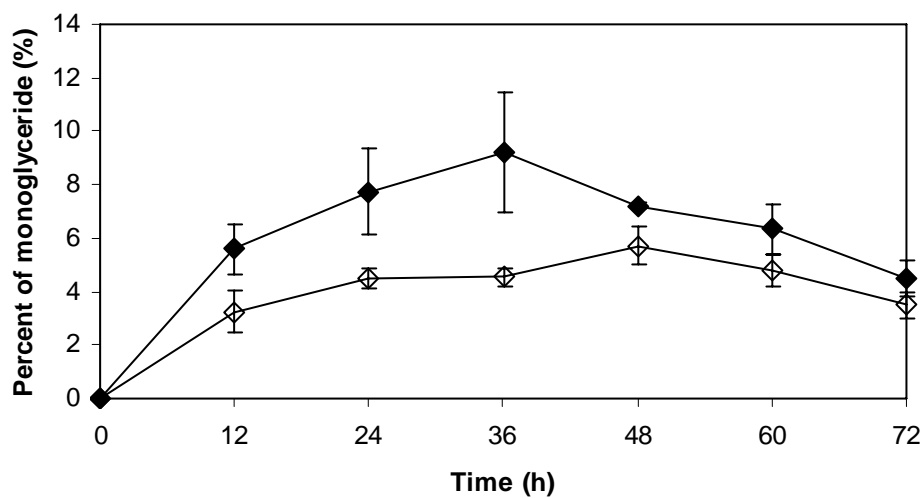


Figure 22. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate (yeast cells) and 3.700 unit/g substrate (yeast cells+ supernatant) in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)



—◆— yeast cells —◇— yeast cells + supernatant

Figure 23. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate (yeast cells) and 3.700 unit/g substrate (yeast cells+ supernatant) in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

5.5 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 3.100 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทรานสเอสเทอร์ฟิเคชัน มีสับสเตรท คือ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:3 (โมล : โมล) เดิมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2), 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 45 และ 37 องศาเซลเซียส ได้เมทิลเอสเทอร์ 8.38 และ 41.59 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิห้อง สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุด คือ 48.17 เปอร์เซ็นต์ (Figure 24) โดยทั่วไปปฏิกิริยาเคมีจะทำงานได้ดีเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนมักไม่คงตัวต่อความร้อนทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานได้ดีแตกต่างกัน (สาโรจน์ ศิริคันสนีกุล, 2538) นอกจากนั้นปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไดกลีเซอไรด์, 1-2 ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ ที่เหลืออยู่ในการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 12.76, 1.39, 19.21, 4.50 และ 13.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 25-27) ดังนั้นอุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) คืออุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kamini และ Jefuji (2001) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยามะทาโนไลซิสของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *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) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยามะทาโนไลซิสของน้ำมันมะกอก 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) ซึ่งศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยามะทาโนไลซิสของน้ำมันเมล็ดฝ้าย ในอัตราส่วน 1:4 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปจาก *Candida antarctica* ในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตเมทิลเอสเทอร์เพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 91.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ส่วน Du และคณะ (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ด้วย

ปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส มีน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล ในอัตราส่วนโมล 1:4 เป็นสับสเตรท โดยมี เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Thermomyces lanuginosus* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด แต่เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ซ้ำจะต้องทำปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส จึงยังคงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูง เช่นเดิม

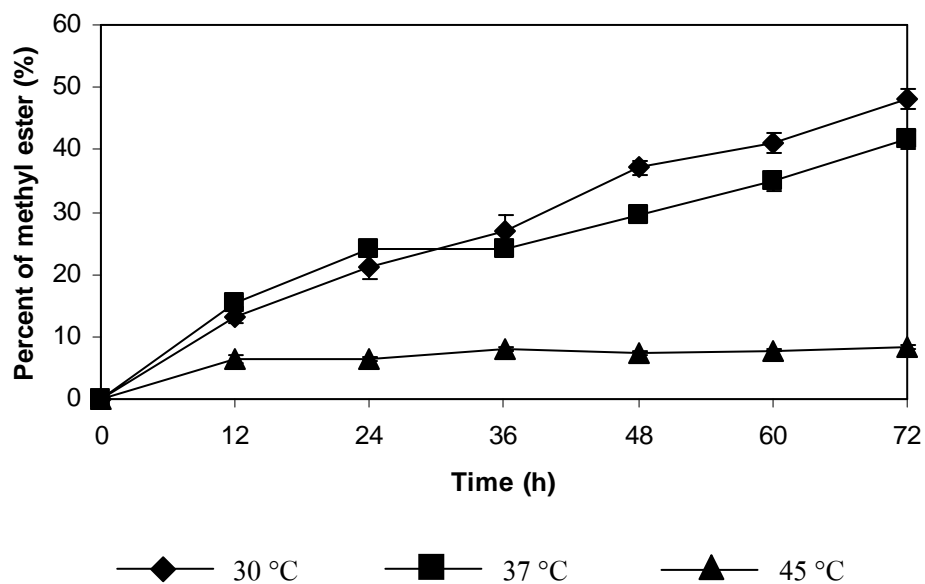


Figure 24. Effect of temperature on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

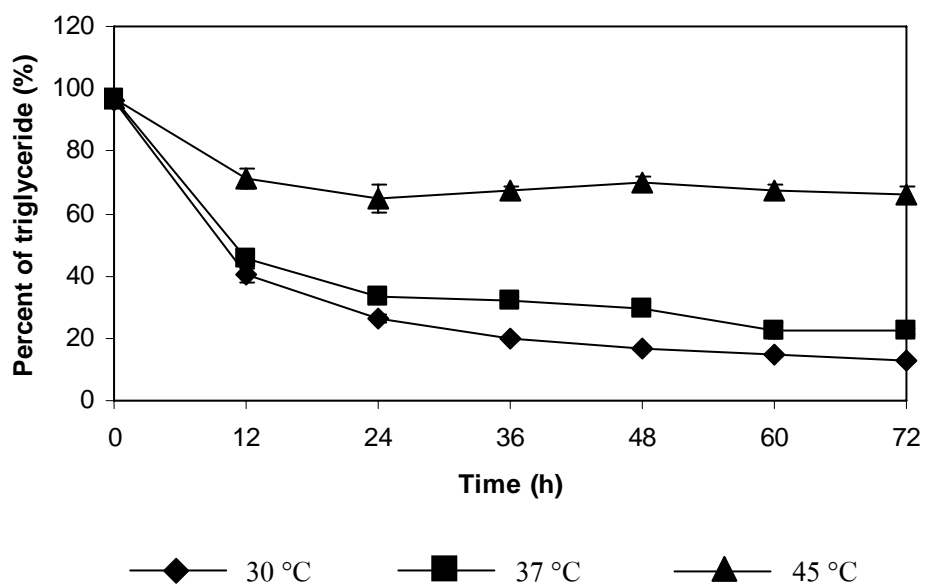
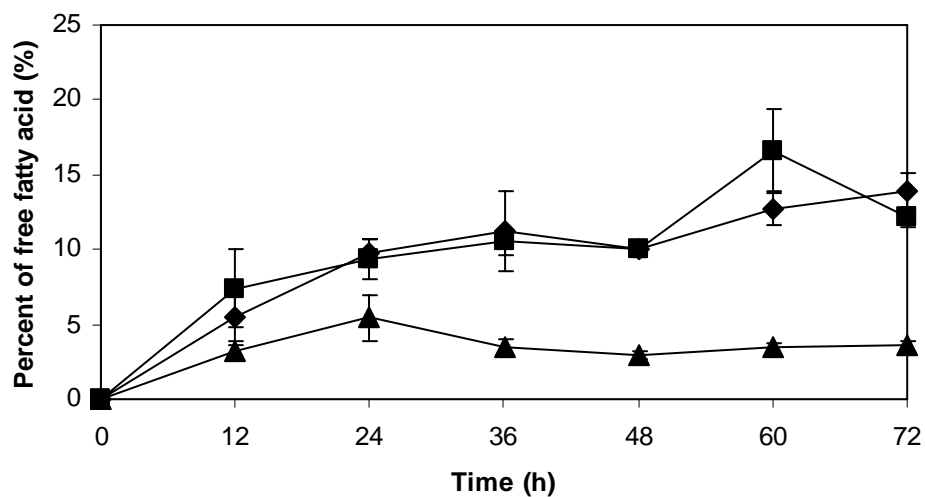


Figure 25. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 3.100 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

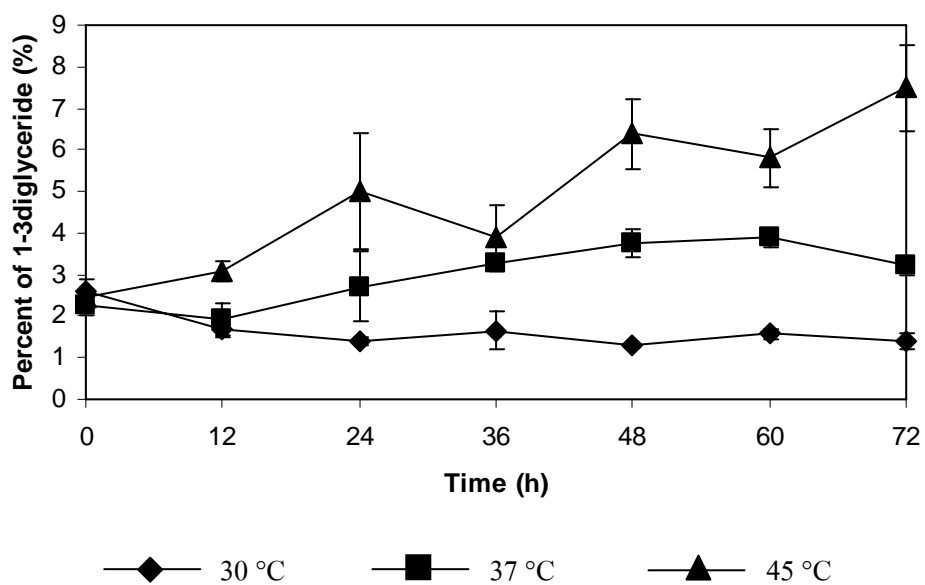
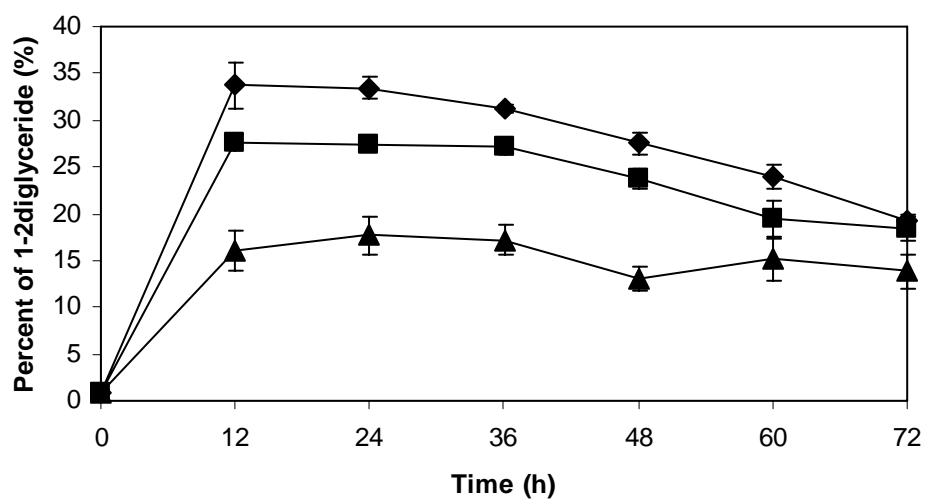


Figure 26. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 3.100 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

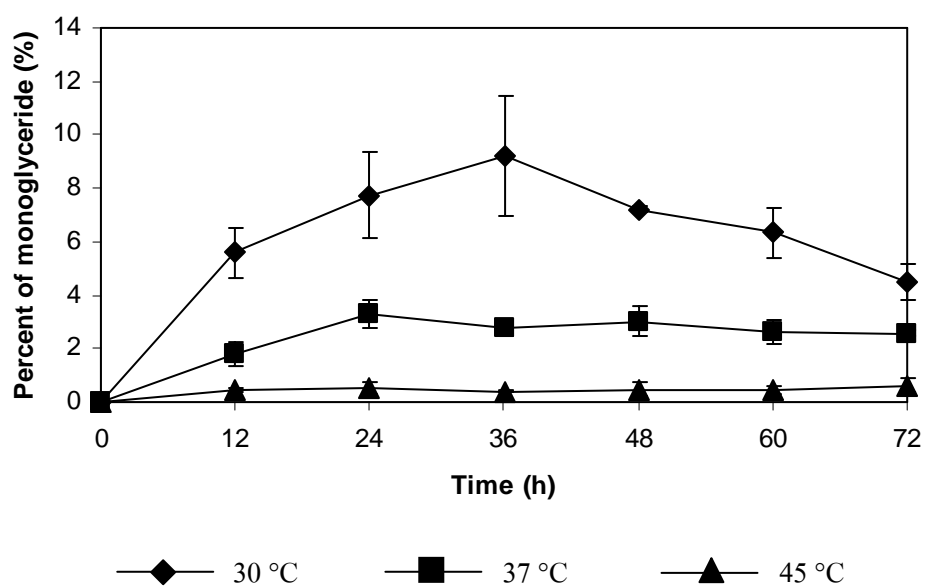


Figure 27. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 3.100 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

5.6 ผลของพีเอชต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 2.999 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอลเป็นสับสเตรท อัตราส่วน โมล 1:3 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (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 (Figure 28) แต่เมื่อเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 7.0 ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด การย่อยไตรกลีเซอไรด์ไปเป็น 1-3 ไคกลีเซอไรด์, 1-2 ไคกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เกิดขึ้นได้ดีที่พีเอช 7.0 แสดงว่ามีการผันสับสเตรทให้เกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ดี โดยเห็นได้จากปริมาณ 1-2 ไคกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ คือ 15.68 และ 2.97 เปอร์เซ็นต์ (Figure 31) ซึ่งเหลืออยู่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชอื่นๆ ดังนั้นการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 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 (มรว. ชัชมนุสร สวัสดิวัฒน์, 2542) โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไป 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 เช่นเดียวกับ Liu และคณะ (2008) ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันมะกอกด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Aureobasidium pullulans* พบว่าที่พีเอช 8.5 เหมาะสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไลเปสมากที่สุด

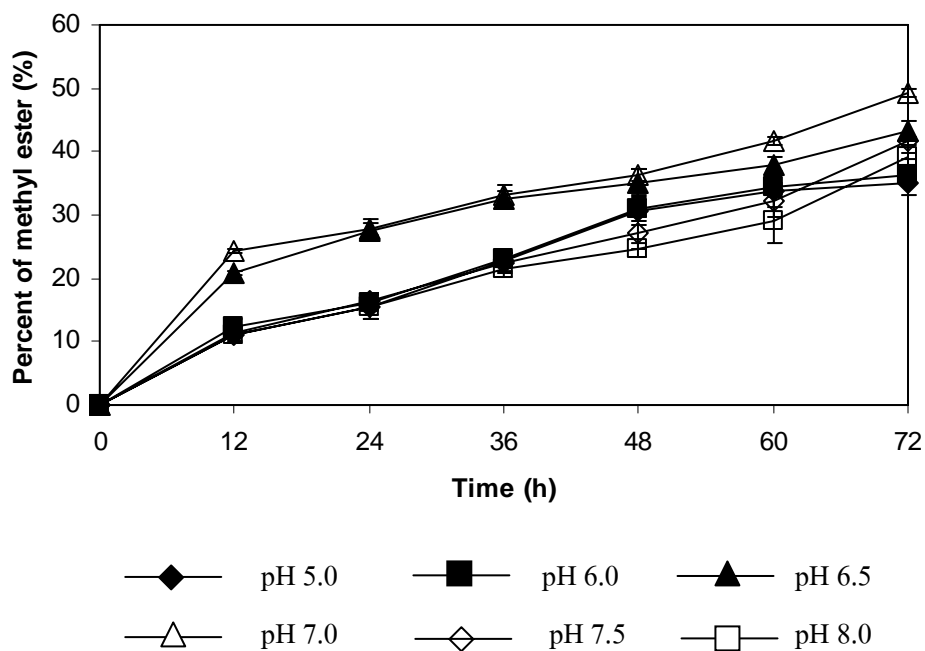


Figure 28. Effect of pH on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.999 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

