บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) รุ่น 15-A ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบแห้งแบบสูญญากาศ (Vacuum Drying Oven) รุ่น DP 41 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องกำเนิดคลื่นอุลตราโซนิค (Sonicator) รุ่น D200 บริษัท D.S.C group ประเทศไต้หวัน

เครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (Rotary Evaporator) รุ่น RE 52 บริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

อ่างเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath Shaker) บริษัท New Brunswick scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ รุ่น Elgastat UHO II บริษัท Elgastal ประเทศอังกฤษ

เครื่องระเหิดแห้ง (Freeze Dry) รุ่น Neocool บริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเซนทริฟิวจ์ (Centifuge) รุ่น Z 230 บริษัท Hermle ประเทศเยอรมัน

2. สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
เนยโกโก้	สยามโกโก้โปรดักส์ ประเทศไทย
น้ำมันปาล์ม	มรกต ประเทศไทย
กรดสเตียริก	รวมเคมี ประเทศไทย
เลซิทิน	รวมเคมี ประเทศไทย
ทวีน 80	รวมเคมี ประเทศไทย
ซีไลท์	รวมเคมี ประเทศไทย
เอธิลแอลกอฮอล์	รวมเคมี ประเทศไทย
แอนไฮดรัลโซเดียมซัลเฟต	รวมเคมี ประเทศไทย
โซลูเบิล สตาร์ท	รวมเคมี ประเทศไทย
เอนไซม์ไลโปไซม์ (Lipozyme)	Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark
เฮกเซน	Mallinckrodt, Kentuky, USA.
อะซิโตน	Mallinckrodt, Kentuky, USA.
อะซิโตไนตริล	Mallinckrodt, Kentuky, USA.
เตตราไฮโดรฟูราน	Mallinckrodt, Kentuky, USA.
เมธานอล	Mallinckrodt, Kentuky, USA.
โทลูอีน	Mallinckrodt, Kentuky, USA.
กรดอะซิติก	Mallinckrodt, Kentuky, USA.
ปิโตรเลียมอีเทอร์	Mallinckrodt, Kentuky, USA.
คลอโรฟอร์ม	J.T.Baker,Inc, Phillipsherg, NJ, USA.
โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์	Carlo Erba, Milano, Italy
เบนซิน	Carlo Erba, Milano, Italy
ไอโอดีน	Carlo Erba, Milano, Italy
คาร์บอนเตตระคลอไรด์	Carlo Erba, Milano, Italy
ฟีนอฟทาลีน	Merck, Germany
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Merck, Germany
โปแตสเซียมไอโอไดด์	Merck, Germany
โซเดียมไธโอซัลเฟต	Merck, Germany
ไดเอธิลอีเทอร์	Merck, Germany
กรดซัลฟุริก	Merck, Germany

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	Merck, Germany
1,3-ไดปาล์มมิโตอิล-2-โอลิโออิล กลีเซอรอล	SIGMA, St. Louis, MO, USA.
1,3-ไดสเตียโรอิล-2-โอลิโออิล กลีเซอรอล	SIGMA, St. Louis, MO,USA.
1-ปาล์มมิโตอิล-2-โอลิโออิล-3-สเตียโรอิล กลีเซอรอล	SIGMA, St. Louis, MO,USA.
ซิลิกา เจล 60	SIGMA, St. Louis, MO,.USA.
อะเซททิลคลอไรด์	SIGMA, St. Louis, MO,USA.
กระดาษกรอง PTFE	Sartorius, Goettingen, Germany
กระดาษกรองเบอร์ 2	Whatman,Maidstone, UK.

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การหากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปาล์ม และเนยโกโก้ โดยการเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันและวิเคราะห์ต่อด้วย GC

3.1.1 การเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์ (Methyl Ester Derivatives) ของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม เนยโกโก้และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลอง

3.1.1.1 ชั่งตัวอย่างไขมัน 1 กรัม ละลายในสารละลายเมทธานอล/โทลูอีน (3:2 v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดที่มีฝาปิด

3.1.1.2 เติม ของสารละลายอะเซททิลคลอไรด์/เมทธานอล (5:100 v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมใหม่ๆ

3.1.1.3 นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำเดือดนาน 60 นาที จากนั้นทำให้หลอดเย็น

3.1.1.4 เติมเฮกเซน ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.1.1.5 นำหลอดไปเซนติฟิวที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

3.1.1.6 นำชั้นเฮกเซนใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ส่วนที่เหลือนำไปสกัดด้วยเฮกเซน 3 ครั้งครั้งละ 5 มิลลิลิตร และนำชั้นของเฮกเซนทั้ง 3 ครั้งมารวมกันในขวดรูปชมพู่

3.1.1.7 นำชั้นของเฮกเซนที่สกัดได้ไปกรองผ่านแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตนำของเหลวที่ได้ไประเหยจนเกือบแห้งที่อุณหภูมิ 30°ซ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้ ซึ่งก็คือเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันไประเหยให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนอย่างช้าๆ

3.1.1.8 ละลายเมธิลเอสเทอร์ที่เตรียมได้ด้วยเฮกเซน โดยเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้น 1000 ppm. สารละลายที่ได้พร้อมที่จะวิเคราะห์โดยวิธี GC ได้ทันที

3.1.2 การวิเคราะห์ทาง GC

นำอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 ไปวิเคราะห์ด้วย GC โดยใช้สภาวะการทดลองดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์หากรดไขมันมาตรฐานโดยเครื่อง GC

