บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) (Clean model, Lab service Ltd)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) (Vision Scientific Co., Ltd)

เครื่องชั่งแบบละเอียด (Sartorius, Germany)

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) (Barnstead, U.S.A.)

กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (stereoscopic microscopes) (Olympus, Japan)

กล้องสเตอริโอ (stereoscope) (Olympus, Japan)

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Model 250, Denver Instrument)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ANTHOS Zenyth 200 Microplate Spectrophotometer)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro refrigerated centrifuge) (Kubota 3700, Japan)

ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) (Mammert, Germany)

เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave) (Ta Chang Medical instrument, Taiwan)

เครื่องดูดสารแบบสุญญากาศ (suction) (GAST, U.S.A.)

กระดาษกรองเบอร์1และ 93 (Whatmann)

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) (Brand, Germany)

เครื่องกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเลต (Vilber lourmat, Germany)

หลอดรังสีอัลตราไวโอเลต (Sylvania, Japan)

แผ่นโครมาโทกราฟี ชนิดอะลูมิเนียม ซิลิกา เจล 60 F_{254} (Merck, Germany)

เครื่อง Thermocycler รุ่น Model TP600 (Takara, Japan)

อุปกรณ์กรองปั่นเหวี่ยง (Centrifugal Filter Devices) รูกรอง 10 KDa (Millipore, U.S.A.)

เครื่องตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอ ยี่ห้อ ABI รุ่น 3100 (Applied Biosystem U.S.A.)

เครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร (cork borer)

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) (Shimudzu, Japan)

สารเคมี

แบคโต-ทริบโตน (bacto-tryptone) (Difco Laboratories, U.S.A.)

เนื้อสกัด (beef extract) (Hi media, India)

น้ำตาลกลูโคส (glucose) (Hi media, India)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Merck, Germany)
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	(Merck, Germany)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	(Merck, Germany)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Merck, Germany)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Ajax Finechem, Australia)
Potato Dextrose Agar (PDA)	(Hi media, India)
Potato Dextrose Broth (PDB)	(Hi media, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Hi media, India)
โรดามีน บี (rhodamine B)	(Ajax Finechem, Australia)
กัมอะราบิค (gum Arabic)	(Fluka, Switzerland)
พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate)	(Sigma,U.S.A.)
2-โพรพานอล (2-propanol:CH_3CHOH)	(Lab scan, Ireland)
ไตรตอน เอกซ์-100 (triton x-100)	(Scharlau,Spain)
บัฟเฟอร์ทริส (tris-HCl)	(Scharlau,Spain)
พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-NP = *p*-nitrophenol)	(Fluka,Switzerland)
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	(Ajax Finechem, Australia)
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 5H_2O$)	(Merck, Germany)
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Ajax Finechem, Australia)
สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol regent)	(Carlo Erba, Milan, Italy)
โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin = BSA)	(Merck, Germany)
แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B: $C_{47}H_{73}NO_{17}$)	(Bristol-Myers Squibb, France)
แอมพิซิลลิน (ampicillin)	(Drug laboratories,Thailand)
คีโตโคนาโซล(ketoconazole: $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$)	(Scharlau,Spain)
สีย้อมแลคโตฟีนอล คอตตอนบลู (lactophenol cotton blue)	(Sigma,U.S.A.)
สารเคมีเอ็นทีจี (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG)	(Fluka, Switzerland)
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด100 bp + 1.5 kb	(Fermentas, U.S.A.)
2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-Mercaptoethanol)	(Sigma, U.S.A.)
3-เมทิล-1-บิวทานอล (3-Methyl-1-butanol)	(Carlo Erba, Milan, Italy)
อะกาโรส (agarose)	(Sigma, U.S.A.)
กรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid)	(Amersham Life Science, England)