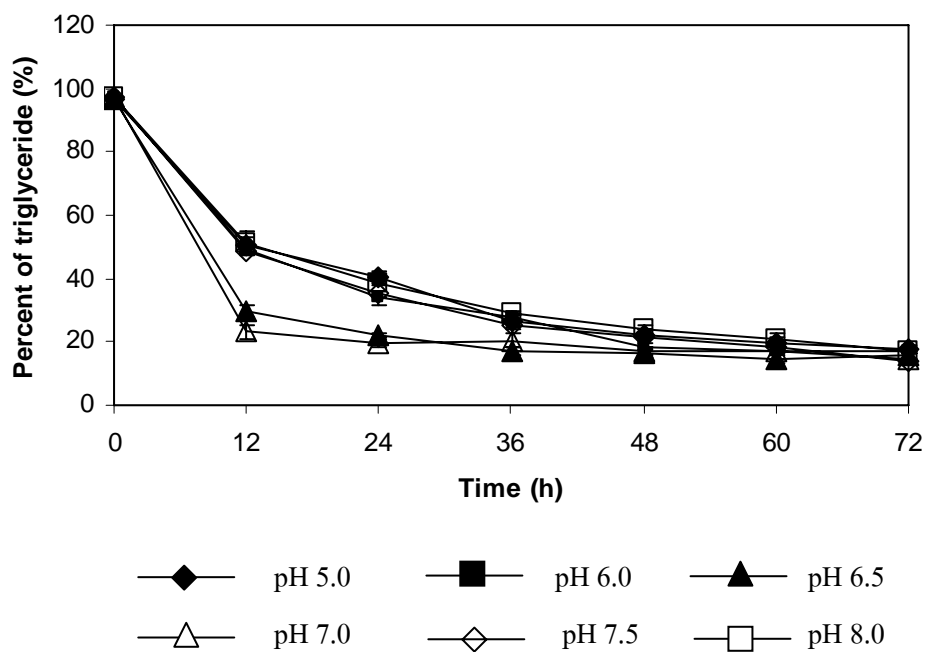
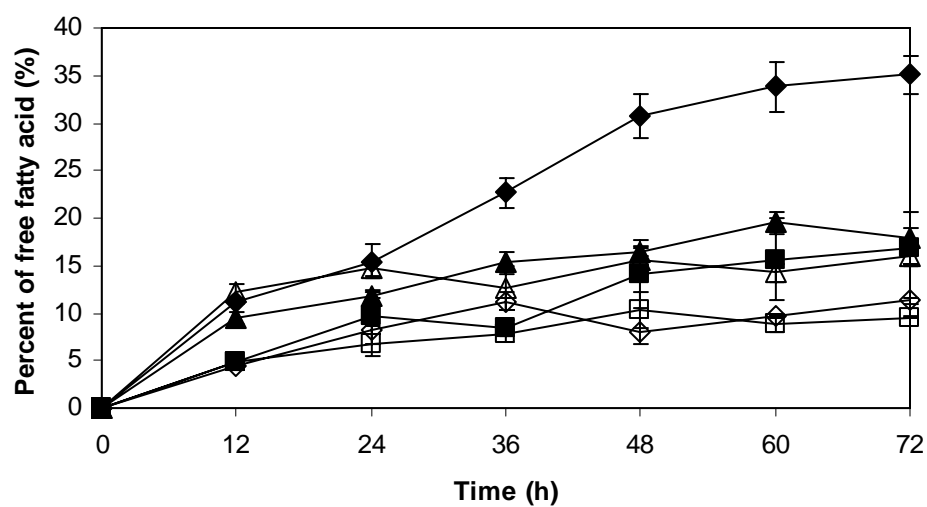


Figure 29. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.999 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

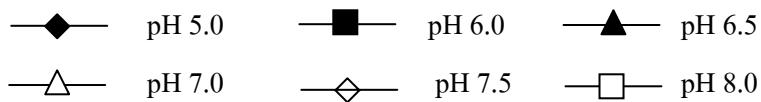
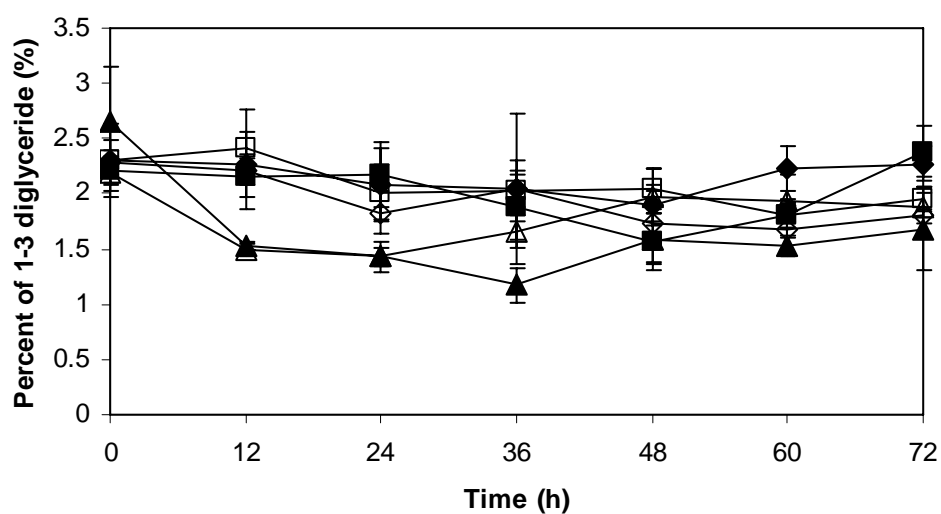
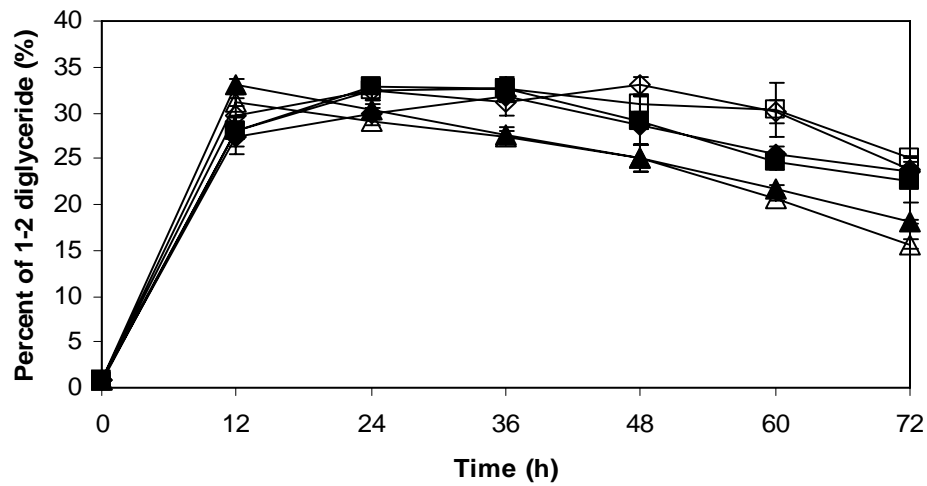


Figure 30. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.999 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)

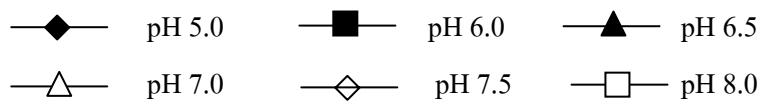
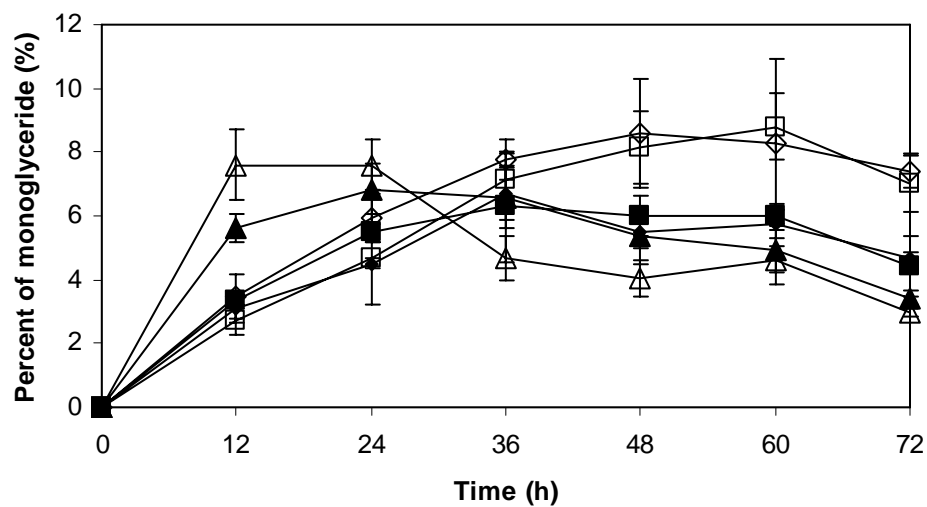


Figure 31. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.999 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:3 as substrates.

5.7 ผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน โมล 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 พบว่า การใช้เมทานอลทำให้ได้เมทิลเอสเทอร์สูงสุด 49.28 เปอร์เซ็นต์ (Figure 32) 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 ไดกลีเซอไรด์, 1-2 ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เหลืออยู่ 46.04, 3.59, 27.52, 2.93 และ 16.71 เปอร์เซ็นต์ (Figure 33-35) แสดงให้เห็นว่าไลเปสจากยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* สามารถเร่งเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันได้น้อยกว่าในปฏิกิริยาที่มีเมทานอลเป็นสับสเตรท โดยในการทดลองที่ใช้เมทานอลมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไดกลีเซอไรด์, 1-2 ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เหลืออยู่ 14.22, 1.87, 15.68, 2.97 และ 15.98 ตามลำดับ ดังนั้นแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ คือ เมทานอลเพราะเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ได้ดีและไม่รบกวนการทำงานของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลงเมื่อใช้แอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากขึ้น ที่อุณหภูมิปกติเมทานอลซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีความเป็นขั้วสูงกว่าแอลกอฮอล์ชนิดอื่น จึงทำให้เมทานอลสามารถกระจายตัวและเข้าไปยังตำแหน่งของเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า โดยเมทานอลจะทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิล (acyl acceptor) ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์มากกว่าอัลคิลเอสเทอร์ที่มี เอทานอล, โพรพานอล, 1-บิวทานอล และ 2-บิวทานอล อยู่ในระบบ (Hama *et al.*, 2007) เอนไซม์ไลเปสที่มาจากจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กัน จะมีความจำเพาะต่อชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่แตกต่างกัน โดยจากผลการทดลองเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* มีความจำเพาะต่อเมทานอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์สายตรงมากที่สุด เช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันของเมล็ด *Jatropha (Jatropha curcas)* กับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ คือ เมทานอล, เอทานอล, โพรพานอล

และบิวทานอล พบว่า เมทานอลเป็นชนิดของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล ทั้งในปฏิกิริยาที่ใช้ *Rhizopus oryzae* (whole cell) และเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* (Novozyme 435) ที่ผ่านการตรึงแล้ว เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน นอกจากนี้การผลิตไบโอดีเซลจะมีประสิทธิภาพลดลง เมื่อสายของแอลกอฮอล์ยาวขึ้น (Tamalampudi *et al.*, 2007) และยังสอดคล้องกับการทดลองของ Kamini และ Iefuji (2001) ศึกษาผลของแอลกอฮอล์ปฐมภูมิต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันรำข้าว 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 ชนิดโพรพานอลและบิวทานอล โดยมีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Pseudomonas fluorescens* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า สามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 25 ชั่วโมง

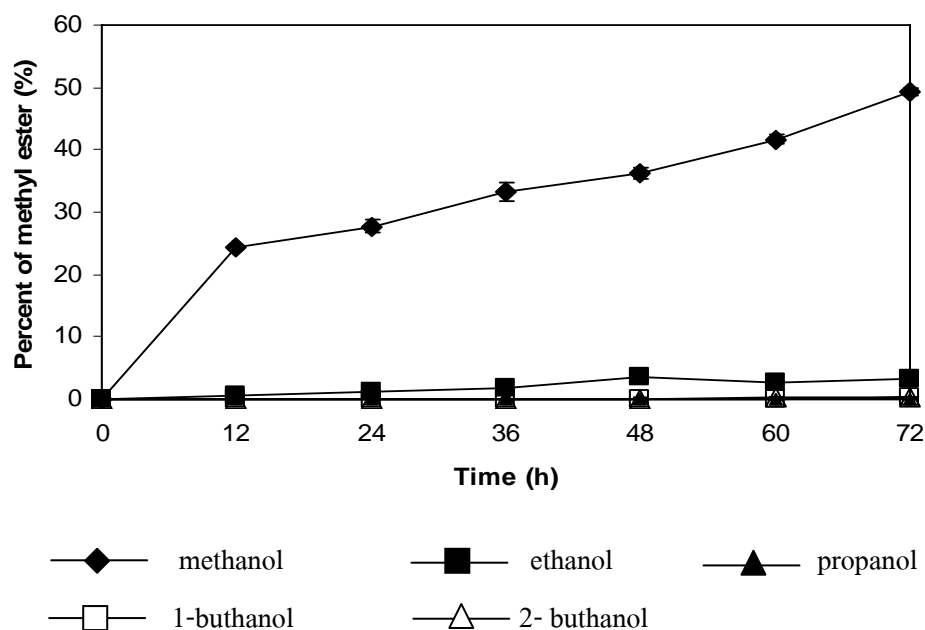


Figure 32. Effect of alcohol on alkyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.999 unit/g substrate in the presence of palm oil and alcohol with mole ratio 1:3 as substrates.

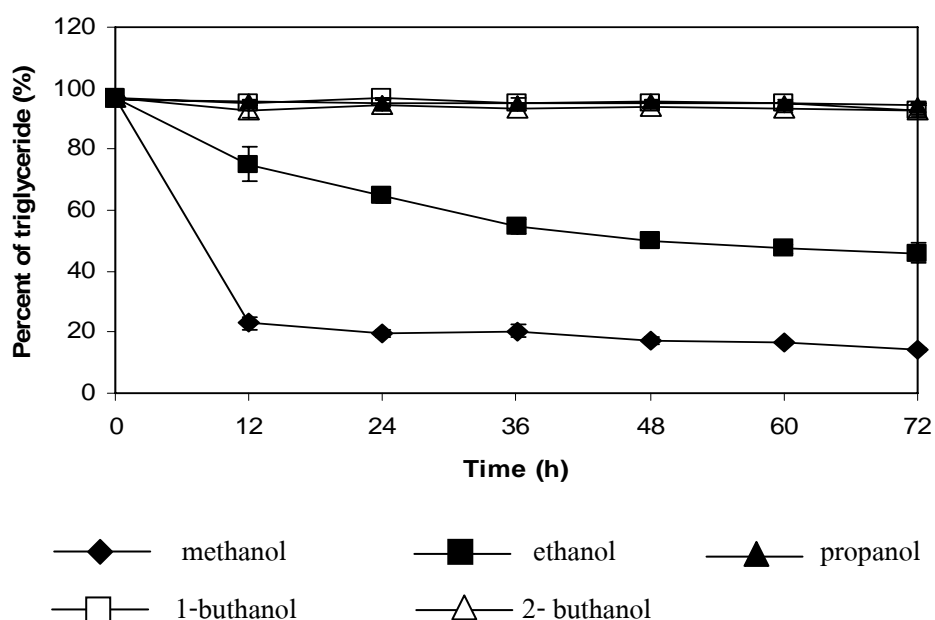
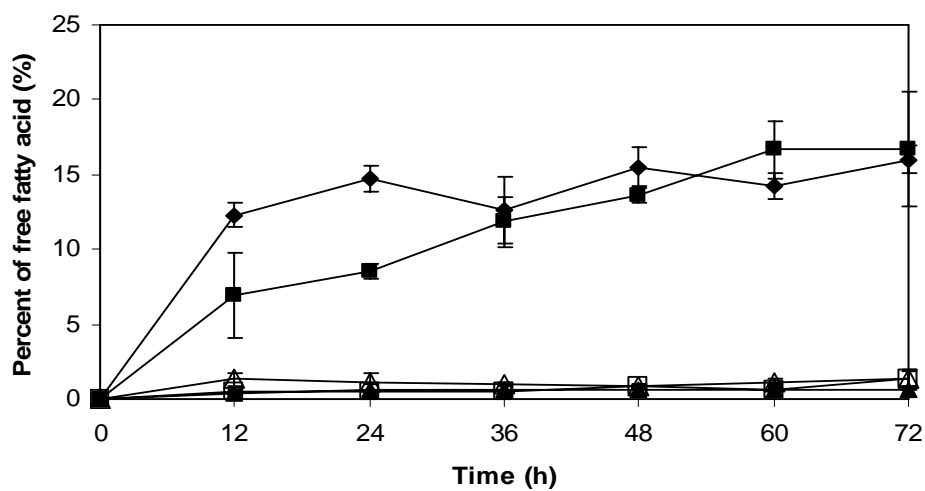
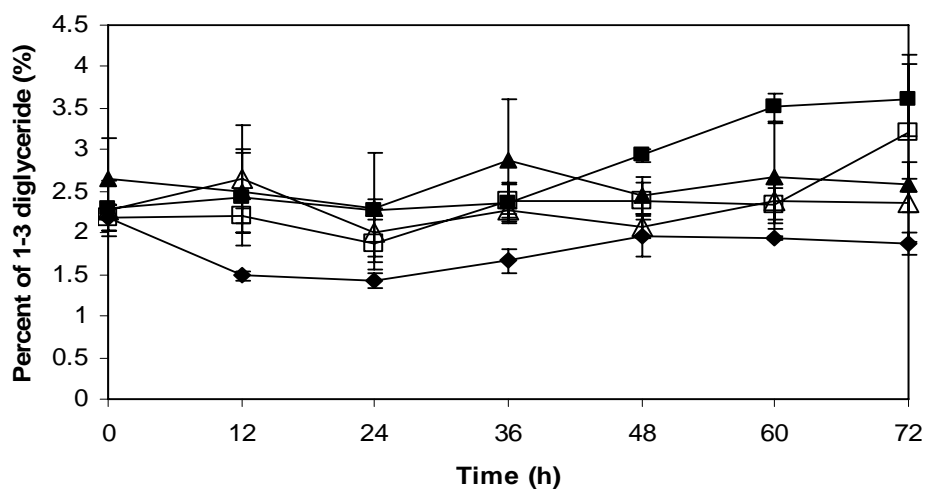


Figure 33. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.999 unit/g substrate in the presence of palm oil and alcohol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