สภาวะในการวิเคราะห์	
คอลัมน์	: DB-WAX (packed with polyethyleneglycol) ขนาด(ID) 0.324 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
การตรวจวัด	: Flame Ionization Detector
อุณหภูมิคอลัมน์	: โปรแกรมเทมเพอร์เรเจอร์ อุณหภูมิเริ่มต้น = 80°ซ เป็นเวลา 1 นาที อัตราการเพิ่ม = 80-133°ซ อัตราการเพิ่ม 5°ซ /นาที = 133-135°ซ อัตราการเพิ่ม 0.2°ซ /นาที นาน 1 นาที = 135-150°ซ อัตราการเพิ่ม 20°ซ /นาที อุณหภูมิสุดท้าย = 150°ซ
อุณหภูมิอินเจคเตอร์	: 250°ซ
อุณหภูมิดีเทคเตอร์	: 250°ซ
แก๊สตัวพาไนโตรเจน	: ความดัน 1.0 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร
ความดันไฮโดรเจน	: 0.5 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร
ความดันอากาศ	: 0.5 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปริมาณสารตัวอย่าง	: เตรียมเป็นเมธิลเอสเทอร์ ที่ความเข้มข้น 1000 ppm. ปริมาตรในการวิเคราะห์ 0.5 ไมโครลิตร

3.2. วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันปาล์มและเนยโกโก้

3.2.1 วิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน

เตรียมไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol (POP), 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-glycerol (POSt) และ 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol (StOSt) ที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. ในเตตราไฮโดรฟูราน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2 เพื่อหาค่ารีเทนชันไทม์ของไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน ทำการเตรียมสารละลายผสมที่มี POP POSt และStOSt ที่ความเข้มข้นของแต่ละไตรกลีเซอไรด์เป็น 200 มก./มล. ในเตตราไฮโดรฟูรานและทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เช่นเดิม

I 20507306

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิด โดยการวิเคราะห์ POP ที่ความเข้มข้น 10 20 และ 30 มก./มล.ในเตตราไฮโดรฟูราน ทำเช่นเดียวกันกับ POSt และ StOSt เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับค่าความเข้มข้น

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน โดยเครื่อง HPLC

สภาวะในการวิเคราะห์	
คอลัมน์	: Selectosil 5 C18 ขนาด (ID) 4.6 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร
การตรวจวัด	: Refractive index
สารละลายตัวพา	: อะซิโตน : อะซิโตไนตริล ในอัตราส่วน 63.6 : 36.4 V/V
อัตราการไหล	: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
ความดัน	: 60 บาร์
ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์	: 20 ไมโครลิตรของสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 100 มก./มล. ในเตตราไฮโดรฟูราน
เวลาในการวิเคราะห์	: 30 นาที

3.2.2 วิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันปาล์มและเนยโกโก้

ชั่งน้ำมันปาล์ม (หรือเนยโกโก้) 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลายเตตราไฮโดรฟูราน 1 มิลลิลิตร นำหลอดไปเขย่าเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายทุกหลอดมากรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ด้วยสภาวะดังตารางที่ 3.2 เปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์กับค่ารีเทนชันไทม์ของไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน

เพื่อเป็นการยืนยันว่าพีก (Peak) ที่ปรากฏในโครมาโทแกรมของน้ำมันปาล์มและเนยโกโก้เป็นตัวเดียวกับไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน จึงเติมสารละลายไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน POP POSt และ StOSt ความเข้มข้น 200 มก./มล. ในเตตราไฮโดรฟูราน ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในสารละลายน้ำมันปาล์ม(เนยโกโก้) ความเข้มข้น 100 มก./มล. ในเตตราไฮโดรฟูราน นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2

3.3. การทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน

3.3.1 การใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระ (Free Enzyme) ทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน

3.3.1.1 ใช้เอนไซม์เพียงอย่างเดียว

ทำปฏิกิริยาโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุด โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่สารต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.3 ให้ความร้อนกับสารผสมในขวดรูปชมพู่ จนกระทั่งกรดสเตียริกละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำมันปาล์มและเฮกเซน นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ทำการหยุดปฏิกิริยา ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 50°ซ. นาน 5 นาที การวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ทำโดยเตรียมสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 100 มก./มล.ในเตตราไฮโดรฟูราน นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์หาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดโดยคำนวณจากพื้นที่ใต้พีคของไตรกลีเซอไรด์นั้นๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 3.3 ปริมาณสารต่าง ๆ และเอนไซม์ไลเปสอิสระ

ชุดที่	น้ำมันปาล์ม (กรัม)	กรดสเตียริก (กรัม)	เฮกเซนที่อิ่มตัวด้วยน้ำ* (มิลลิลิตร)	เอนไซม์ % (w/w)[1]
1	1	0.7	4	0
2	1	0.7	4	10
3	1	0.7	4	30
4	1	0.7	4	50
5	1	0.7	4	70
6	1	0.7	4	100

* วิธีเตรียมในภาคผนวก ก.