คลอโรฟอร์ม (chloroform)	(Labscan, Thailand)
เฮกเซน (hexane)	(Labscan, Thailand)
เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate)	(BDH Chemical Ltd, England)
กรดอะซิติก (acetic acid)	(BDH Chemical Ltd, England)
อะซิโตน (acetone)	(Labscan, Thailand)
กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)	(RIEDEL-DE-HAEN, Germany)
เมทานอล (methanol)	(Labscan, Thailand)
กรดฟอร์มิค (formic acid)	(Scharlau, Spain)
CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide)	(Merck, Germany)
Deoxy ribonucleside triphosphate (dNTP)	(Fermentas, USA)
EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)	(Merck, Germany)
เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)	(Fermentas, USA)
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	(Fermentas, USA)
Polyethylene glycol	(Fluka, Switzerland)
เอนไซม์ตัดจำเพาะ AluI HinfI และ MboI	(Fermentas, USA)
เอนไซม์ย่อยอาร์เอ็นเอ (RNase)	(Fermentas, USA)
Taq Buffer	(Fermentas, USA)
Taq Polymerase	(Fermentas, USA)
PCR-Script™ Amp Cloning Kit	(Strategene, USA)
StrataPrep® PCR purification kit	(Stratagene, USA)
FastPlasmid™ Mini Kit	(Eppendorf, Germany)
Eicosane	(Aldrich, Germany)

วัตถุดิบ

ผงแป้งถั่วเหลือง (soybean flour)	(โปรตาซอย, สาลีกิจ จำกัด, ไทย)
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	(มรกต อินดัสตรี้ส์ จำกัด, ไทย)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การแยกราจากแหล่งตัวอย่าง

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินตามบริเวณต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสจากแหล่งดินต่าง ๆ ตะกรันน้ำมันและส่วนต่าง ๆ ของพืชน้ำมัน ดังนี้ สุ่มเก็บตัวอย่างดิน โดยถางหญ้าหรือเศษพืชออกก่อน แล้วใช้เสียมหรือเครื่องมือขุดเจาะดินลงไปเป็นหลุมรูปตัววี (V) ให้ลึกประมาณ 6-7 นิ้ว จากผิวดิน แล้วใช้เสียมแซะดินข้างหลุมข้างใดข้างหนึ่งหนาประมาณ 1-2 นิ้ว รวมดินทั้งหมดทุกจุดเข้าเป็นตัวอย่างเดียวกัน แล้วเก็บตัวอย่างดินในถุงพลาสติกใหม่และสะอาด แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำดินมาใช้ ตะกรันน้ำมันเก็บห่อเอาไว้ในกระดาษที่อุณหภูมิห้อง ส่วนต่าง ๆ ของพืชน้ำมันเมื่อทำการเก็บโดยเลือกจากส่วนที่มีการเจริญของราและส่วนต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีการเจริญของราแล้วนำมาใส่ถุงพลาสติกใหม่และสะอาด นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การแยกราและทำให้บริสุทธิ์จากแหล่งตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ มาทำเป็นสารละลายเจือจางลดความเข้มข้นลงตามลำดับ (dilution plate method) นำตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพูที่บรรจุน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายดินให้เข้ากันบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) แล้วทำการเจือจางสารละลายดินโดยลดความเข้มข้นอย่างเป็นลำดับจนถึง 10^{-5} แล้วดูดสารละลายที่ถูกทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-4}-10^{-5} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) (ภาคผนวก ก) ที่ใส่สารปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเส้นใยราที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการแยกเส้นใยราดังกล่าวให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เตรียมใหม่ เก็บราที่แยกได้ไว้ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส

นำราที่ทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 1.2 มาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพส โดยนำราที่แยกได้ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้เครื่องตัดจุกคอร์กเบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีราเส้นใยเจริญอยู่ แล้วนำชิ้นวุ้นดังกล่าวไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO (Frenken และคณะ,1992) ที่ผสมด้วยโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1% (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญและคัดเลือกราที่มีความสามารถในการเรืองแสงสีส้ม ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร และนำราที่คัดเลือกได้ไปใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3. การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสของราที่คัดเลือกได้

3.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

นำราเส้นใยที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากข้อ 2 ซึ่งเป็นราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสมาทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส โดยเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้เครื่องตัดจุกคอร์กเบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีราเส้นใยเจริญอยู่ แล้วนำชิ้นวุ้นดังกล่าวจำนวน 3 ชิ้นใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิตไลเพส (Lipase production medium : LP-medium) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Cardenas และคณะ, 2001) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองแยกเส้นใยราออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเอาของเหลวส่วนบนไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำส่วนของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้อุปกรณ์กรองชนิดปั่นเหวี่ยง (Centrifugal Filter Devices) ซึ่งมีขนาดรูกรอง 10 กิโลดาลตัน (KDa) แล้วนำส่วนของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสโดยวัดค่าแอกทิวิตีของไลเพสทั้งหมด วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด และหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะ โดยทำการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) 3 ซ้ำ