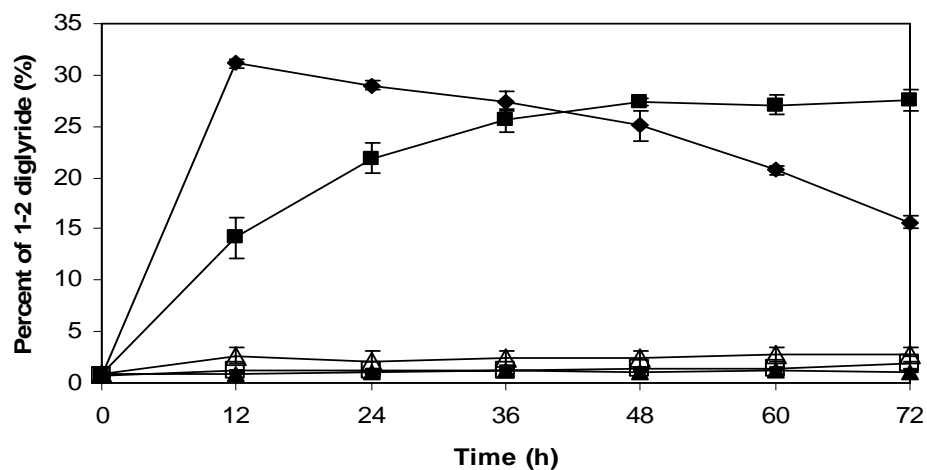
(B)



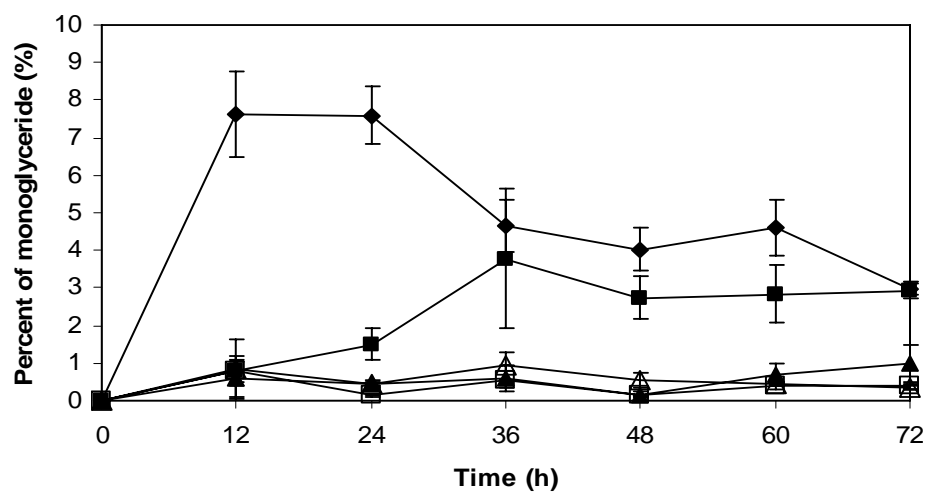
◆ methanol ■ ethanol ▲ propanol
 □ 1-butanol △ 2-butanol

Figure 34. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.999 U/g substrate in the presence of palm oil and alcohol with mole ratio 1:3 as substrates.

(A)



(B)



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

Figure 35. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.999 U/g substrate in the presence of palm oil and alcohol with mole ratio 1:3 as substrates.

5.8 ผลของอัตราส่วนโมลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของอัตราส่วนโมลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสับสเตรทที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล ในอัตราส่วนโมล 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 ปรับให้มีปริมาณน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท โดยการสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโมลของเมทานอลที่เข้าทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 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 (Figure 36) 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 และที่อัตราส่วนโมล 1:6 ซึ่งเป็นระบบที่มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 32.96, 43.72 และ 54.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48, 60 และ 72 พบว่า ในระบบที่มีอัตราส่วนโมลน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล 1:6 มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น เท่ากับ 67.30, 74.49 และ 83.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่อัตราส่วนโมล 1:5 มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 58.03, 69.04 และ 73.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การใช้สับสเตรทที่อัตราส่วนโมล 1:6 ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้สับสเตรทที่อัตราส่วนโมล 1:5 และที่อัตราส่วนโมล 1:6 ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 32.96, 43.72, 54.01, 67.31 และ 74.49 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 12, 24, 36, 48, 60 และ 72ตามลำดับ ส่วนปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่อัตราส่วนโมล 1:6 มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่เหลืออยู่ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 72 เท่ากับ 17.70 และ 3.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 37) ซึ่งปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลือน้อยกว่าในระบบที่มีอัตราส่วนโมล 1:5 โดยส่วนใหญ่แล้วการศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์หรือตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่อัตราส่วนโมลน้ำมันและเมทานอลเท่ากับ 1:4 แต่ในระบบที่ศึกษาถึงแม้จะมีการใช้อัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลที่สูงถึง 1:6 ก็ยังเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดี แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์สามารถทนเมทานอลในปริมาณที่สูงได้ จึงเป็นการดีในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ เพราะฉะนั้นจะทำการเลือกอัตราส่วนโมล 1:6 ในการศึกษาปัจจัยต่อไป นอกจากนี้ในอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:6 มีปริมาณไตรกลี

เซอร์ไรต์, 1-3 ไคกลีเซอร์ไรต์, 1-2 ไคกลีเซอร์ไรต์, โมโนกลีเซอร์ไรต์ และกรดไขมันอิสระเหลืออยู่เพียง 3.45, 0.25, 4.69, 1.02 และ 7.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 37-39)

ในทางทฤษฎีสมดุลมวลสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ที่สมบูรณ์ ต้องมีอัตราส่วน โมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์อย่างน้อย 1 ต่อ 3 แต่ในทางปฏิบัติ พบว่าปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์สามารถผันกลับได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมเมทานอลมากเกินไปเพื่อให้สถานะสมดุลเลื่อนเข้าใกล้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด แต่ถ้ามีปริมาณเมทานอลมากเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ (Ma and Hanna, 1999)

ผลการทดลองนี้พบว่าไลเปสจาก *Rhodotorula mucilagenosa* ทนต่อปริมาณเมทานอลได้สูงกว่าไลเปสที่รายงานในการทดลองอื่นๆ เช่น การทดลองของ Du และคณะ (2003) ศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลเป็นสับสเตรท โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Thermomyces lanuginosus* พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนเป็น 1:4 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงกว่าที่อัตราส่วน 1:3 แต่ที่อัตราส่วน 1:5 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะลดลง เช่นเดียวกับการทดลองของ Kose และคณะ (2002) ศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสที่มีส่วนผสมของน้ำมันเมล็ดฝ้ายและเมทานอล ในอัตราส่วน โมล 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica* พบว่าที่อัตราส่วน 1:4 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 87.4 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนเป็น 1:5 และ 1:6 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้น 85.2 และ 63.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

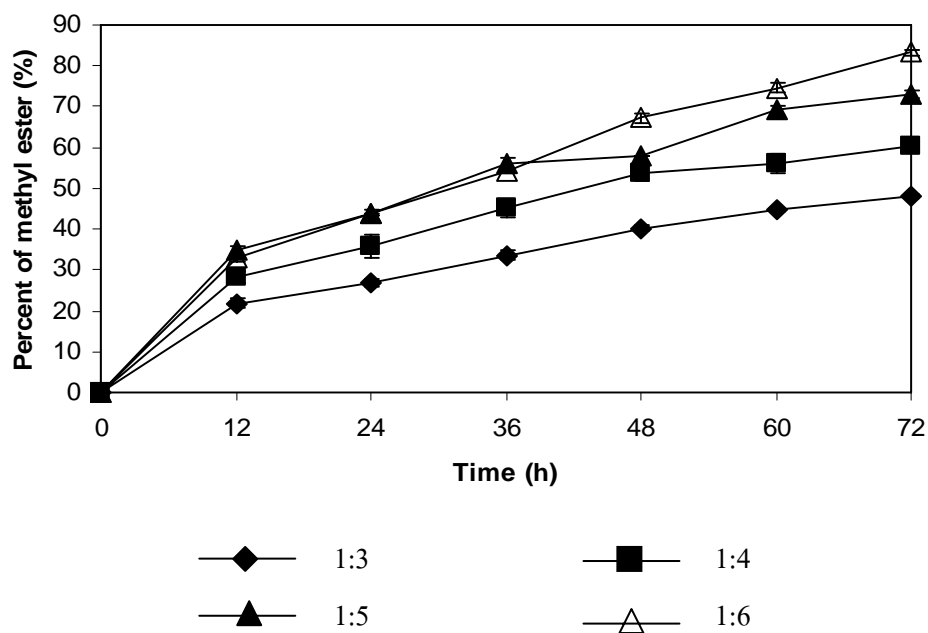


Figure 36. Effect of mole ratio on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.875 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol as substrates.

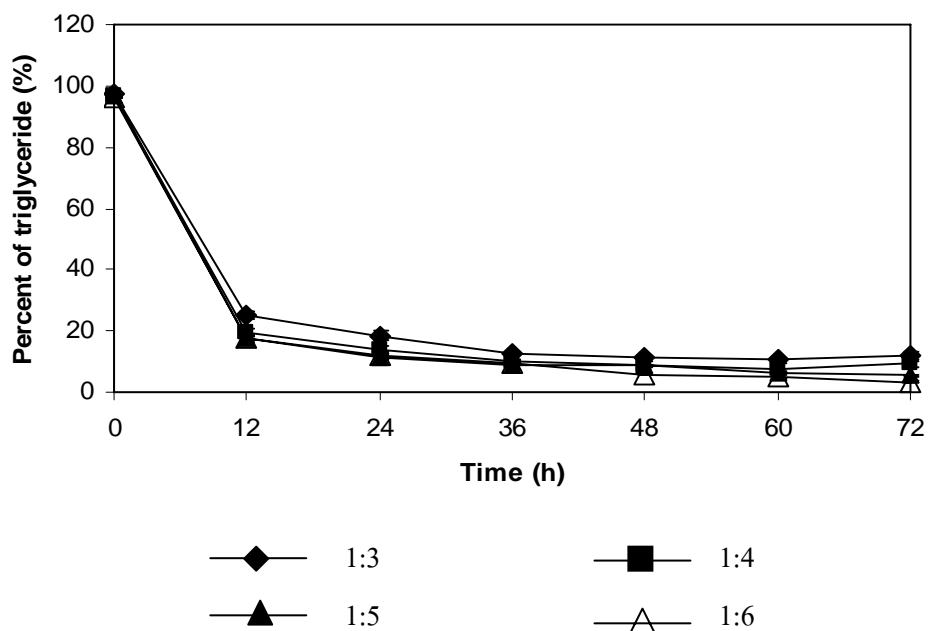
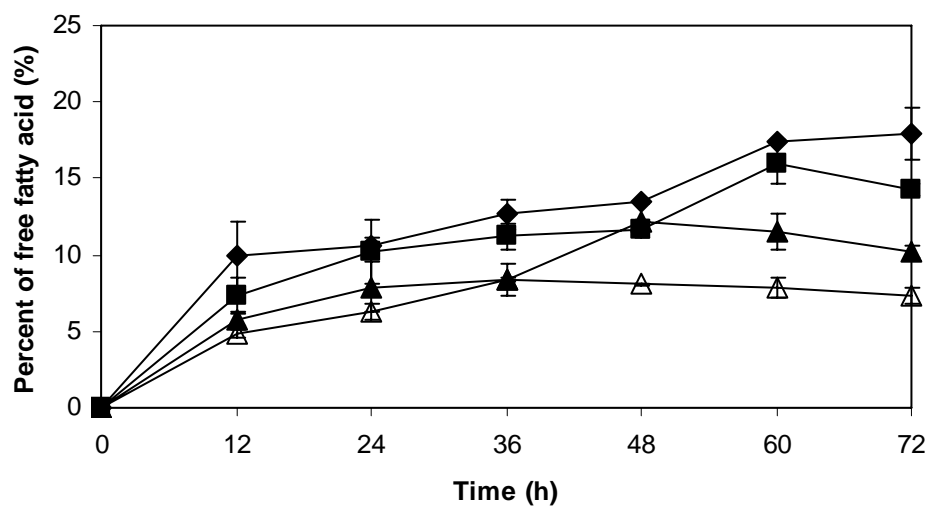


Figure 37. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.875 unit/g substrate in the presence of palm oil and alcohol as substrates.

(A)



(B)

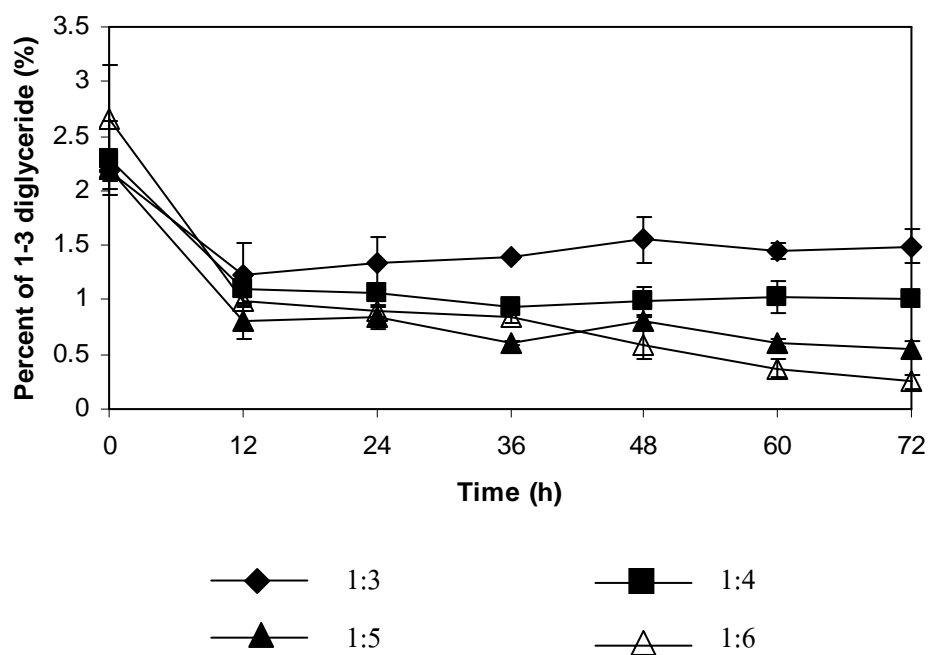
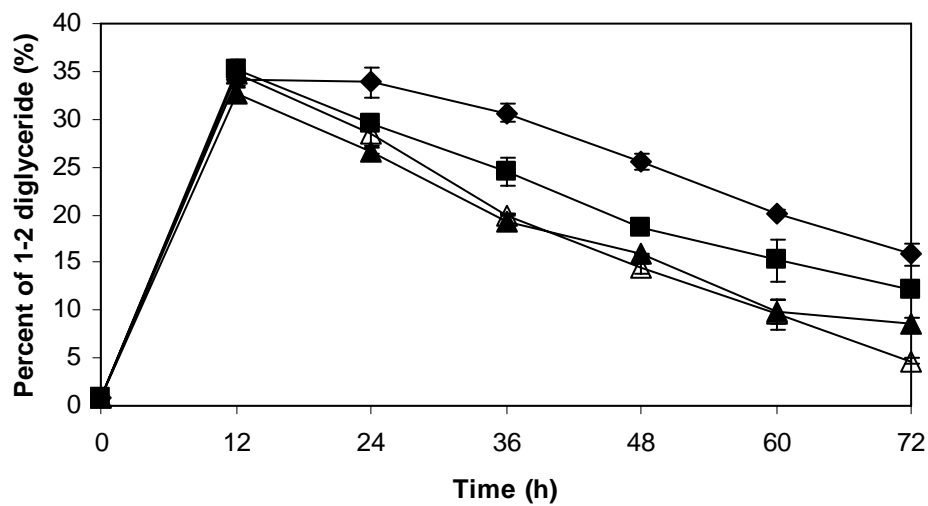


Figure 38. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.875 U/g substrate in the presence of palm oil and alcohol as substrates.

(A)



(B)

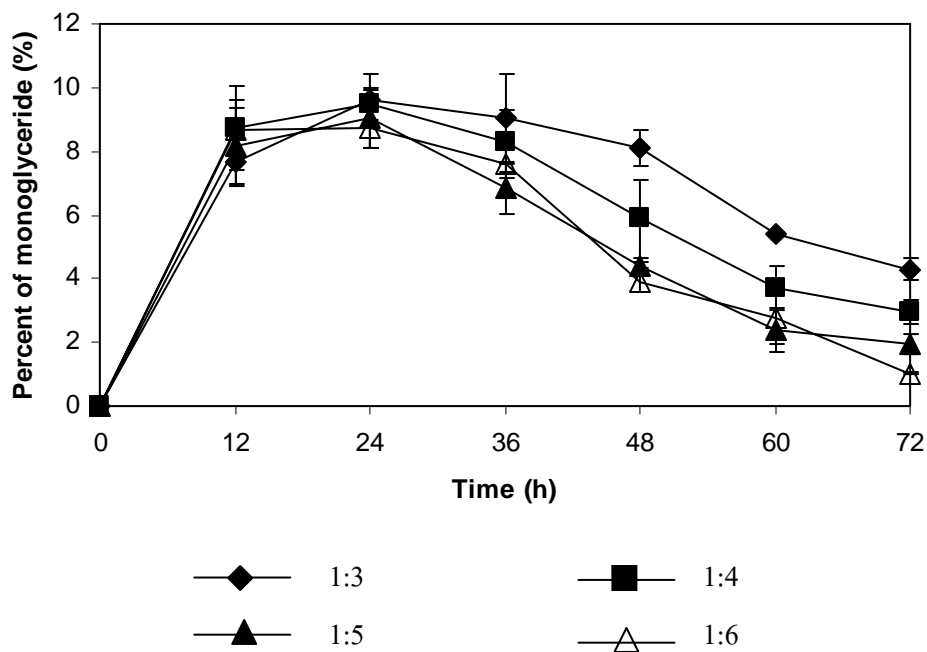


Figure 39. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.875 U/g substrate in the presence of palm oil and alcohol as substrates.