[1] น้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักน้ำมันปาล์ม

3.3.1.2 เติมทวีน 80 เพื่อใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1 แต่มีการเติมสารละลายทวีน 80 ในน้ำเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร)ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพิ่มลงในทุกๆ ขวดรูปชมพู่และเพิ่มชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารละลายทวีน 80 แต่เติมน้ำบริสุทธิ์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปแทน

3.3.2.2. การตรึงเอนไซม์โดยใช้เครื่องอบแห้งแบบสูญญากาศ (Vacuum Drying Oven) (Taylor, 1991)

3.3.2.2.1 วิธีการตรึงเอนไซม์โดยเตรียมที่อุณหภูมิ 0° ซ

เติมซีไลท์ 0.25 กรัมลงในเอนไซม์ไลเปสที่แช่เย็นไว้ที่ 0°ซ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันนานประมาณ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0°ซ ด้วย Magnetic Stirrer จากนั้นเติมอะซิโตนที่แช่เย็น (4°ซ) ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร คนต่อไปอีก 30 นาที โดยคงอุณหภูมิ ไว้ที่ 0°ซ จากนั้นนำของผสมนี้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 และนำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบสูญญากาศที่ 25°ซ จนแห้ง เรียกเอนไซม์ตรึงนี้ว่า C2

3.3.2.2.2 วิธีการตรึงเอนไซม์โดยเตรียมที่อุณหภูมิห้อง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.2.1 แต่คนส่วนผสมที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำการตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่แช่เย็น (4°ซ) โดยวิธีการเช่นเดิม เอนไซม์ตรึงที่ได้นี้เรียกว่า C3

3.3.2.2.3 วิธีทดลองทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน

(1) ใช้เอนไซม์ตรึงที่เตรียมที่อุณหภูมิ 0°ซ (C2)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1.2แต่เปลี่ยนมาใช้เอนไซม์ตรึง C2 แทน C1

(2) ใช้เอนไซม์ตรึงที่เตรียมที่อุณหภูมิห้อง(C3)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.1.2แต่เปลี่ยนมาใช้เอนไซม์ตรึง C3 แทน C1

(3) ทำการแปรผันปริมาณเอนไซม์ตรึง

แบ่งการทดลองออกเป็น 11 ชุด โดยใช้ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่สารต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.5 ให้ความร้อนกับสารผสมในขวดรูปชมพู่จนกระทั่งกรดสเตียริกละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำมันปาล์มและเฮกเซน นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอนไซม์ตรึงออกไปด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาสัดส่วนของไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ โดยวิธี HPLC โดยแบ่งสารผลิตภัณฑ์มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 100 มก./มล. ในเตตราไฮโดรฟูราน นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2 คำนวณหาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีคของไตรกลีเซอไรด์นั้นๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.3.2 การใช้เอนไซม์ตรึง

3.3.2.1 การตรึงเอนไซม์โดยการระเหิดแห้ง (Freeze Dry)

3.3.2.1.1 วิธีการตรึงเอนไซม์ (Mojovic และคณะ, 1993)

ชั่งเอนไซม์ไลเปส 0.5 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (การเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แสดงในภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมซีไลท์ 0.25 กรัม ผสมให้เข้ากัน นำไปทำให้แห้งโดยวิธีระเหิดแห้ง เรียกเอนไซม์ตรึงนี้ว่า C1

3.3.2.1.2 วิธีทดลองทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน

แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด โดยใช้ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่สารต่าง ๆดังตารางที่ 3.4 ให้ความร้อนกับสารผสมในขวดรูปชมพู่ จนกระทั่งกรดสเตียริกละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำมันปาล์มและเฮกเซน นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอนไซม์ตรึงออกไปด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาสัดส่วนของไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี HPLC โดยแบ่งสารผลิตภัณฑ์มาเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้น 100 มก./มล. ในเตตราไฮโดรฟูราน นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2 คำนวณหาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีคของไตรกลีเซอไรด์นั้น ๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 3.4 ปริมาณสารต่าง ๆ และเอนไซม์ตรึงเมื่อมีการเติมเลซิทิน

ชุดที่	น้ำมันปาล์ม (กรัม)	กรดสเตียริก (กรัม)	เฮกเซนที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (มิลลิลิตร)	เลซิทิน % (w/w)[1]	เอนไซม์ C1 % (w/w)[2]
1	1	0.7	4	20	0
2	1	0.7	4	20	10
3	1	0.7	4	0	0
4	1	0.7	4	0	10