3.2 การวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสทั้งหมด (Total activity)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากราในข้อ 3.1 มาวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสทั้งหมดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตมิทรี (Maia และคณะ, 2000) โดยใช้สารละลายตั้งต้น คือ พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-NPP : *p*-nitrophenyl palmitate) ตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-NP : *p*-nitrophenol) ซึ่งเป็นสารละลายผลิตภัณฑ์หลังทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยวัดที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงรุ่น ANTHOS Zenyth 200 แล้วเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (U : Unit) มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตทแล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 นาโนโมลต่อนาทีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.3 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein)

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากเชื้อในข้อ 3.1 มาวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี micro Lowry's assay (Held และ Hurley, 2001) ด้วยวิธีการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (BSA = Bovine serum albumin) ที่มีปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม (ภาคผนวก ง)

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อระบุสายพันธุ์

จากการวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสทั้งหมด และการวัดค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากราที่คัดเลือกได้ ไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (Specific activity) (ภาคผนวก จ) ราที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดจะถูกคัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูพันธุศาสตร์เพื่อระบุสายพันธุ์ และเชื้อดังกล่าวจะนำไปชักนำให้เกิดมิวเทชันในขั้นต่อไป

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด

นำราที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสังเกตลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี ขอบของโคโลนี ความฟูของเส้นใย และทำการศึกษาลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการเผาไฟจนร้อนแดงแล้วรอให้เย็น แล้วนำมีดผ่าตัดดังกล่าวมาตัดบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ให้เป็นสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปวางบนสไลด์ในจานแก้ว (plate) ที่มีแท่งแก้วสามเหลี่ยมและน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการเผาไฟจนร้อนแดงแล้วรอให้เย็นจึงนำไปเขี่ยบนโคโลนีราแล้วนำมาสัมผัสที่ด้านขอบของชิ้นวุ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตรดังกล่าวข้างต้นและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบนชิ้นวุ้น ปิดฝาจานแก้วแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1–3 วัน แล้วตรวจสอบทุกวันโดยนำสไลด์ที่มีการเจริญของเส้นใยรามาย้อมสีแลคโตฟีนอล คอตตอนบลู (Lactophenol cotton blue) แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 การศึกษาอณูพันธุศาสตร์เพื่อระบุสายพันธุ์จากราที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด

4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากราที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด

นำเส้นใยราที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดมาสกัด DNA โดยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou, Miwa และ Hogetsu (1999) โดยใช้โกร่งบดจนละเอียด เติมสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อล้างตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 700 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (chloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ใน หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24: 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีกครั้งผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสารปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ใน

หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ หลอดใหม่เติมสารละลาย 2-โพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม 10 mg/mL RNase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ PEG (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือตะกอนของดีเอ็นเอ เติมเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ออก ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.2.2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของราที่ตำแหน่ง ITS ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 4.2.1 ไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) ได้แก่ ITS1-F (forward) 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' กับ ITS4 (reverse) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White และคณะ, 1990; Gardes และ Bruns, 1993) โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาจำนวนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 10-100 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM primer (ITS1F และ ITS4) และ 2.5 U Taq polymerase (Fermentas) การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอทำในเครื่อง Thermocycler (Takara PCR thermal cycler Model TP600, Japan) โดยได้กำหนดสภาวะไว้ดังต่อไปนี้

Initial denaturation	94	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Amplification				
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	38 รอบ
Annealing	51	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส		

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโทรโฟเรซิส (electrophoresis) โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ใน 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ค) เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ค) ต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

4.2.3. เชื่อมดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และพาหะเข้าด้วยกัน

นำผลผลิตที่ได้จาก 4.2.2 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ StrataPrep® PCR purification kit (STRATAGENE) ทำการโคลนชิ้นส่วน ITS โดยใช้ PCR-Script™ Amp Cloning Kit และสกัดพลาสมิดโดยใช้ FastPlasmid™ Mini Kit แล้วหาลำดับเบสของชิ้นส่วน ITS ใน พลาสมิด โดยส่งไปวิเคราะห์ที่สำนักงานวิจัยคณะแพทย์ศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ด้วยเครื่องตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) ยี่ห้อ ABI รุ่น 3100 ของบริษัท Applied Biosystem ข้อมูลของลำดับเบสที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับ ITS ของราชนิดอื่นๆ ที่ได้มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้ โปรแกรม BLAST version 2.1 ที่จัดทำโดย The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