5.9 ผลของชนิดน้ำมันปาล์มต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

ในการศึกษาผลของชนิดน้ำมันต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน 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, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์ได้เท่ากับ 83.63, 62.34 และ 66.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Figure 40) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นจากปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่เหลืออยู่ จะเห็นได้ว่าระบบที่ใช้ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่เพียง 3.76 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ระบบที่มีน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรท มีไตรกลีเซอไรด์เหลืออยู่ เท่ากับ 14.29 และ 9.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 41) การที่ระบบที่ใช้ น้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรทมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำกว่าที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท เนื่องจากน้ำมันปาล์มใช้แล้วมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิม เช่น น้ำมันมีสีคล้ำมากขึ้น และความหนืด (viscosity) ที่เพิ่มขึ้น (นิธิยา รัตนปนนท์, 2541) เมื่อความหนืดเพิ่มมากขึ้น โอกาสที่สับสเตรทจะเข้าไปจับบริเวณเร่ง (active site) ก็จะเกิดได้ยากขึ้น จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าระบบที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท ในส่วนของน้ำมันปาล์มดิบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีลักษณะเป็นของเหลวปนของแข็ง ส่วนของเหลวจะเป็นส่วนของน้ำมันปาล์มโอลีนส่วนที่เป็นของแข็ง เรียกว่า ปาล์มสเตียรีนหรือไฮสเตียรีน (พิสมัย เจนวนิชปัญญกุลและลลิตา อัดนโถ, 2549) จากการที่น้ำมันปาล์มดิบมีทั้งส่วนที่เป็นของเหลวและของแข็งจึงทำให้สับสเตรทเข้าไปจับกับบริเวณเร่ง (active site) ได้ไม่ดีเท่ากับสับสเตรทที่เป็นของเหลวเพียงอย่างเดียว ดังนั้นผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จึงน้อยกว่าในระบบที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลของ Nie และคณะ (2006) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* 99-125 มีค่ากิจกรรม 7000 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ที่ผ่านการตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราส่วน โมลน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 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* ที่ตรึงแล้วมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราส่วน โมลน้ำมันต่อเมทานอล

เท่ากับ 1:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท เดิมเฮกเซน 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 222.5 ยูนิตต่อน้ำหนักสับสเตรท พบว่า เกิดปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด 91.08 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Watanabe และคณะ (2002) ศึกษาผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส โดยมีน้ำมันถั่วเหลืองดิบ (crude oil) และน้ำมันถั่วเหลือง (refined oil) โดยมีเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ผ่านการตรึงแล้วเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราส่วนโมลน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 10.3 และ 30.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

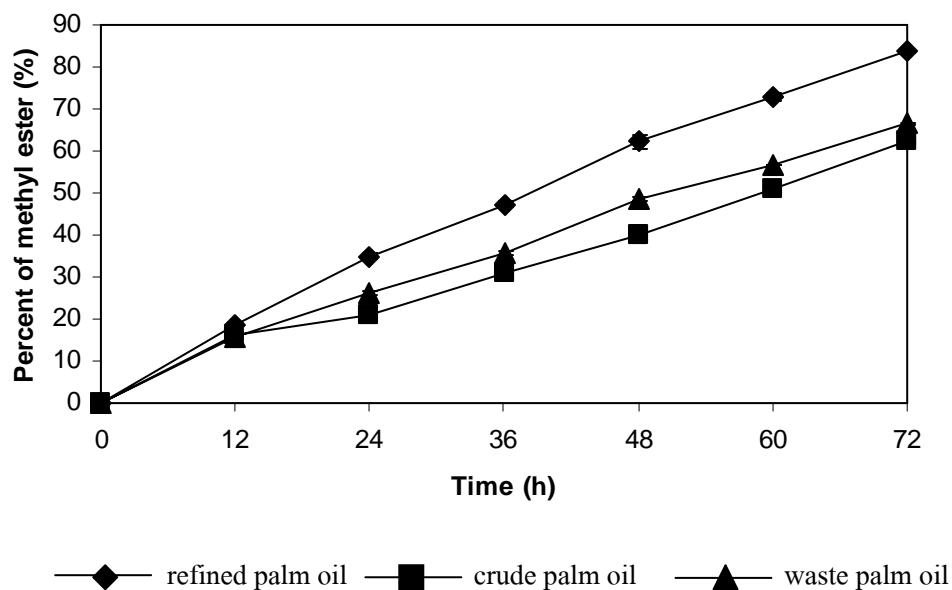


Figure 40. Type of palm oil on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

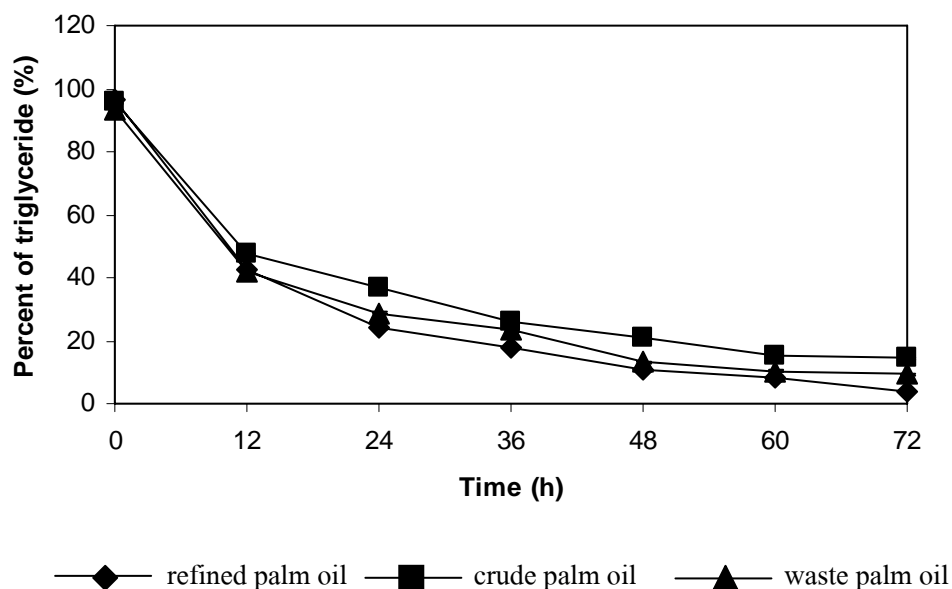
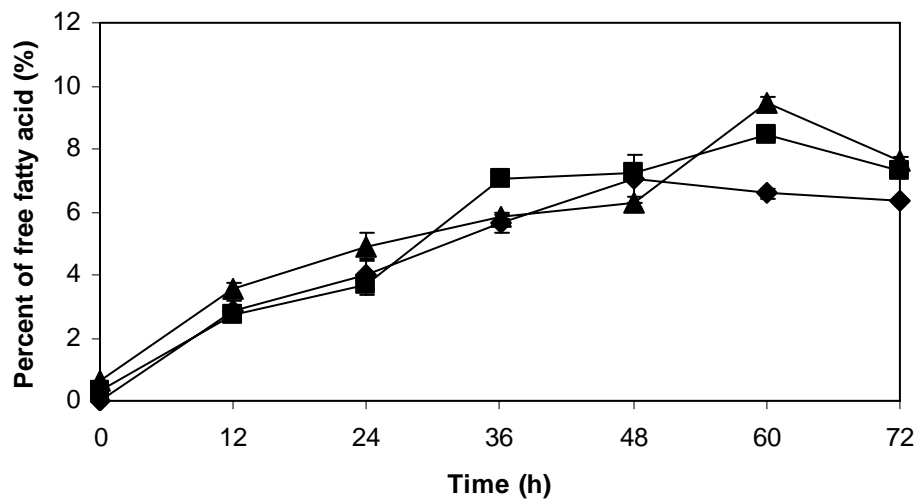
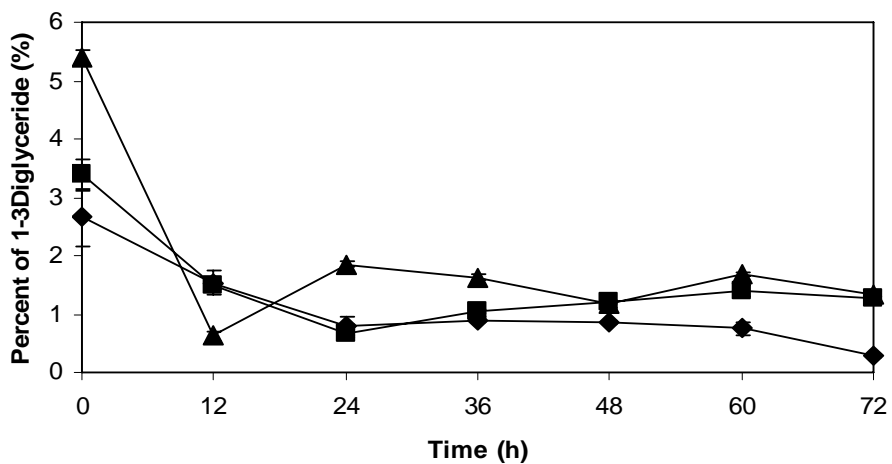


Figure 41. Triglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

(A)



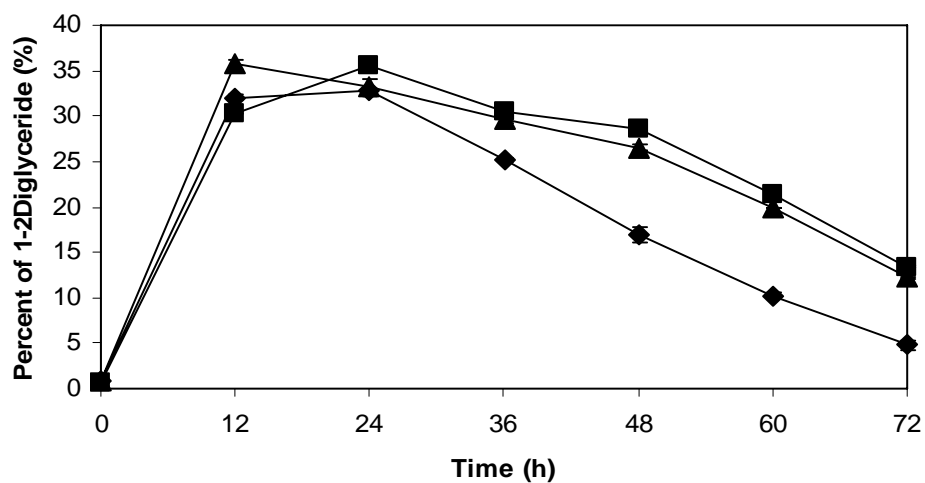
(B)



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

Figure 42. Free fatty acid (A) and 1-3 diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

(A)



(B)

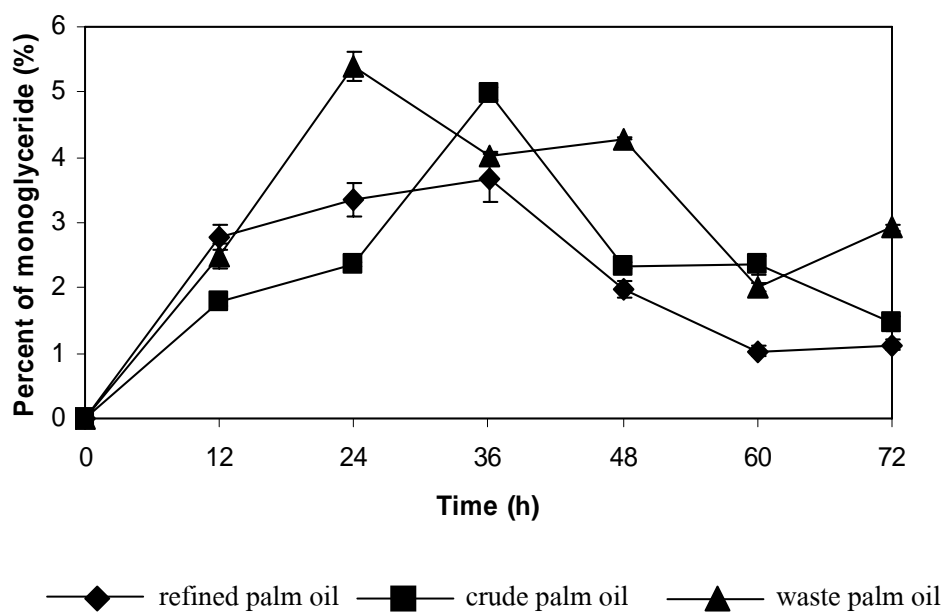


Figure 43. 1-2 Diglyceride (A) and monoglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

5.9 ผลของการนำเซลล์ยีสต์มาใช้ซ้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของการใช้เซลล์ยีสต์ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาใช้ซ้ำอีกครั้ง เพื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ต่อแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:6 (โมล:โมล) โดยปรับปริมาณน้ำให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรท เท่ากับ 59.31, 36.39 และ 55.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 44-45) 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 (Figure 46) ในการทดลองที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสับสเตรทยังคงความสามารถในการเกิดผลิตภัณฑ์ของเมทิลเอสเทอร์ได้มากที่สุด โดยมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์, 1-3 ไดกลีเซอไรด์, 1-2 ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ เหลืออยู่ 11.38, 1.00, 22.54, 2.80 และ 3.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 46-48) นอกจากนั้นการที่ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงเมื่อใช้เซลล์ยีสต์เร่งปฏิกิริยา อาจมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ถูกทำลายด้วยเมทานอลที่เติมลงไปทำปฏิกิริยา จึงทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปไม่สามารถทำงานได้ (Chen *et al.*, 2009) ซึ่งผลการทดลองการใช้เซลล์ยีสต์ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสอดคล้องกับ Tamalampudi และคณะ (2008) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ตรึงแล้วมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสซ้ำ กิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 10,000 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ไม่เติมน้ำอัตราส่วน 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) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเมทิลเอสเทอร์เมื่อใช้เวลาในการ

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันมากขึ้น พบว่า ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ลดลง 15.74 เปอร์เซ็นต์ จาก 91.08 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 76.74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาผ่านไป 100 ชั่วโมง โดยมี น้ำมันพืชใช้แล้ว (waste cooking oil) เป็นสับสเตรท เดิมเมทานอล 3 ขั้นตอน อัตราส่วน โมลน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักสับสเตรท เดิมเฮกเซน 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ตรึงแล้วมาเป็นตัวเร่ง เท่ากับ 222.5 ยูนิต ต่อน้ำหนักสับสเตรท

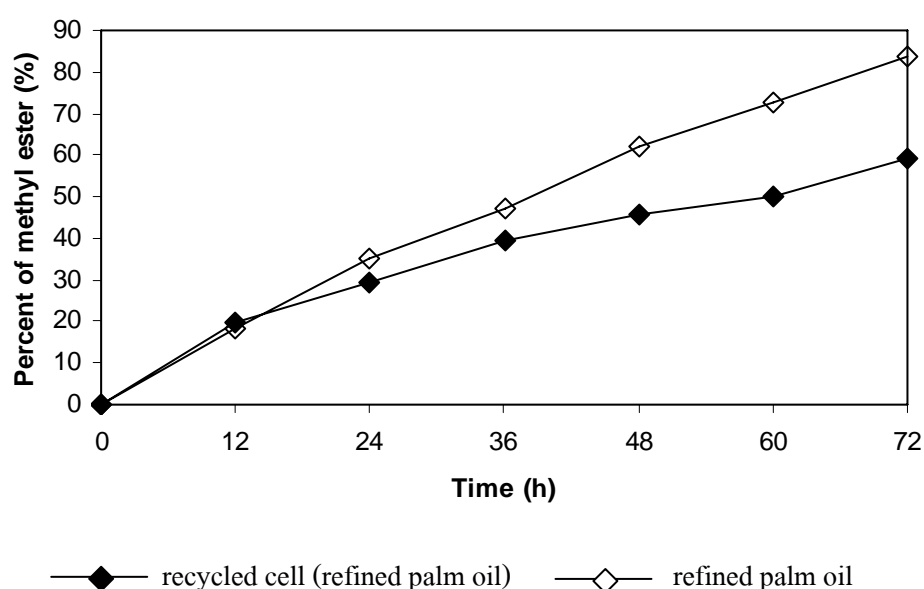


Figure 44. Effect of repeated yeast cells on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 unit/g substrate in the presence of refined palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