[1] น้ำหนักเลซิทินต่อน้ำหนักน้ำมันปาล์ม

[2] น้ำหนักเอนไซม์ตรึงต่อน้ำหนักน้ำมันปาล์ม

ตารางที่ 3.5 ปริมาณสารต่าง ๆ และปริมาณเอนไซม์ตรึงที่ใช้ในการทดลอง

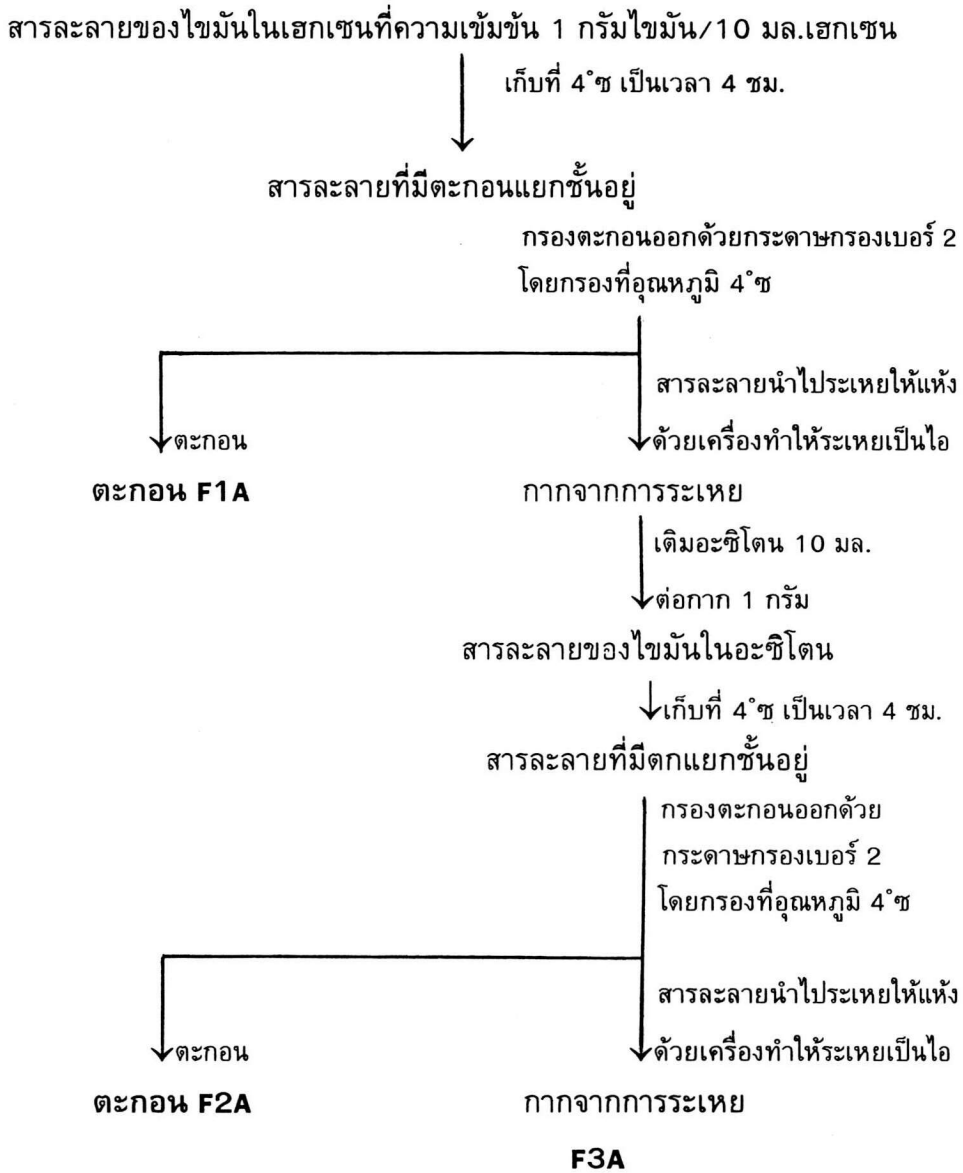
ชุดที่	น้ำมันปาล์ม (กรัม)	กรดสเตียริก (กรัม)	เฮกเซนที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (มิลลิลิตร)	เอนไซม์ C2 %(w/w)[1]	เอนไซม์ C3 %(w/w)[1]
1	1	0.7	4	0	0
2	1	0.7	4	10	0
3	1	0.7	4	30	0
4	1	0.7	4	40	0
5	1	0.7	4	50	0
6	1	0.7	4	80	0
7	1	0.7	4	0	10
8	1	0.7	4	0	30
9	1	0.7	4	0	40
10	1	0.7	4	0	50
11	1	0.7	4	0	80