5 ชักนำให้เกิดมิวเทชันและการคัดเลือกในราที่คัดเลือกได้

5.1 การคัดเลือกราโคโลนีเดี่ยว (Bapiraju และคณะ, 2004)

5.1.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension)

ทำโดยนำราที่คัดเลือกได้และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดมาบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งเอียง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำมาใส่สารละลายผสมของ 0.02 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (0.02 M phosphate buffer) กับ Tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 5,000 : 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเพื่อให้สปอร์ของราหลุดออกมาอยู่ในสารละลายเป็นสารแขวนลอย จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ไปเขย่าอีกครั้งที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้สปอร์แยกออกจากกันและมีกระจายสม่ำเสมอ นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้มากรองด้วยสำลีที่ผ่าน

การฆ่าเชื้อแล้วเพื่อกำจัดเส้นใยราออกไป แล้วเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ที่ความเข้มข้นจำนวน 10^5-10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Kuhad และคณะ, 1994) โดยนับจำนวนสปอร์ด้วย อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5.1.2 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว

นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้จากข้อ 5.1.1 มาทำการลดระดับการเจือจางเป็น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} (serial ten fold dilution) ด้วย 0.02 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่ผสมกับ Tween 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 5,000 : 1 แล้วดูดสารแขวนลอยสปอร์มาอย่างละ 100 ไมโครลิตรในแต่ระดับการเจือจาง มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบและนับจำนวนสปอร์ที่เจริญบนแต่ละจานเพาะเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA โดยในแต่ละความเจือจางจะทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำราจากจานเพาะเชื้อที่มีการเจริญแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว เก็บมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในจานเพาะเชื้อใหม่แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้เครื่องตัดจุกคอร์กเบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่มีราเส้นใยเจริญอยู่ แล้วนำชิ้นวุ้นดังกล่าวจำนวน 3 ชิ้นใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิตไลเพส และนำไปวัดการทำงานของไลเพส โดยมีขั้นตอนการเก็บผลดังหัวข้อ 3.1 3.2 และ 3.3 โดยแต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ และทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสสูงสุดไปทำการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตต่อไป

5.2 การชักนำให้เกิดมิวเทชันของราโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (Kuhad และคณะ, 1994)

5.2.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์

นำราที่ทำการคัดเลือกจากวิธีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ มาทำเป็นสารแขวนลอยสปอร์ตามวิธีในข้อ 5.1.1

5.2.2 การชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

ทำโดยดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 4 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตรโดยแต่ละจานมีแท่งแม่เหล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำจานไปวางในตู้ฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่มีเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กอยู่ ปรับความเร็วในการหมุนให้เหมาะสม กำหนดระยะห่างระหว่างหลอดฉายรังสีและจานที่ 20 เซนติเมตร โดยให้ได้รับการฉายรังสีจากหลอดฉายรังสีอัลตราไวโอเลตขนาดหลอด 10 วัตต์ จำนวน 5 หลอด โดยเปิดฝาจานออกเพื่อให้สปอร์ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ที่ 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที แล้วบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์ออกมา 1 มิลลิลิตรที่ระยะเวลาการฉายรังสีต่าง ๆ ของรา นำสารแขวนลอยสปอร์ไปทำการลดระดับการเจือจางเป็น 10^{-1} ถึง 10^{-6} เพื่อนับจำนวนโคโลนีที่งอกจากสปอร์ ดูดสารแขวนลอยสปอร์ที่ทำการลดระดับการเจือจางแล้วมาปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสในที่มืด บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบและนับจับจำนวนโคโลนีเดี่ยวของราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยแต่ละความเจือจางจะทำ 3 ซ้ำ แล้วนำข้อมูลจำนวนโคโลนีที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลาต่าง ๆ ของการฉายรังสีอัลตราไวเลตกับจำนวนโคโลนีที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ (survival curve) ทำการตรวจสอบมิวแทนต์ที่ได้ โดยนำราจากจานเพาะเชื้อแก้วที่มีอัตราการอยู่รอดน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลาการฉายแสงต่าง ๆ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและทำการถ่ายเชื้อทุก 7 วันโดยนำราที่ได้ชั่วรุ่นที่ 2 และ 6 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้เครื่องตัดจุกคอร์กเบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่มีราเส้นใยเจริญอยู่ แล้วนำชิ้นวุ้นดังกล่าวจำนวน 3 ชิ้นใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิตไลเพสและนำไปวัดการทำงานของไลเพส โดยมีขั้นตอนการเก็บผลดังหัวข้อ 3.1 3.2 และ 3.3 โดยแต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ และทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสสูงสุดไปทำการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร NTG ต่อไป