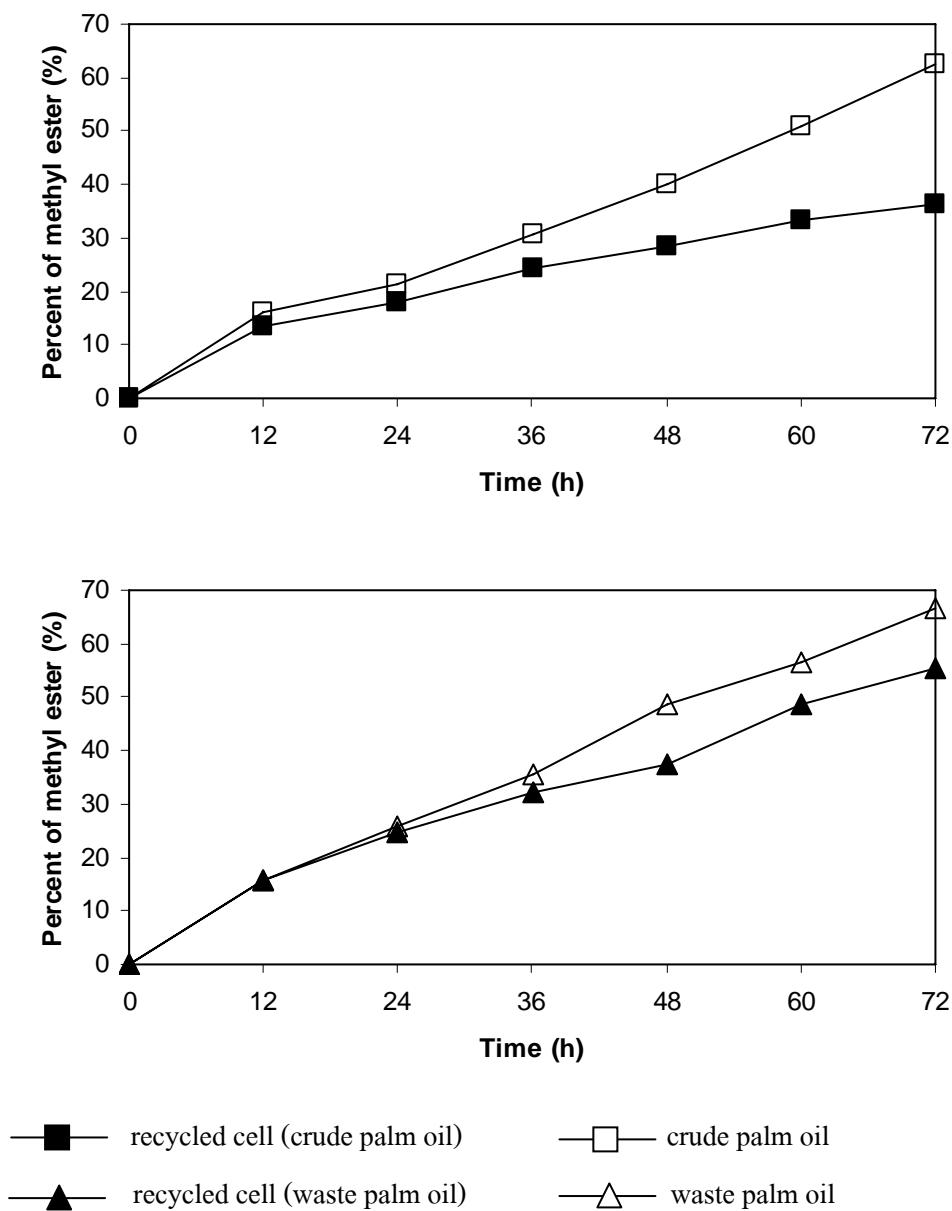
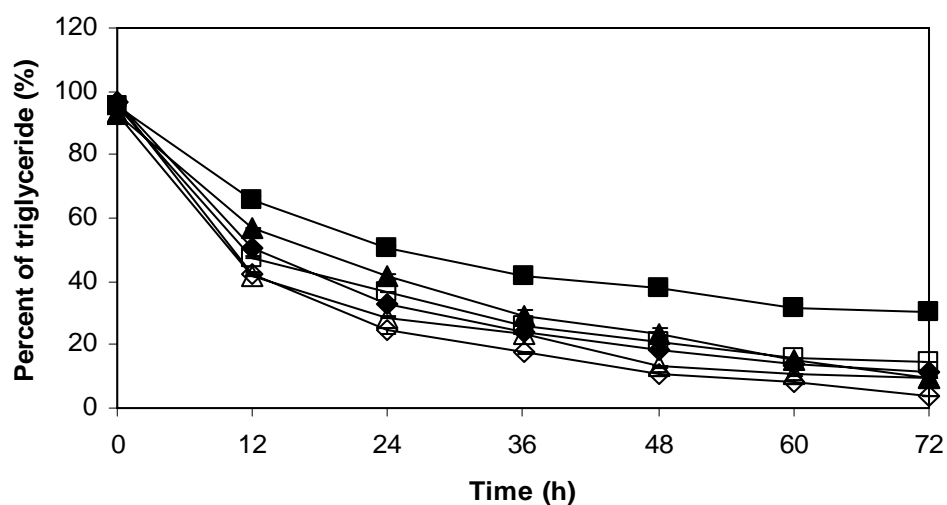


Figure 45. Effect of recycled yeast cells on methyl ester production by transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 unit/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

(A)



(B)

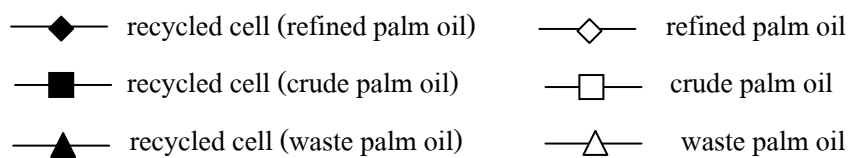
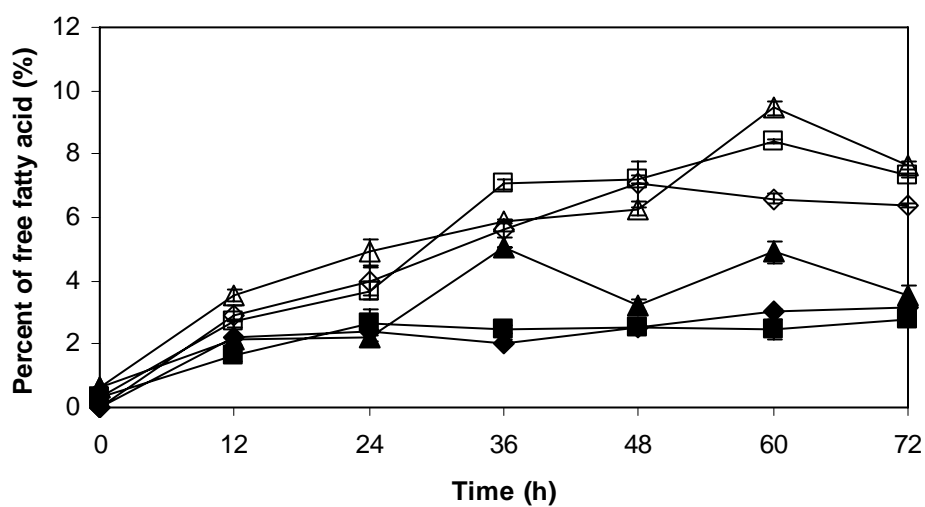
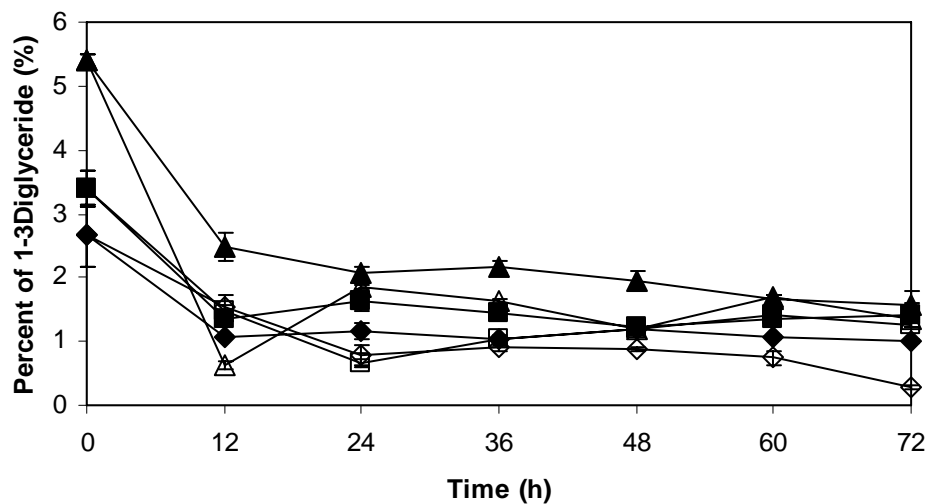


Figure 46. Triglyceride (A) and free fatty acid (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

(A)



(B)

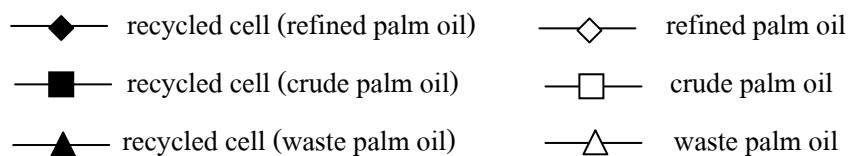
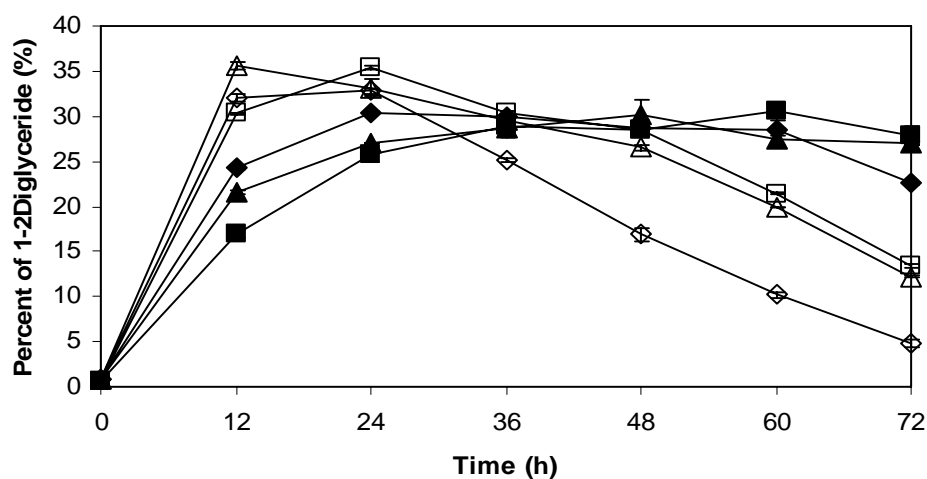


Figure 47. 1-3 Diglyceride (A) and 1-2 Diglyceride (B) content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

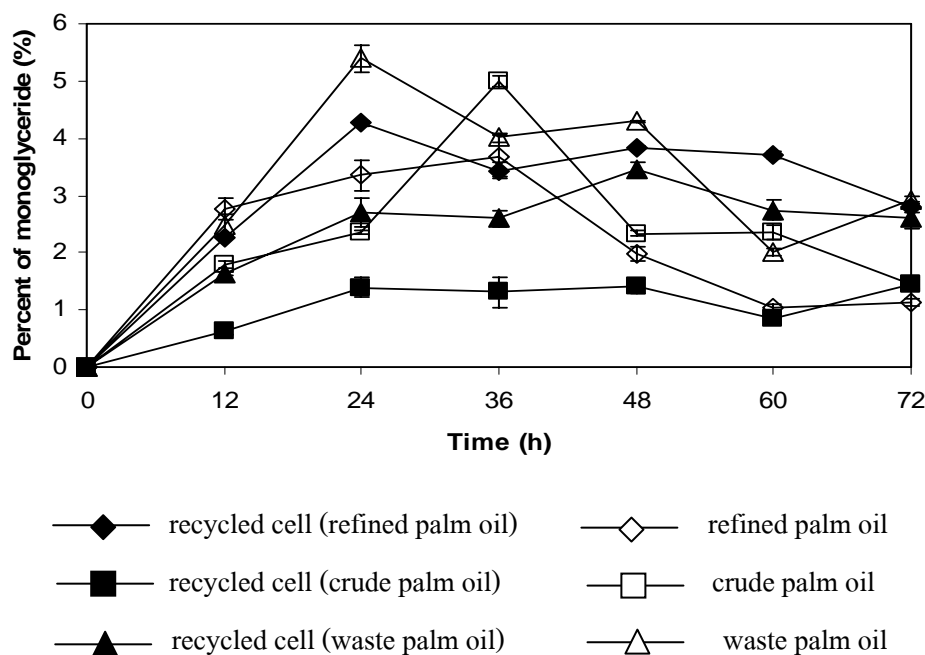


Figure 48. Monoglyceride content in palm oil transesterification catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells with lipase activity of 2.458 U/g substrate in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

6. องค์ประกอบเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลโดยใช้ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa*

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลคิลเอสเทอร์ คือ มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์กับเมทานอลเป็นสับสเตรท อัตราส่วนโมลน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:6 ปรับปริมาณน้ำเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อกรัมสับสเตรท โดยการเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และใช้ยีสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของอัลคิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ ปาล์มมิติกเมทิลเอสเทอร์ 38.18 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นโอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ 34.22 เปอร์เซ็นต์ ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ 10.16 เปอร์เซ็นต์ และสเตียริกเมทิลเอสเทอร์ซึ่งมีปริมาณ 4.64 เปอร์เซ็นต์ (Table 16) เมื่อวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Mass Spectrometry พบว่ามีสัดส่วนเมทิลปาล์มมิเตทและเมทิลโอเลอิกเท่ากับ

40.12 และ 45.66 เปอร์เซ็นต์ มีกรดปาล์มมิติกและกรดโอเลอิกเหลืออยู่ในสัดส่วน 5.41 และ 1.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 16. Qualitative compositions of fatty acid methyl ester in biodiesel.

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 ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จะมีคุณสมบัติตามกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบนั้นๆ ด้วย (พิสมัย เจนวนิชปัญจกุลและลลิตา อัตน โถ, 2549)

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน, น้ำและกากปาล์มที่ปนเปื้อนน้ำมันเก็บจากโรงงานน้ำมันปาล์มในภาคใต้ของประเทศไทยทั้งหมด 36 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร Yeast-malt medium (YM) และอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและเติม rhodamine B เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีการเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร พบว่า ได้ยีสต์ทั้งหมด 206 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากอาหาร YM 117 สายพันธุ์ และอาหาร IMY 89 สายพันธุ์

2. การคัดเลือกยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ที่คัดแยกทั้งหมด 206 สายพันธุ์ โดยการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท พบว่า ยีสต์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากอาหาร YM และอาหาร IMY เท่ากับ 22 และ 27 สายพันธุ์ ตามลำดับ เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี two-phase emulsion พบว่า มีเพียงยีสต์สายพันธุ์ P11I89 เท่านั้น ที่สามารถวัดปริมาณเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีนี้ได้ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3.360 ± 0.069 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท เท่ากับ 0.026 ± 0.002 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยยีสต์สายพันธุ์ P11I89 เป็นยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินสีน้ำตาล มีน้ำมันปนเปื้อน มีค่าพีเอช 5 และมีอุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส

3. การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดี โดยการนำยีสต์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน 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*

4. การศึกษาอัตราการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* ในอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 180 ชั่วโมง พบว่า ในระหว่างที่ยีสต์มีการเจริญเข้าสู่ระยะ Stationary phase มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 ทั้งในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท และวิธี two-phase

emulsion โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 0.092 ± 0.005 และ 5.502 ± 0.094 หน่วยต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ

5. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว พบว่า ค่าสaponification (Saponification 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 สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ได้เท่ากับ 867.97, 867.50 และ 910.52 ตามลำดับ

6. ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันต่างๆ มีดังนี้ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ประกอบด้วย กรดโอเลอิก (C18:1), กรดปาล์มมิติก (C16:0), กรดลิโนเลอิก (C18:2) และ กรดสเตียริก (C18:0) คิดเป็น 43.67, 36.50, 10.92 และ 4.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

7. สภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือ ใช้ สัดส่วนที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล อัตราส่วนโมล 1:6 เติม สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในปฏิกิริยา 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท ปริมาณ เซลล์ยีสต์ *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

8. ชนิดของเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน คือ ปาล์มมิติกเมทิลเอสเทอร์, โอเลอิกเมทิลเอสเทอร์, ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ และ สเตียริกเมทิลเอสเทอร์ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 38.18, 34.22, 10.16 และ 4.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- มรว. ชัยฉุสรร สวัสดิวัตน์. 2542. เอนไซม์และปฏิกิริยาชีวเคมี. ใน ชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 125-150. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิธิยา รัตนานพนธ์. 2543. วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พิสมัย เจนวนิชปัญญกุล และลลิตา อัตนโถ. 2549. รอบรู้เรื่องราวไบโอดีเซล. พิมพ์ครั้งที่ 1. สมุทรปราการ: พิมพ์พินิจ.
- ไพจิตร จันทร์วงศ์. 2530. คู่มือการใช้ประโยชน์และตรวจสอบคุณภาพของน้ำมันพืชและน้ำมันพืช 52 ชนิด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- สาโรจน์ ศิริสันตนิกุล. 2538. วิศวกรรมเคมีพื้นฐาน 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อากัสตรา ชมิดท์. 2537. ลิพิด. ใน ชีวเคมี. หน้า 187-217. กรุงเทพฯ: เก.ยู.เพลส์.
- Abigor, R. D., Uadia, P. O., Foglia, T. A., Haas, M. J., Jones, K. C., Okpefa, E., Obibuzor, J. U. and Bafor, M. E. 2000. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem. Soc. T.* 28: 979-981.
- Aksoy, H. A., Kahraman, I., Karaosmanoglu, F. and Civelekoglu, H. 1988. Evaluation of Turkish sulphur olive oil as an alternative diesel fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 936-938.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and identification*. 3rd Ed. Cambridge University Press. United Kingdom.

- Breivik, H., Haraldsson, G. G. and Kristinsson, B. 1997. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1425-1429.
- Cardenas, F., Castro, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V., Valmaseda, M., Elson, S. W. and Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipase: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microbiol. Technol.* 28: 145-154.
- Chen, J. and Wu, W. T. 2003. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 466-469.
- Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P. and Wang, X. 2009. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energ. Convers. Manage.* 50: 668-673.
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., Cioccia, G. and Iride, A. 2006. Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 27-32.
- Costas, M., Deive, F. J. and Longo, M. A. 2004. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issstchenkia orientalis*. *Process Biochem.* 39: 2109-2114.
- De, B. K., Bhattacharyya, D. K. and Bandhu, C. 1999. Enzymatic synthesis of fatty alcohol esters by alcoholysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 451-453.
- Du, W., Xu, Y. and Lin, D. 2003. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 103-106.
- Freedman, B., Pryde, E. H. and Mounts, T. L. 1984. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1638-1643.
- Foresti, M. L., Errazu, A. and Ferreira, M. L. 2005. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene. *Biochem. Eng. J.* 25: 69-77.

- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 405-416.
- Gerpen, J. V. 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technol.* 86: 1097-1107.
- Gilham, D. and Lehner, R. 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity *in vitro*. *Methods.* 36: 139-147.
- Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquets, M. and Manresa, A. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme Microbiol. Technol.* 26: 40-44.
- Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A. Noda, H. and Fukuda, H. 2007. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 34: 273-278.
- Handelsman, T. and Shoham, Y. 1994. Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 435-443.
- Hernandez, A., Martin, A., Aranda, E., Perez-Nevado, F. and Cordoba, M.G. 2007. Identification and characterization of yeast isolated from elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiol.* 24: 346-351.
- Hsu, A., Jones, K., Foglia, T. and Marmer, W. 2002. Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *J. Biotechnol. Appl. Biochem.* 36: 181-186.
- Hui, Y.H. 1996. Palm oil. *In* Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Vol. II : Edible Oil and Fat: Oil and Oilseeds, pp. 271-376. New York: John Wiley and Sons, INC.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. and Shrestha, S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 16: 53-58.

- IUPAC. 1979. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 6th ed. Part I. pp. 56-59. Paris: Pergamon Press.
- Jham, G. N., Teles, F. F. F. and Campos, L. G. 1982. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59: 132-133.
- Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. and Baratti, T. C. 2000. Characterization of new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10: 395-401.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E. and Fukuda, H. 1999. Biodiesel fuel production from oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 627-631.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A. and Fukuda, H. 2001. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 12-15.
- Kamini, N. R. and Iefuji, H. 2001. Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2. *Process Biochem.* 37: 405-410.
- Koh, J. S., Kodama, T. and Minoda, Y. 1983. Screening of yeasts and cultural conditions for cell production from palm oil. *Agric. Biol. Chem.* 47: 1207-1212.
- Kondo, A., Liu, Y., Furuta, M., Fujita, Y., Matsumoto, T., Fukuda, H. 2000. Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol. *Enzyme Microbiol. Technol.* 27: 806-811.
- Kose, O., Tuter, M. and Aksoy, H. A. 2002. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresour. Technol.* 83: 125-129.

- Kouker, G., and Jaeger, K. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 211-213.
- Kwon, D. Y. and Rhee, J. S. 1986. A simple and rapid calorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63: 89-95.
- Lagos, F. M., Campo, C. D., Llama, E. F. and Sinisterra, J. V. 2002. New yeast strains for enantioselective production of halohydrin precursor of (S)-Propranolol. *Enzyme Microbiol. Technol.* 30: 895-901.
- Landell, M. F., Hartfelder, C. and Valente, P. 2006. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae.* 34: 49-55.
- Lara, P. V. and Park, E. Y. 2004. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. *Enzyme Microbiol. Technol.* 34: 270-277.
- Lee, S. Y. and Rhee, J. S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15: 617-623.
- Li, W., Du, W. and Liu, D. 2007. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in *tert*-butanol system. *Process Biochem.* 42: 1481-1485.
- Linko, Y. Y., Lamsa, M., Wu, X., Uosukainen, E., Seppala, J. and Linko, P. 1998. Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J. Biotechnol.* 66: 41-50.
- Liu, Z., Chi, Z., Wang, L. and Li, J. 2008. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochem. Eng. J.* 40: 445-451.
- Ma, F. and Hanna, M. A. 1999. Biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 70: 1-15.
- MacKenzie, R. D., Blohm, T. R., Auxier, E. M. and Luther, A. C. 1967. Rapid colorimetric micromethod for free fatty acids. *J. Lipid Res.* 8: 589-597.

- Maclellan, M. 1983. Palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 320-325.
- Macrae, A. R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1067-1071.
- Macrae, A. R. and Hammond, R. C. 1985. Present and future applications of lipases. *Biotechnol. Genet. Eng.* 3: 193-217.
- Martin, E. H. and Otero, C. 2008. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozyme 435 and Lipozyme TL IM. *Bioresour. Technol.* 99: 277-286.
- Mittelbach, M. 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67: 168-170.
- Nelson, L. A., Foglia, T. A. and Marmer, W. M. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1191-1195.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F. and Tan, T. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 43: 142-147.
- Perrin, D. D. and Dempsey, B. 1974. *Buffer for pH and Metal Ion Control*. London: Chapman and Hall.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 119-131.
- Qin, H., Yan, X. and Dong, W. 2008. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese. J. Catal.* 29: 41-46.
- Redondo, O., Herrero, A., Bello, J. F., Roig, M. G., Calvo, M. V., Plou, F. J. and Burguillo, F. J. 1995. Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid *p*-nitrophenyl esters mixed micells with triton X-100. *BBA-Gen. Subjects.* 1243: 15-24.

- Shahani, K. M. 1975. Lipase and Esterase. *In Enzymes in Food Processing*. 2nd ed. (ed. G. Reed). pp. 181-217, New York: Academic Press.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M. and Solinas, V. 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J. Biotechnol.* 119: 291-299.
- Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H. and Fukuma, H. 2000. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J. Biosci. Bioeng.* 90: 180-183.
- Sanchez, F. and Vasudevan, P. T. 2006. Enzyme catalyzed production of biodiesel from olive oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 135: 1-14.
- Selmi, B. and Thomas, D. 1998. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 691-695.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Kuramoto, T., Nagao, T., Gemba, M. and Tominaga, Y. 1997. Purification of docosaheptaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with *Rhizopus delemur* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 97-101.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. and Tominaga, Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 17: 133-142.
- Srivastava, A. and Prasad, R. 2000. Triglycerides-based diesel fuels. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 4: 111-133.
- Tamalampudi, S., Talukder, M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A. and Fukuda, H. 2008. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochem. Eng. J.* 39: 185-189.

- Thongekkaew, T. and Boonchird, C. 2007. Molecular cloning and functional expression of a novel extracellular lipase from the thermotolerant yeast *Candida thermophila*. FEMS. Yeast Res. 7: 232-243.
- Vakhlu, J. and Kour, A. 2006. Yeast lipase: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. J. Biotechnol. 9: 69-85.
- Walker, G. M. 1998. Yeast nutrition. In Yeast Physiology and Biotechnology. P. 51-99. Academic press. New York.
- Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Liu, Z. and Li, J. 2007. Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. Ann. Microbiol. 57: 495-501.
- Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y. and Yamada, K. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. Agric. Biol. Chem. 41: 1353-1358.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A. and Tominaga, Y. 2002. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. J. Mol. Catal. B: Enzym. 17: 151-155.
- Wright, H. J., Segur, J. B., Clark, H. V., Coburn, S. K., Langdon, E. E. and DuPuis, R. N. 1944. A report on ester interchange. Oil soap. 21: 145-148.
- Wu, W. H., Foglia, T. A., Marmer, W. N. and Phillips J. G. 1999. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. J. Am. Oil Chem. Soc. 76: 517-521.
- Yamamoto, K. and Fujiwara, N. 1988. Purification and some properties of a castor-oil hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. Agric. Biol. Chem. 52: 3015-3021.
- Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry: an engineering overview. J. Am. Oil Chem. Soc. 64: 1657-1661.

Zhang, Y., Dube, M. A., Mclean, D. D. and Kates, M. 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresour. Technol.* 89: 1-16.

Ziejeski, M., Kaufman, K. R., Schwab, A. W. and Pryde, E. H. 1984. Diesel engine evaluation of a nonionic sunflower oil-aqueous ethanol microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1620-1626.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร และวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงยีสต์

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

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

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

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

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

Palm oil	20.0	กรัม
NH ₄ NO ₃	4.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	4.7	กรัม
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	0.3	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0	กรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01	กรัม
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.01	กรัม
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0.01	กรัม
Yeast extract	0.10	กรัม
Gum Arabic	10.0	กรัม
Chloramphenicol		
Rhodamine B	0.010	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH 5.0		

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

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

3. การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer

นำตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หยดลงบน counting chamber แล้วปิดด้วย cover slip นับเซลล์ยีสต์ในช่องสี่เหลี่ยมทั้ง 25 ช่อง ที่กำลังขยาย 400 เท่า ในการคำนวณจะนำจำนวนช่องสี่เหลี่ยม 25 ช่อง หารด้วยจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้ทั้งหมด จะได้จำนวนเซลล์ยีสต์โดยเฉลี่ยต่อช่อง ซึ่งมีปริมาตร $0.2 \times 0.2 \times 0.1$ มิลลิเมตร จากนั้นจึงคำนวณปริมาณเซลล์ยีสต์ให้มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร

4. การเตรียมเซลล์ยีสต์ในการทำปฏิกิริยาทรานสเอสเทอร์ฟิเคชันและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

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

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักสับสเตรททั้งหมด} &= \text{น้ำหนักน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์} + \text{น้ำหนักเมทานอล} \\ &= 0.5 \text{ กรัม} + 0.054 \text{ กรัม} \\ &= 0.554 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ต้องการใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ดังนั้น

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

นับเซลล์ยีสต์ ได้เท่ากับ 2.25×10^8 ดังนั้น

จำนวนเซลล์	2.25×10^8	เซลล์	ในอาหาร	1	มิลลิลิตร
จำนวนเซลล์	5.54×10^9	เซลล์	ในอาหาร	5.54×10^9	มิลลิลิตร
				<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/>	
				2.25×10^8	

แสดงว่า จะต้องปิเปตอาหารมาเท่ากับ 24.6 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีและการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ตามวิธีของ Kademi และคณะ (2000)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

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

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

วิธีการวิเคราะห์

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

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

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

2.1 สารผสมในปฏิกิริยา

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

2.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยใช้วิธี cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986) โดยดูดสารละลายส่วนบนจากที่ทำปฏิกิริยาในข้อ 2.1 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งให้แยกชั้น นำสารละลายส่วนใสสีเขียวอ่อนส่วนบนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มมิติก

2.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

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

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากตัวเซลล์

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

3.1 สารผสมในปฏิกิริยา

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

3.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

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

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมา เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มมิติก

3.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสสามารถ เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปของกรดปาล์มมิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

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

วิธีการวิเคราะห์

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

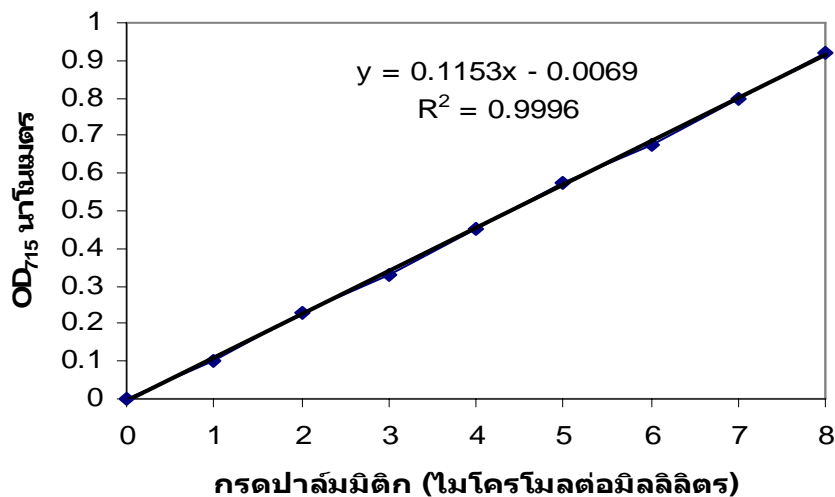


Figure 49. Standard curve of palmitic acid.

5. การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (IUPAC, 1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายผสมอะซีติก-คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 3:2
2. สารละลายอิมตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์
3. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล
4. น้ำเป็งเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

Table 17. The appropriate weight of sample for peroxide analysis.

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

2. เติมสารละลายอะซีติก-คลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลาย
3. เติมสารละลายอิมตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกพร้อมเขย่าแล้วตั้งไว้ในที่มีคนาน 5 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
5. นำสารละลายที่ได้ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต พร้อมเขย่าอย่างแรงเมื่อได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแข็ง 0.5 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทต่อจนกระทั่งสีน้ำเงินหมดไป
6. เตรียมและไตเตรทแบลนค์เช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำมัน
7. คำนวณค่าเปอร์ออกไซด์จากสูตร

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

- A = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
 B = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับแบลนค์ (มิลลิลิตร)
 N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)
 W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

6. การวิเคราะห์ค่าไอโอดีนในไขมันและน้ำมัน (IUPAC, 1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายวิจส์ (Wijs solution) โดยการชั่งสารไอโอดีนคลอไรด์ (ICI) หนัก 16.5 กรัม ละลายใน glacial acetic acid และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร หรืออาจเตรียมโดยชั่งไอโอดีนไตรคลอไรด์ 9 กรัม ละลายในสารละลายผสมของกรดอะซีติก 700 มิลลิลิตร และคาร์บอนเตตราคลอไรด์ 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา ปิดผนึกให้แน่น ด้วยพาราฟินจนกว่าจะนำมาใช้
2. สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ เข้มข้นร้อยละ 10
3. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยชั่งโซเดียมไทโอซัลเฟต 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดเบาๆ 5 นาที แล้วถ่ายลงในขวดเก็บสีขาขณะร้อน เก็บสารละลายในที่มืดและเย็น ทำการหาความเข้มข้นมาตรฐานโดยการอบสารโพแทสเซียมไดโครเมต ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ที่อุณหภูมิ 100

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งให้ได้น้ำหนัก
แน่นอนใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด ขวดละ 0.1 กรัม (สำหรับความเข้มข้น 1 นอร์มอล)
แต่ละขวดเติมน้ำกลั่นปราศจากคลอรีนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่มีโพแทสเซียมไอโอไดด์
2 กรัม และเติมสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งในที่
มืดทันที เป็นเวลา 10 นาที แล้วไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตข้างต้น โดย
ใช้น้ำแป้งเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอินดิเคเตอร์

4. คำนวณความเข้มข้นจากสูตร

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

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

สมมูลของโพแทสเซียมไดโครเมต = 49.032

5. การบอมนเตตระคลอไรด์ (CCl₄) หรือไซโคลเฮกเซน

6. น้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน

Table 18. The appropriate weight of sample for iodine analysis.

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

2. เติมการบอมนเตตระคลอไรด์หรือไซโคลเฮกเซน 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลาย

3. เติมสารละลายวิจส์ 25 มิลลิลิตร ด้วยปิเปตที่แห้งและสะอาด

4. เขย่าขวดอย่างรวดเร็ว ปิดจุกและเก็บไว้ในที่มืด 1-2 ชั่วโมง

5. เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ปริมาณ 20 มิลลิลิตร และน้ำดื่มใหม่ที่เย็นแล้ว 150 มิลลิลิตร

6. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำเป้งลงไป 2-3 หยด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแล้วไตเตรทต่อจนสีน้ำเงินหมดไป ก่อนปฏิกิริยาจะสิ้นสุดถึงจุดยุติให้ปิดขวดด้วยจุกยางเขย่าอย่างแรง เพื่อให้ไอโอดีนที่เหลืออยู่ในชั้นของคาร์บอนเตตราคลอไรด์ถูกดึงออกมาให้หมด
7. เตรียมแบลนค์ด้วยวิธีเดียวกัน
8. คำนวณค่าไอโอดีนจากสูตร

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

A = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับแบลนค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

หมายเหตุ ถ้าค่า B-A > B/2 ต้องทำการทดลองใหม่โดยใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยลง

7. การวิเคราะห์ค่ากรดและกรดไขมันอิสระ (IUPAC, 1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บสารละลายต่างในขวดแก้ว ก่อนนำมาใช้ทำการหาความเข้มข้นมาตรฐานที่แน่นอนโดยการนำโพแทสเซียมเอซิดพาทาเลท ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 0.8 กรัม (สำหรับความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนเนต 25 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับสารละลายต่างข้างต้น โดยมีฟีนอล์ฟทาไลน์เป็นอินดิเคเตอร์
3. คำนวณความเข้มข้นต่างจากสูตร

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

สมมูลของโพแทสเซียมแอซิดพาทาเลด = 204.216

4. ฟีนอล์ฟทาลีน เข้มข้นร้อยละ 1

วิธีวิเคราะห์

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

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

กรดไขมันอิสระร้อยละในรูปกรดปาล์มมิติก

$$= \frac{\text{ปริมาณค่าที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นค่า(นอร์มอล)} \times 25.6}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

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

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มอล ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเตรียมไว้อย่างน้อย 5 วันก่อนทำการทดลอง
2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล
3. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-2 กรัม ใส่ในขวดกลั่นที่แห้งและสะอาด
2. เติมสารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร แล้วเติมลูกแก้ว
3. จัดเครื่องกลั่นพร้อมเปิดน้ำหล่อชุดควบแน่น รีฟลักซ์สารละลายให้เดือดเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง
4. นำขวดสารละลายออกจากอุปกรณ์ควบแน่นของชุดกลั่น
5. เติมฟีนอล์ฟทาลีน 5 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก
6. เตรียมและไตเตรทแบลนค์เช่นเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณค่าสปอนิฟิเคชันจากสูตร

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

โดย

A = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับแบลนค์ (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

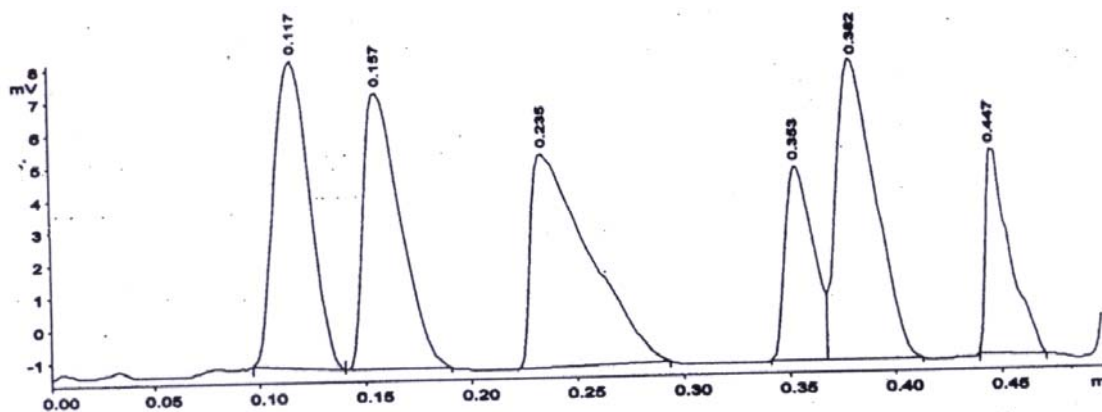
9. การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม

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

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

2. หยดสารละลายไตรกลีเซอไรด์และเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานบน quartz rods ประมาณ 1 ไมโครลิตร นำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์:กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 50:20:0.3 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 8 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน:เบนซีน ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร

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



Calculation Method: Percent

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

Figure 50. Retention time of standard glyceride and methyl esters

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

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.21 กรัม
ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36.61 กรัม
ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

Table 19. Characteristics of samples collected from palm oil factories and numbers of yeast isolates isolated from YM and IMY medium.