[1] น้ำหนักเอนไซม์ตรึงต่อน้ำหนักน้ำมันปาล์ม

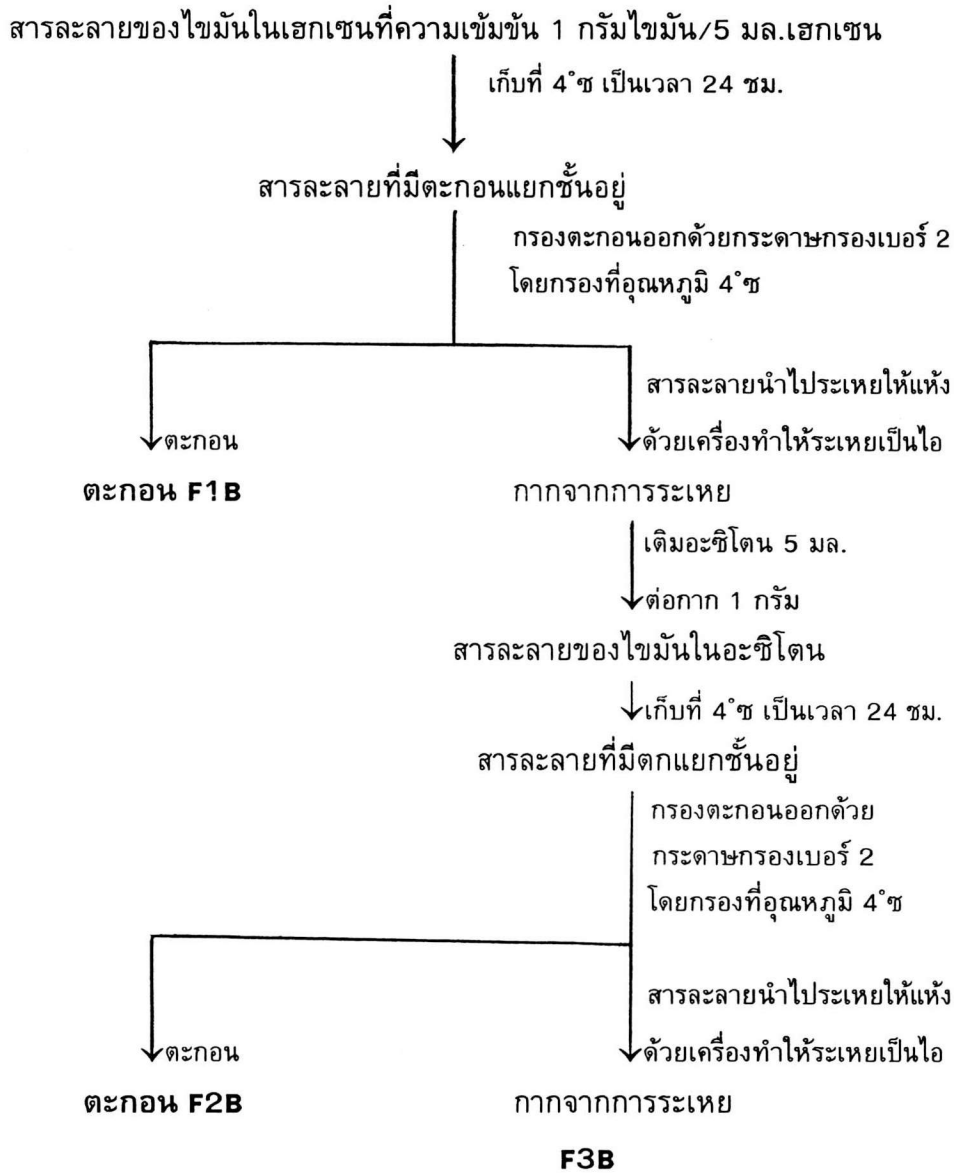
3.4. การแยกส่วนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยามาทำการตกตะกอน (Chang และคณะ, 1992 ; Chang และคณะ, 1990)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลอง 3.3.2.2.3(3) ที่ให้เปอร์เซ็นต์ไตรกลีเซอไรด์ POSt สูงสุดมาทำการทดลอง โดยทำการตกตะกอนด้วยสารละลายตามวิธี A B C และ D ตามกรรมวิธีต่อไปนี้

วิธีตกตะกอน A


สารละลายของไขมันในเฮกเซนที่ความเข้มข้น 1 กรัมไขมัน/10 มล.เฮกเซน
เก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 ชม.
สารละลายที่มีตะกอนแยกชั้นอยู่
กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2
โดยกรองที่อุณหภูมิ 4°ซ
สารละลายนำไประเหยให้แห้ง
ด้วยเครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ
ตะกอน
ตะกอน F1A
กากจากการระเหย
เติมอะซิโตน 10 มล.
ต่อกาก 1 กรัม
สารละลายของไขมันในอะซิโตน
เก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 ชม.
สารละลายที่มีตกแยกชั้นอยู่
กรองตะกอนออกด้วย
กระดาษกรองเบอร์ 2
โดยกรองที่อุณหภูมิ 4°ซ
สารละลายนำไประเหยให้แห้ง
ด้วยเครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ
ตะกอน
ตะกอน F2A
กากจากการระเหย
F3A

วิธีตกตะกอน B


สารละลายของไขมันในเฮกเซนที่ความเข้มข้น 1 กรัมไขมัน/5 มล.เฮกเซน
เก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชม.
สารละลายที่มีตะกอนแยกชั้นอยู่
กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2
โดยกรองที่อุณหภูมิ 4°ซ
ตะกอน
ตะกอน F1B
สารละลายนำไประเหยให้แห้ง
ด้วยเครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ
กากจากการระเหย
เติมอะซิโตน 5 มล.
ต่อกาก 1 กรัม
สารละลายของไขมันในอะซิโตน
เก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชม.
สารละลายที่มีตกแยกชั้นอยู่
กรองตะกอนออกด้วย
กระดาษกรองเบอร์ 2
โดยกรองที่อุณหภูมิ 4°ซ
ตะกอน
ตะกอน F2B
สารละลายนำไประเหยให้แห้ง
ด้วยเครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ
กากจากการระเหย
F3B

วิธีตกตะกอน C

สารละลายของไขมันในอะซิโตนที่ความเข้มข้น 1 กรัมไขมัน/5 มล.อะซิโตน

เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม.

↓

สารละลายที่มีตะกอนแยกชั้นอยู่

กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2
โดยกรองที่อุณหภูมิ 4°ซ

↓ ตะกอน

ตะกอน F1C

สารละลายนำไป
เก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชม.
กรองตะกอนออกด้วย
↓ กระดาษกรองเบอร์ 2

ตะกอน F2C

↓ สารละลายนำไประเหยให้แห้ง
ด้วยเครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ

ตะกอน F3C

วิธีตกตะกอน D

สารละลายของไขมันในอะซิโตนที่ความเข้มข้น 1 กรัมไขมัน/อะซิโตน 10 มล.

เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม.