5.3 การชักนำให้เกิดมิวเทชันของราโดยใช้สาร NTG (Tan และคณะ, 2003)

5.3.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์

นำราที่ทำการคัดเลือกจากการชักนำให้เกิดมิวเทชันของราโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต มาทำเป็นสารแขวนลอยสปอร์ตามวิธีในข้อ 5.1.1

5.3.2 การชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร NTG

ทำโดยดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดและดูดสาร NTG โดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ที่ 0.1 0.2 0.5 0.7 และ 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาปริมาตร 1 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นจะใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันโดยทันทีและนำไปบ่มที่เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารแขวนลอยสปอร์ไปทำการลดระดับการเจือจางเป็น 10^{-1} ถึง 10^{-6} ดูดสารแขวนลอยสปอร์ที่ทำการลดระดับการเจือจางแล้วมาปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบและนับจับจำนวนสปอร์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยแต่ละความเจือจางจะทำ 3 ซ้ำ แล้วนำข้อมูลจำนวนสปอร์ที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของสาร NTG กับจำนวนโคโลนีที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ ทำการตรวจสอบ มิวแทนต์ที่ได้ โดยทำเช่นเดียวกับการตรวจสอบมิวแทนต์ของราที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

6. ศึกษาลักษณะบางประการของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์

6.1 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์

นำราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสังเกตลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี ขอบของโคโลนี ความฟูของเส้นใย

6.2 การศึกษาอัตราการเติบโตของราของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์

นำราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ภาคผนวก ข) ทุก 2 วัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และนำราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 1 สัปดาห์ดังกล่าวมาตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้นมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรแล้วนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการเก็บเส้นใยทุก ๆ 3 วัน แล้วนำไปหาน้ำหนักแห้งโดยเลี้ยงเป็นเวลาทั้งหมด 21 วัน

6.3 การศึกษาหา Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ต่อความต้านทานสารปฏิชีวนะเพื่อใช้คัดเลือกเชื้อมิวแทนต์

นำราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตและจากการชักนำด้วยสาร NTG ที่มีแอกทิวิตีที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน ตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือ คีโตโคนาโซล ใช้ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 100 120 และ 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ และวัดการเจริญเติบโตของราเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารปฏิชีวนะโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในวันที่ 7 เลือกความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกมิวแทนต์ต่อไป

7. การตรึงรูปไลเพสจากราที่คัดเลือกบนวัสดุค้ำจุน

ตรึงรูปไลเพสจากราที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 3 บนวัสดุค้ำจุน 2 ชนิด คือ ไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธ และโดโลไมต์ โดยประยุกต์ใช้วิธีดูดซับ และตกตะกอน (Combined adsorption and precipitation) ของ Minovska และคณะ (2004) ผสมวัสดุค้ำจุน 1 กรัมกับสารละลายไลเพสของรา 2 มิลลิลิตร และบ่มพร้อมทั้งกวนเบา ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และล้างไลเพสตรึงรูปโดยล้าง 2 ครั้งด้วยอะซิโตนแช่เย็นครั้งละ 20 มิลลิลิตร และกรองไลเพสตรึงรูปที่ได้แบบสุญญากาศ หลังจากนั้นเก็บไลเพสตรึงรูปในตู้ดูดความชื้น เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำล้าง

ไลเพสตรึงรูปไปตรวจวัดตามวิธีข้อ 3.2 กับ ข้อ 3.3 และคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีนที่ใช้ (protein loading) และค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง (% immobilization efficiency) ดังสมการในภาคผนวก จ เมื่อได้ไลเพสตรึงรูปดังกล่าวก็จะนำไปทดสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันต่อไป

8. การศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์

8.1 การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ (ใช้ปริมาณน้ำมันปาล์ม 3 กรัม) ผสมกับสารละลายเอนไซม์ (ที่ 50 เปอร์เซนต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม คือ 1.34 มิลลิกรัมและที่ 100 เปอร์เซนต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม คือ 2.67 มิลลิกรัม) โดยใช้สารละลายเอนไซม์จากเชื้อข้อ 3.1 ข้อ 3.2 และ ข้อ 3.3 แล้วนำมาบ่มโดยปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะมีการใส่เมทานอลในรูปแบบต่าง ๆ โดยในการทดลองนี้จะทำการทดลอง 2 รูปแบบ คือ

8.1.1 การใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น (Three step feeding of methanol)

ทำการใส่เมทานอล ที่ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ เข้าไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยแบ่งใส่เมทานอลครั้งละ 1 โมลาร์ ครั้งแรกจะใส่เมทานอลเข้าไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในตอนเริ่มต้นของปฏิกิริยา ส่วนอีกสองครั้งใส่ที่ชั่วโมงที่ 8 และ 16 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Shimada และคณะ,2002) ซึ่งในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วในการหมุน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 200 ไมโครลิตร ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นบนจากการปั่นเหวี่ยงไปทำการตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์

8.1.2 การใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง (Continuous feeding of methanol)

ทำการใส่เมทานอล ที่ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ เข้าไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบต่อเนื่อง (continuous feeding) (ดัดแปลงจาก Shimada และคณะ, 2002) ด้วยอัตราการ

ไหลของเมทานอลเท่ากับ 0.018 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ความเร็วในการหมุน 600 รอบต่อนาที ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง 200 ไมโครลิตรที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นบนจากการปั่นเหวี่ยงไปทำการตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์

8.2 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

นำตัวอย่างน้ำมันที่ได้ในข้อ 8.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับเฮกเซน 50 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายมา 1 ไมโครลิตร ด้วยหลอด capillary นำไปจุดลงบนแผ่นโครมาโทกราฟี ที่ผ่านการอบด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยแบ่งเลนตามแนวกว้างให้แต่ละเลนมีระยะห่างจากกัน 1 เซนติเมตรแล้วนำแผ่นโครมาโทกราฟีไปใส่ในแท็งค์สารละลายอิ่มตัวที่ผสมด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 90 : 10 : 2 โดยปริมาตร (Samukawa และคณะ, 2000) เมื่อสารละลายดังกล่าวเคลื่อนที่เกือบเต็มแผ่นโครมาโทกราฟีจึงนำไปพ่นด้วยสารละลายผสมระหว่าง กรดซัลฟิวริกและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำการอบแผ่นโครมาโทกราฟีด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทกราฟี โดยถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันกับสารมาตรฐานก็จะขึ้นที่ระดับเดียวกันกับแถบของสารมาตรฐานนั้น ๆ หรือ พิจารณาจากค่า R_f (Retention factor) ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนระหว่างระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงจุดกึ่งกลางของแถบที่ปรากฏขึ้น ต่อระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงระยะทางที่สารละลายเคลื่องได้บนแผ่นโครมาโทกราฟี (ภาคผนวก ค)

8.3 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography:HPLC)

8.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บจากการทำปฏิกิริยาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลให้ตกออกมา แล้วเตรียมตัวอย่างโดยละลายใน เฮกเซน เพื่อทำให้เจือจาง และใส่ eicosane เป็น internal standard จากนั้นฉีดตัวอย่างในเครื่อง HPLC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

8.3.2 การเตรียมเครื่อง HPLC (Shimadzu LC-20A series, Japan)

เตรียมสาร 2 ชนิด สำหรับ mobile phase คือ สารเอ ประกอบด้วย เฮกเซน : ไอโซ-โพรพานอล : เอสทิล อะซิเตต : กรดฟอร์มิค (85 : 10 : 10 : 0.1 v/v) สารบี ประกอบด้วย เฮกเซน : กรดฟอร์มิค (100 : 0.2 v/v), อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร ต่อ นาที โดยใช้ Apollo Silica Column 5U 250×4.6 mm 5um เครื่องตรวจสอบ (detector) สำหรับ HPLC คือ ELSD