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

Table 19. Characteristics of samples collected from palm oil factories and numbers of yeast isolates isolated from YM and IMY medium (continue).

Samples	Appearances	pH	Temp (°C)	Number from YM	Number from IMY
Asian palm oil Company., Ltd., Krabi					
1	Soil mixed palm pressed fiber	5.0	33	2	3
2	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	33	5	5
3	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	31	5	4
4	Oil contaminated palm pressed fiber	6.0	29	3	2
5	Oil contaminated dark color soil	5.0	32	2	4
6	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	34	4	1
7	Oil contaminated soil	4.0	41	1	2
8	Oil contaminated brown color waste water	4.0	54	4	2
9	Oil contaminated black color waste water	8.0	44	2	-
Uniwanich palm oil Company., Ltd., Krabi					
1	Oil contaminated brown color waste water	9.0	35	-	-
2	Oil contaminated water around factory area	7.0	41	2	-
3	Waste water	4.0	53	3	2
4	Brown color waste water	4.0	64	2	1
5	Waste water	4.0	42	4	5

Table 19. Characteristics of samples collected from palm oil factories and numbers of yeast isolates isolated from YM and IMY medium (continue).

Samples	Appearances	pH	Temp (°C)	Number from YM	Number from IMY
6	Oil contaminated palm pressed fiber	4.0	37	3	6
7	Oil contaminated palm pressed fiber	5.0	63	4	1
8	Waste water	4.0	54	3	5
Andaman palm oil Company., Ltd., Krabi					
1	Oil contaminated brownish color water	6.0	34	7	5
2	Oil contaminated brown color soil	4.0	35	1	2
3	Oil contaminated black color soil	3.0	50	-	2
4	Oil contaminated black color soil	4.0	39	1	2
5	Oil contaminated brown color water	4.0	35	7	3
6	Oil contaminated turbid brown color water	4.0	51	3	3
7	Oil contaminated palm pressed fiber	7.0	31	5	-
8	Oil contaminated turbid brown color water	6.0	36	6	3

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

AAGGCACACTGCGTTCCTCAGTCCCCAAGATGTATCCAGCAGAGAGCTATAACACA
GCCGAAACTAGCTACCTTCTCTCTTACCATTATCCATCCCGGAAAAGTATGCTGGCC
TGCAAACCGATTGCTCGGCAAGCAAGTCTTGACTTCAAGCGTTTCCCTTCCAACAATT
TCACGTAAGTAACTCTCTTTCCAAAGTGCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGT
CGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCATAATGAGC
TGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAATGTATCACAAGCGCTGGGCGTCCGC
ACCATATACGGGGTCTCACCCTATGCCGCTGTATTCCAACAGACTTGTGTGCGGTC
CAACGCGGAAAACATTTCTAGAGATTAGAAGTTCGGACACCGAAGGTGCCAGATTATA
AATTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGCTACTAGGGGAATCCTTGTTAGTTTCCCTT
TCCTCA

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

TAACCGCAGTCTCAGTCTAGGCTGGCAGTTATCGACGAAGGCTATAACACACAAAC
CGAAGCCGTCCACATTCCAACGCAATTCTCCTACCGCCAAACTGATGCTGGCCCGA
TAAACTTGTAGAGGCCACCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGACCTC
AAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTTCACGCTCTTTTCAAAGTCCCTTTC
ATCTTTCCAGCACTGTAATTTGTTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATG
GAATTTACCACCCACTTAGACTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAGGAACTTT
ACATAGGCCTGGATCATCGCAGCGCACGGGATTCTCACCCCTCTGTGACGTTCTGTTCC
AAGAAACATAGACACGAGCCAGACCCAAAGATACCGTCTTCAAATTACAACCTCGGA
CTCTGAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGTTCACTCGCCGCTACTAAG
GCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCG

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

ACACGGCCGCAGTCCTCGGTCCCCGCACGCAGCATCTGGCCCTGGCTATAAACTCG
 CAAGAGCCACGTTCCAGAACCCCTTCTCCTGCAGCAAGAACCGATGCTGGCCCAGGG
 AAAGCCCAGAGCGCCGCCACGAGAGGCAGCGGTGCGCAATCCCCATGTCGGGGCGC
 AATACCCTTCCCTTTCAACAATTCACGTGCTGTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTT
 CATCTTTCCTTACAGTACTTGTTGCTATCGGTCTCTCTCGCGTATTTTAGCCTTAGA
 TGGAATTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGAGTCGTCAGAAGGG
 CCTCACTGCTTCCGCCGGCATCCCACGGGGCTCTCACCTCCTGGGCGCCCTGTTCCA
 AGGGACTTGGACACCGCCTTCCACACAGACTTCAACCTGCAATCTACAACCTCGTCGG
 CCAAAGCACGATTTCAAATCTGAACTCTTGGCGCTTCACTCGCCGCTACTGGAGGCA
 AATCCTGGTGGGTTTCTTTT

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

CCTACACGGCCGCAGTCCTCGGTCCCCGCACGCAGCATCTGGCCCTGGCTATAACAC
 TCCGAAGAGCCACGGTCCAGAACCCCTCTCTCTGCAGCAAGAACCGATGCTGGCCCA
 GGGAAAGCCCAGAGCGCCGCCACGAGAGGCAGCGGTGGCCAATCCCCATGTCGGG
 CGCAATACCCTTCCCTTTCAACAATTACACGTGCTGGTTCCTCTCTTTTCAAAGTGC
 TTTTCACTTTTCTCTACAGTACTTGTTGCTATCGTCTCCTCGCCAGTATTTAGCCTG
 AGATGGAAGTTACCACCCGCTTGGAGCTGCATTGCAAAACAACCTCGACTCGTCAGAA
 GGGCCTCACTGCTTCCGCCGGCATCCCACGGGGCTCTCACCTCCTGGGCGCCCTGTT
 CCAAGGGACTTGGACACCGCCTTCCACACAGACTCCAACCTGCAATCTACAACCTCGT
 GCCGCAAAGCACGATTTCAAATCTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTGAAG
 CAATCCCTTGTTGTTTCTTTTCTCA

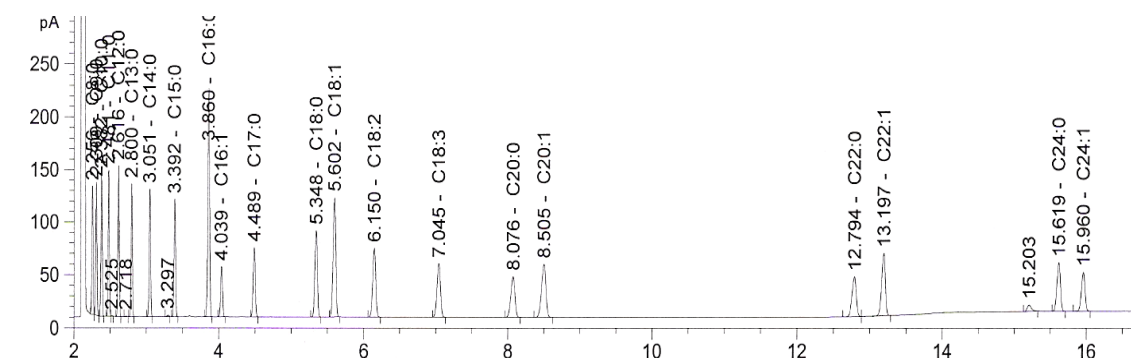


Figure 51. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of standard qualitative from palm oil.

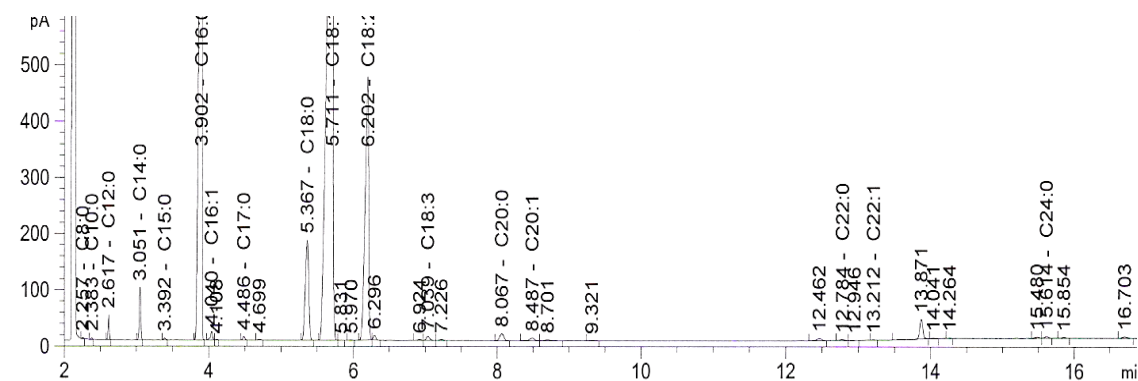


Figure 52. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of qualitative from refined palm oil.

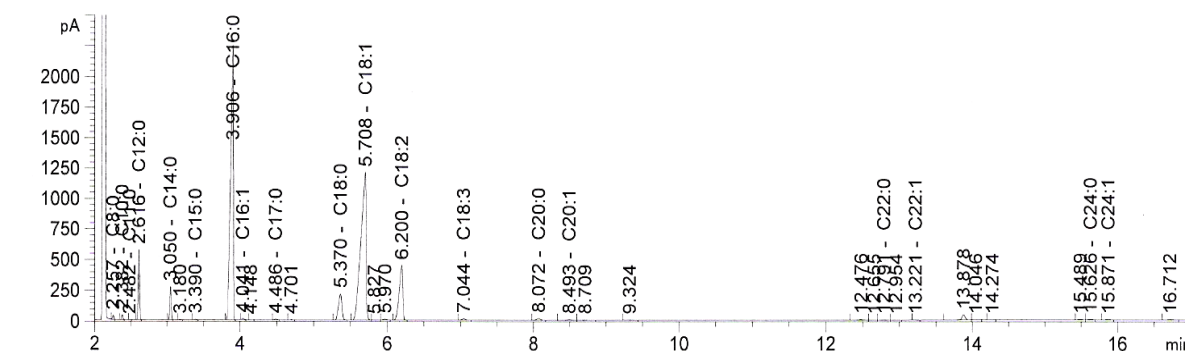


Figure 53. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of qualitative from crude palm oil.

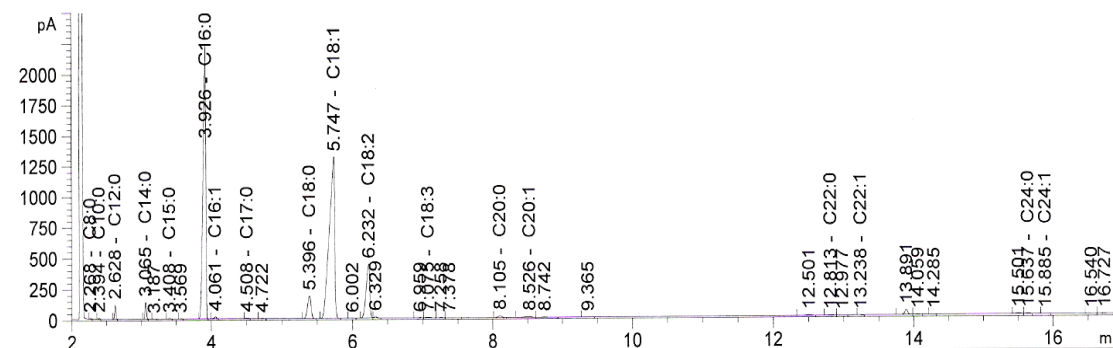


Figure 54. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of qualitative from waste palm oil.

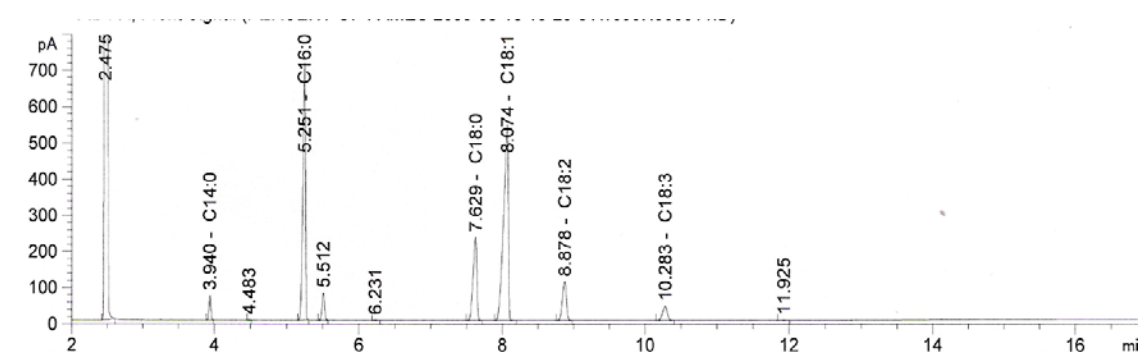


Figure 55. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of standard quantitative from palm oil.

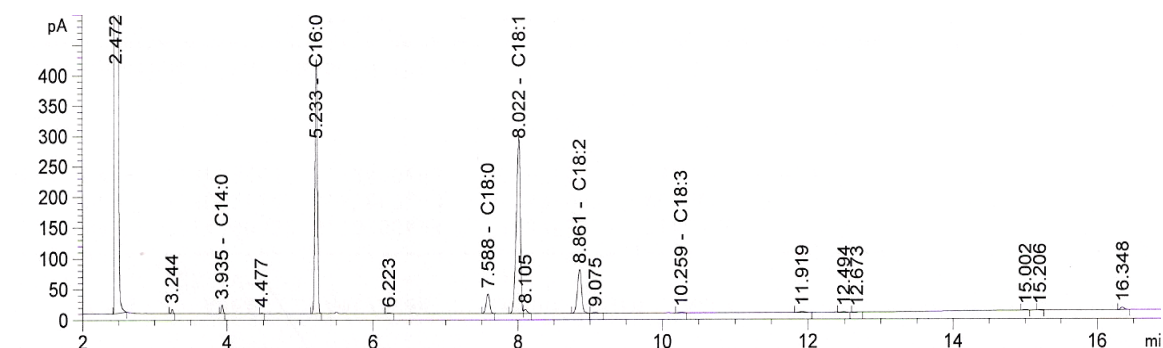


Figure 56. Fatty acid methyl ester Chromatogram of GC analysis of quantitative from refined palm oil.

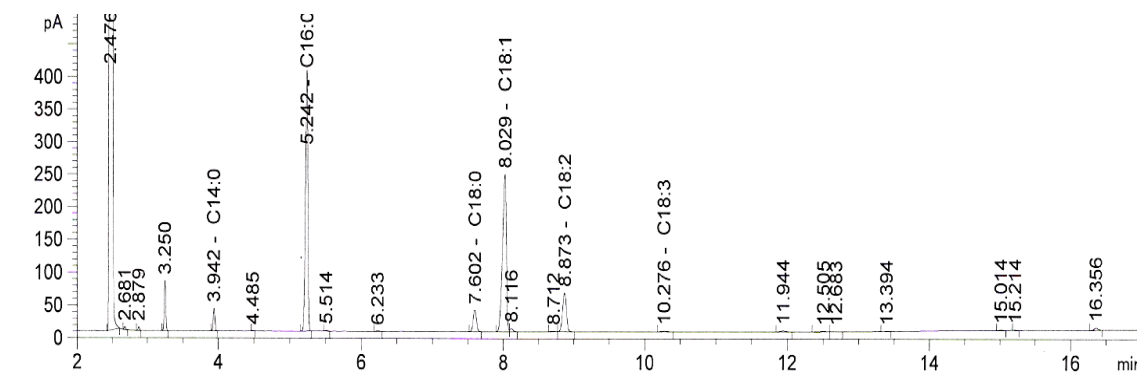


Figure 57. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of quantitative from crude palm oil.