↓

สารละลายที่มีตะกอนแยกชั้นอยู่

กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2
โดยกรองที่อุณหภูมิห้อง

↓ ตะกอน

ตะกอน F1D

สารละลายนำไป
เก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 ชม.
กรองตะกอนออกด้วย
↓ กระดาษกรองเบอร์ 2

ตะกอน F2D

นำตะกอน F1A F2A F3A F1B F2B F3B F1C F2C F3C F1D และ F2D มาเตรียมเป็นสารละลายให้มีความเข้มข้น 100 มก./มล.ในเตตราไฮโดรฟูราน นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์หาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆด้วยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2 คำนวณหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีคของไตรกลีเซอไรด์นั้นๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.5. ทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน โดยแปรผันปริมาณกรดสเตียริก

แบ่งการทดลองออกเป็น 11 ชุด โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตรใส่สารต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.6 ให้ความร้อนกับสารผสมในขวดรูปชมพู่จนกระทั่งกรดสเตียริกละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำมันปาล์มและเฮกเซน นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอนไซม์ตรึงออกไปด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ โดย วิธี HPLC โดยแบ่งสารผลิตภัณฑ์มาทำให้มีความเข้มข้น 100 มก./มล. ในเตตราไฮโดรฟูราน นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2 คำนวณหาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีคของไตรกลีเซอไรด์นั้นๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 3.6 ปริมาณสารต่าง ๆ และเอนไซม์ตรึง เมื่อแปรผันปริมาณกรดสเตียริก

ชุดที่	น้ำมันปาล์ม (กรัม)	กรดสเตียริก (กรัม)	เฮกเซนที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (มิลลิลิตร)	เอนไซม์ตรึงC3 %(w/w)[1]
1	1	0	4	30
2	1	0.3	4	30
3	1	0.5	4	30
4	1	0.7	4	30
5	1	0.9	4	30
6	1	1.0	4	30
7	1	1.2	4	30
8	1	1.5	4	30
9	1	1.7	4	30
10	1	1.9	4	30
11	1	2.0	4	30

[1] น้ำหนักเอนไซม์ตรึงต่อน้ำหนักน้ำมันปาล์ม

3.6. ทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยแปรผันอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา

แบ่งการทดลองออกเป็น 12 ชุด โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่สารต่างๆ ดังตารางที่ 3.7 ให้ความร้อนกับสารผสมในขวดรูปชมพู่จนกระทั่งกรดสเตียริกละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำมันปาล์มและเฮกเซน นำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชม. จากนั้นกรองเอนไซม์ตรึงออกไปด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ โดยวิธี HPLC โดยแบ่งสารผลิตภัณฑ์มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 100 มก./มล.ในเตตราไฮโดรฟูราน นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2 คำนวณหาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีคของไตรกลีเซอไรด์นั้นๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 3.7 ปริมาณสารต่าง ๆ และเอนไซม์ตรึง เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา

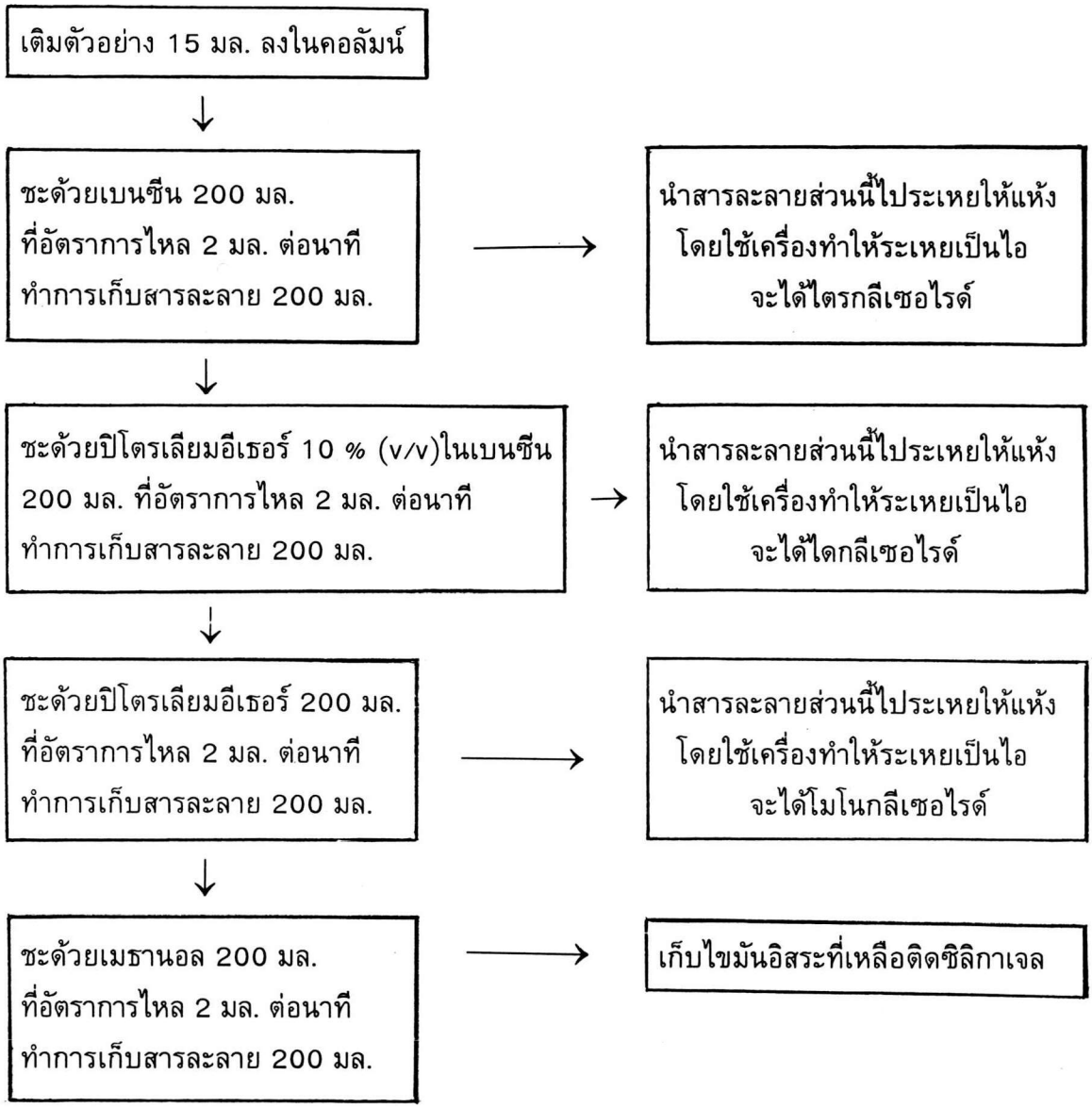
ชุดที่	น้ำมันปาล์ม (กรัม)	กรดสเตียริก (กรัม)	เฮกเซนที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (มิลลิลิตร)	เอนไซม์ตรึง C3 %(w/w)[1]	อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (°ซ)
1	1	1.5	4	0	30
2	1	1.5	4	30	30
3	1	1.5	4	0	50
4	1	1.5	4	30	50
5	1	1.5	4	0	60
6	1	1.5	4	30	60
7	1	1.5	4	0	70
8	1	1.5	4	30	70
9	1	1.5	4	0	75
10	1	1.5	4	30	75
11	1	1.5	4	0	80
12	1	1.5	4	30	80

[1] น้ำหนักเอนไซม์ตรึงต่อน้ำหนักน้ำมันปาล์ม

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ไปผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล (Quinlin., 1958) เพื่อกำจัดกรดไขมันอิสระออก โดยทำการทดลองดังต่อไปนี้

<u>วิธีเตรียมคอลัมน์ซิลิกาเจล</u> : ชั่งซิลิกาเจล 60 30 กรัม เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วคน เพื่อไล่ฟองอากาศออก นำของผสมนี้ไปบรรจุลงคอลัมน์ (ยาว 75 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 ซม. โดยจะได้ความสูงของซิลิกาหลังบรรจุประมาณ 30 ซม.)

<u>วิธีเตรียมตัวอย่าง</u> : ชั่งไขมัน 1 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม15 มิลลิลิตร



นำซิลิกาเจลที่มีไขมันติดอยู่มาล้างด้วยด่าง (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก จ)

นำไขมันส่วนไตรกลีเซอไรด์ไปวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง DSC (Differential Scanning Calorimetry) และวิเคราะห์หาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ โดยวิธี HPLC เพื่อดูว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิใดให้จุดหลอมเหลวใกล้เคียงเนยโกโก้ที่สุด แล้วนำอุณหภูมินั้นไปทำการทดลองต่อไปในหัวข้อ 3.7

3.7. ทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยการแปรผันระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

แบ่งการทดลองออกเป็น 16 ชุด โดยใช้ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่สารต่างๆ ดังตารางที่ 3.8 ให้ความร้อนจนกรดสเตียริกละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำมันปาล์มและเฮกเซน นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70° ซ (อุณหภูมินี้ได้จากการทดลองที่ 3.6) เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นกรองเอนไซม์ตรึงออกไปด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ โดยวิธี HPLC โดยแบ่งสารผลิตภัณฑ์มาเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้น 100 มก./มล.ในเตตราไฮโดรฟูราน นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3.2 คำนวณหาสัดส่วนไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีคของไตรกลีเซอไรด์นั้นๆ ผลิตภัณฑ์ที่ให้สัดส่วนไตรกลีเซอไรด์ POSt ใกล้เคียงกับเนยโกโก้ จะนำไปผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจลก่อนนำไปหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง DSC

ตารางที่ 3.8 ปริมาณสารต่าง ๆ เอนไซม์ตรึงและอุณหภูมิ เมื่อแปรผันระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

ชุดที่	น้ำมันปาล์ม (กรัม)	กรดสเตียริก (กรัม)	เฮกเซนที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (มิลลิลิตร)	เอนไซม์ตรึงC3 %(w/w)[1]	ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (ชม.)
1	1	1.5	4	0	5
2	1	1.5	4	30	5
3	1	1.5	4	0	10
4	1	1.5	4	30	10
5	1	1.5	4	0	15
6	1	1.5	4	30	15
7	1	1.5	4	0	23
8	1	1.5	4	30	23
9	1	1.5	4	0	25
10	1	1.5	4	30	25
11	1	1.5	4	0	30
12	1	1.5	4	30	30
13	1	1.5	4	0	35
14	1	1.5	4	30	35
15	1	1.5	4	0	40
16	1	1.5	4	30	40

[1] น้ำหนักเอนไซม์ตรึงต่อน้ำหนักน้ำมันปาล์ม

3.8 การหาค่าคงที่ต่างๆ ของไขมัน

3.8.1 การหาค่าความเป็นกรด (Acid Value)

ชั่งไขมัน 2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอธานอลที่ร้อน 200 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปอุ่นบนอ่างน้ำร้อน นำสารละลายที่ได้ขณะร้อนมาไตเตรทกับสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

$$\text{ค่าความเป็นกรด} = \frac{\text{จำนวนมิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้}}{\text{จำนวนกรัมของกรดไขมัน}}$$

3.8.2 การหาค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide Value)