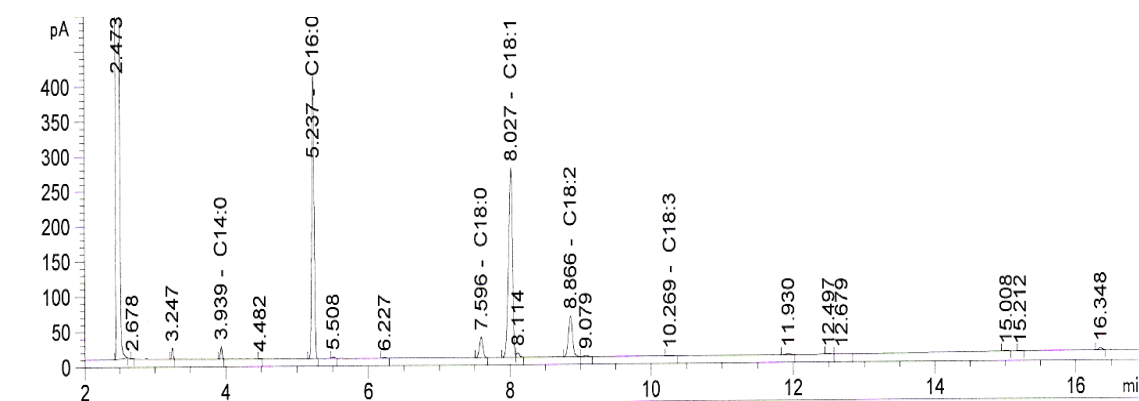


Figure 58. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of quantitative from waste palm oil.

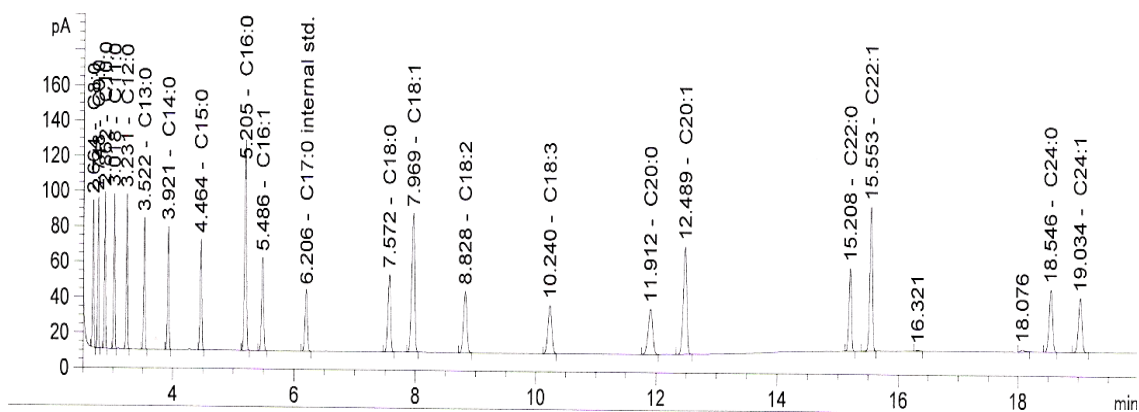


Figure 59. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of standard qualitative from biodiesel.

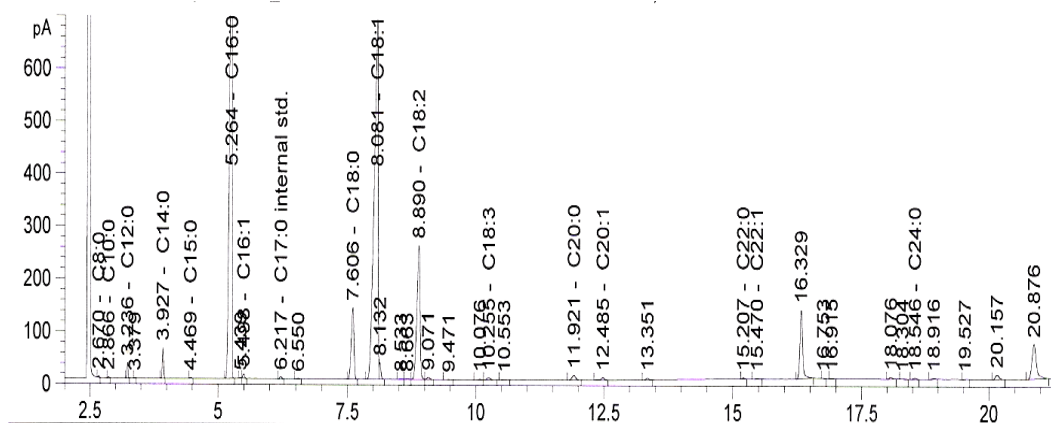


Figure 60. Fatty acid methyl ester chromatogram of GC analysis of qualitative from biodiesel.

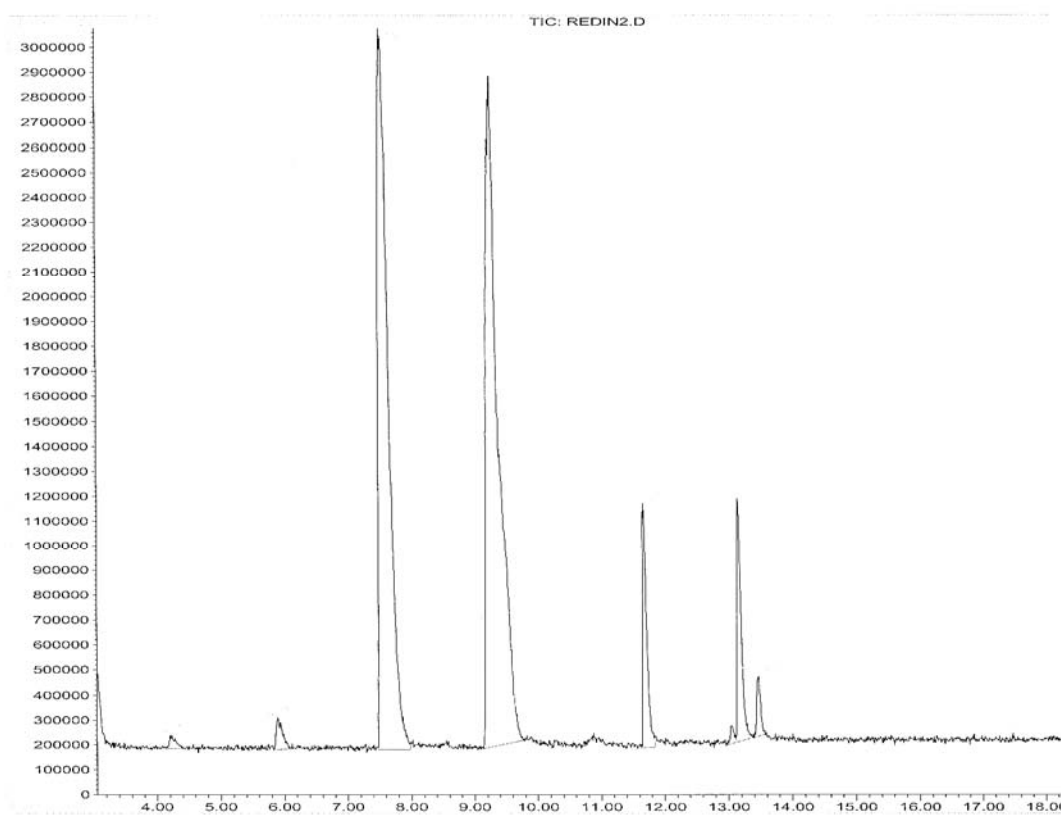


Figure 61. Chromatogram of GC-MS analysis of biodiesel reaction mixture.

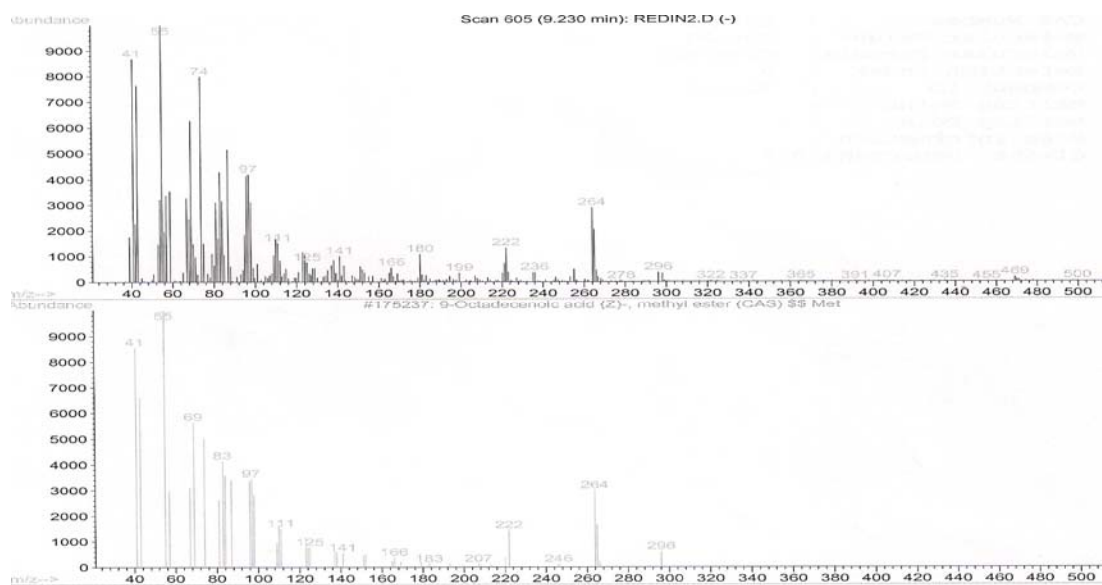


Figure 62. Chromatogram of GC-MS of oleic acid methyl ester from reaction mixture.

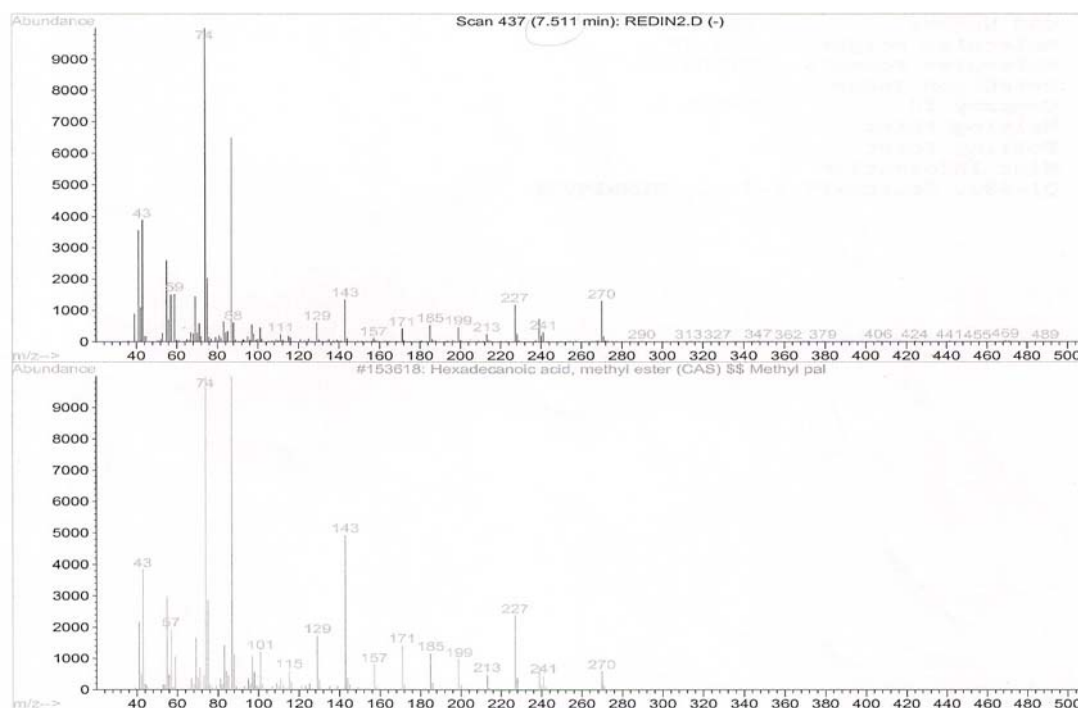


Figure 63. Chromatogram of GC-MS of palmitic acid methyl ester from reaction mixture.

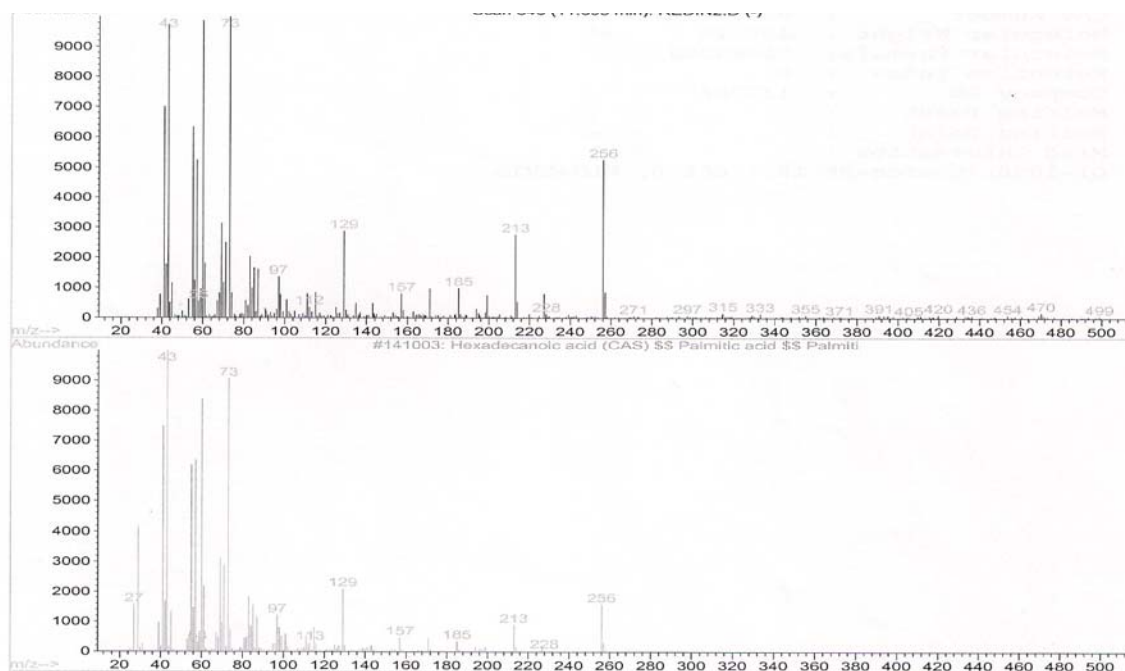


Figure 64. Chromatogram of GC-MS of palmitic acid from reaction mixture.

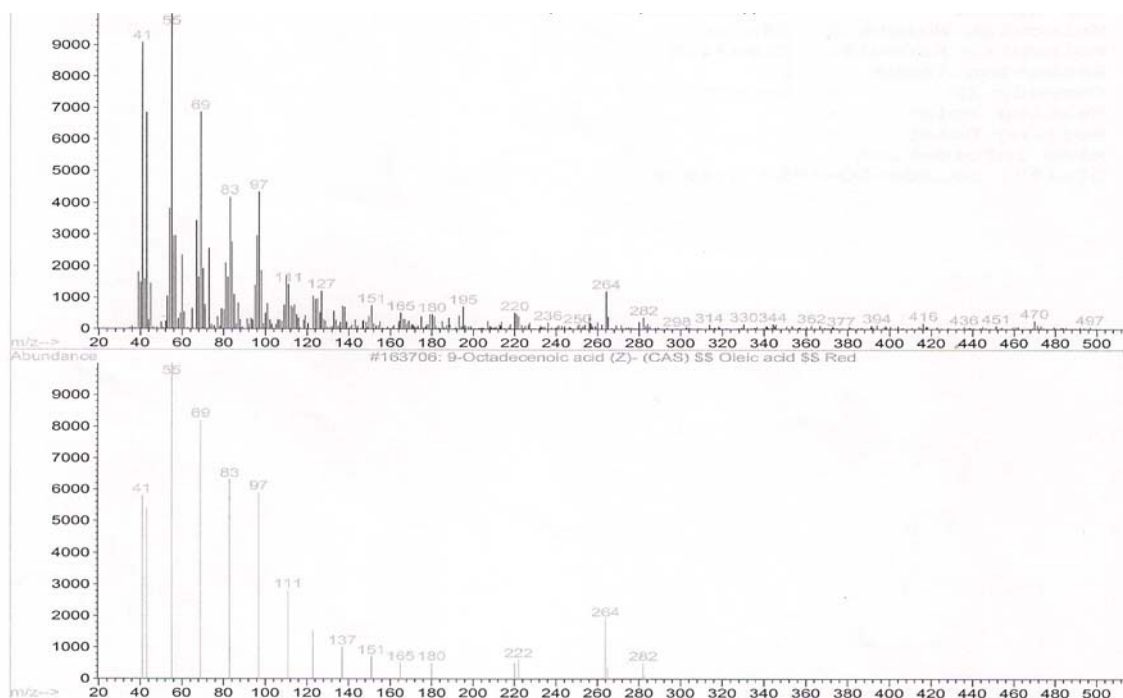


Figure 65. Chromatogram of GC-MS of oleic acid from reaction mixture.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวปริมปรัชญ์ ศรีหมาน	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4882044	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนความเป็นเลิศคณะอุตสาหกรรมเกษตร (ประเภท ข) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Purimprat Srimhan, Benjamas Cheirsilp and Tipparat Hongpattarakere. 2007. Environment Screening for Lipase Producing Yeasts from Palm Oil Mil. The 19th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology “Biotechnology for Gross National Happiness”. Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathumthani, Thailand. 9-12 October