ชั่งไขมัน 3 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (ทำ 2 ขวดผลต่างของไขมันที่ชั่งได้ไม่ควรเกิน 0.1 มิลลิกรัม) เติมสารละลายกรดอะซิติก:คลอโรฟอร์ม (3:2) 30 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากันเติมสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันประมาณ 1 นาที เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเข้มข้น 0.01 โมลาร์ โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ไตเตรทจนกระทั่งสีน้ำเงินของสารละลายจางหายไปเป็นไม่มีสี ทำชุดควบคุมโดยไม่ต้องใช้น้ำมัน สารละลายควบคุมนี้ควรใช้สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตไม่ควรเกิน 0.1 มิลลิลิตร

$$\text{ค่าเปอร์ออกไซด์} = \frac{(V_S - V_B) \times M \times 1000}{W}$$

โดยกำหนดให้ V_S คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับไขมัน (มิลลิลิตร)

V_B คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรทกับชุดควบคุม (มิลลิลิตร)

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (โมลาร์)

W คือ น้ำหนักของไขมัน (กรัม)

3.8.3 การหาค่าสปอนนิฟิเค่ชัน (Saponification Value)

ชั่งน้ำมัน 2 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเศษกระเบื้องเล็กน้อย เติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ 25 มิลลิลิตร (ทำชุดควบคุมโดยไม่ต้องใส่ไขมัน) นำขวดก้นกลมไปรีฟลักซ์นาน 30 นาที นำสารละลายที่ได้ขณะร้อนไปไตเตรทแบบย้อนกลับ ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ (ไตเตรทโดยเร็ว) ความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมและขวดสารตัวอย่าง คือ ผลรวมของสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ถูกดูดซับโดยไขมัน

$$\text{ค่าสปอนนิฟิเคชัน} = \frac{\text{จำนวนมิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ถูกดูดซับโดยไขมัน}}{\text{น้ำหนักของสารตัวอย่าง}}$$

3.8.4 การหาค่าที่ไม่สปอนนิไฟน์ (Unsaponifiable Matter)

ชั่งไขมันประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเศษกระเบื้องเล็กน้อย เติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอธานอลเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 25 มิลลิลิตร นำขวดก้นกลมไปรีฟลักซ์นาน 30 นาที เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรลงในขวดทำการสกัดสารละลายที่ได้ด้วยไดเอธิลอีเธอร์ 3 ครั้ง โดยใช้ปริมาตร 100 50 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วจึงนำชั้นไดเอทิลอีเทอร์ที่ได้มารวมกัน นำชั้นไดเอทิลอีเทอร์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งจนกระทั่งชั้นไดเอทิลอีเทอร์เป็นกลาง (ตรวจสอบด้วยฟีนอฟทาลีน) นำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยก๊าซไนโตรเจน ชั่งกากที่เหลือเพื่อนำมาคำนวณค่าที่ไม่สปอนนิไฟน์

$$\text{ค่าที่ไม่สปอนนิไฟน์} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่เหลือ} \times 100}{\text{น้ำหนักของไขมันที่ใช้}}$$

3.8.5 การหาค่าไอโอดีน (Iodine Value)

ชั่งไขมันประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมคาร์บอนเตตระคลอไรด์ 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายวิจส์รีเอเจ้นท์ 25 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ นำสารละลายไปเก็บไว้ในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง เติม 10 % ของสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ 20 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำมาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 โมลาร์ โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ ทำชุดควบคุมเปรียบเทียบ

$$\text{ค่าไอโอดีน} = \frac{12.69 \times M \times (V_1 - V_2)}{m}$$

โดยกำหนดให้ M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (โมลาร์)

m คือ น้ำหนักของไขมัน (กรัม)

V_1 คือ ปริมาตรที่ใช้ของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตในชุดควบคุม

V_2 คือ ปริมาตรที่ใช้ของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตในขวดทดสอบ

3.9. การนำเอนไซม์ตรึงที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่

3.9.1 เอนไซม์ที่ใช้แล้วจากการทดลองการแปรผันอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (ในหัวข้อที่ 3.6)

3.9.1.1 การทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ตรึงที่ใช้ไปในการทดลองที่ 3.6 กลับมาใช้ใหม่ครั้งที่ 1

วิธีการทดลองทำเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.6 แต่เปลี่ยนเอนไซม์เป็นเอนไซม์ตรึงที่ใช้แล้วจากข้อ 3.6

3.9.1.2 การทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ตรึงที่ได้จากหัวข้อ 3.9.1.1 กลับมาใช้ใหม่อีก 1 ครั้ง

วิธีทดลองทำเช่นเดียวกับข้อ 3.9.1 และใช้เอนไซม์ตรึงที่ใช้แล้วจากข้อ 3.9.1.1

3.9.2 เอนไซม์ที่ใช้แล้วจากการทดลองการแปรผันระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (ในหัวข้อที่ 3.7)

3.9.3.1การทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ตรึงที่ใช้ไปในการทดลองที่ 3.7 กลับมาใช้ใหม่ครั้งที่ 1

วิธีทดลองทำเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.7 แต่เอนไซม์เป็นเอนไซม์ตรึงที่ใช้แล้วจากข้อ 3.7

3.9.2.2 การทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ตรึงที่ได้จากหัวข้อ 3.9.3.1 กลับมาใช้ใหม่อีก 1 ครั้ง

วิธีทดลองทำเช่นเดียวกับข้อ 3.9.3.1และใช้เอนไซม์ตรึงที่ใช้แล้วจากข้อ 3.9.3.1