

## บทที่ 2

## วิธีการทดลอง

## 2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง GC-14A

เครื่อง shaker / water bath

Hot plate

Stirrer

## บริษัทที่ผลิต

Shimazu

Heto

Heidolph

Heidolph

## 2.2 สารเคมี

Acetone

Borontrifluoride 14% in methanol

Chloroform

Citric acid

Dodecyltrimethylammonium bromide

Ethanol

Hexane

Hydrochloric acid conc.

Magnesium sulfate anh.

Methanol

Potassium hydrogen phthalate

Sodium chloride

Sodium dodecyl benzenesulfonate

Sodium dodecyl sulfate

Sodium hydroxide

Sodium sulfate anh.

Tetraethylammonium chloride

## บริษัทที่ผลิต

-

Merck

-

BDH

Aldrich

-

Merck

BDH

-

-

Fluka

Merck

Fluka

Fluka

AKZO Nobel

Carlo ERBA reagent

Fluka

## 2.3 จุลินทรีย์และเอนไซม์

2.3.1 เชื้อ *Aspergillus* sp. (หน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2.3.2 เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* (บริษัท Fluka)

## 2.4 วัตถุดิบ

2.4.1 น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด

2.4.2 กากมัสตาร์ด

## 2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 การแยกและวิเคราะห์กรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส

2.5.1.1 ผลของช่วงเวลาในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบส

### 1. วิธีการเตรียมสารละลาย

ก. สารละลาย 20% โซเดียมไฮดรอกไซด์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลายอิมัลชันโซเดียมคลอไรด์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนจนเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่ละลายนำสารละลายใสมาใช้

2. ขั้นตอนการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบสในช่วงเวลาต่าง ๆ

ชั่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ แต่ละใบเติมสารละลาย 20% โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเอทานอล 95% 50 มิลลิลิตรลงไป นำไปให้ความร้อนในหม้อน้ำต้มเดือดจนได้อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นกวนตลอดเวลาเป็นเวลา 30 60 และ 90 นาที ตามลำดับ หลัง

จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตรลงไปและกวนจนกระทั่งสารละลายเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น แยกชั้นกรดไขมันชั้นบนออกโดยเติมเฮกเซน 100 มิลลิลิตรและแยกด้วยกรวยแยก เขย่านาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลายอิมัลชันโซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้งๆละ 50 มิลลิลิตร และกำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ระเหยเฮกเซนออกได้กรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสที่เวลาต่างๆ กันแล้วนำไปเตรียมอนุพันธ์กรดไขมันเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแก๊ส

### 3. ขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยวิธีเมทิลเลชัน (methylation)

ชั่งกรดไขมันผสมที่เตรียมได้จากหัวข้อ 2 0.3 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 95% เมทานอล 10 มิลลิลิตรลงไปเพื่อละลายกรดไขมัน จากนั้นนำไปต้มให้ความร้อนเป็นเวลานาน 5 นาที และเติมสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ 14% ในเมทานอล 5 มิลลิลิตร และนำไปต้มให้ความร้อนเป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นสกัดเมทิลเอสเทอร์ที่ได้โดยเติมสารละลายอิมัลชันโซเดียมคลอไรด์ 30 มิลลิลิตร และเฮกเซน 30 มิลลิลิตร ลงไปตามลำดับโดยใช้กรวยแยก และแยกเอาชั้นเฮกเซนออก กำจัดน้ำด้วยสารละลายอิมัลชันโซเดียมคลอไรด์ 2 ครั้งๆ ละ 30 มิลลิลิตรและเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 1-3 กรัม จากนั้นระเหยเฮกเซนออกจนเหลือปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันประมาณ 3 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแก๊ส

### 4. การหาปริมาณของกรดไขมันด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแก๊ส (Gas chromatography)

ฉีดสารละลายเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในเฮกเซนที่เตรียมได้จากขบวนการเมทิลเลชัน ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เข้าเครื่องโครมาโตกราฟีแก๊ส Shimadzu GC-14A ที่มีดีเทคเตอร์ (detector) ชนิด FID (Flame Ionization Detector) โดยมีก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา ภายใต้ความดัน 0.5 kg/cm<sup>2</sup> และดีเทคเตอร์ถูกจุดด้วยก๊าซไฮโดรเจนและอากาศภายใต้ความดัน 0.6 และ 0.5 kg/cm<sup>2</sup> ตามลำดับ โดยคอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิดคาร์บอแวกซ์ (Carbowax) ความยาว 50 เมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ 220 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ 280 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของอินเจคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส อินทิเกรเตอร์ตั้งอัตราเร็วของกระดาษ 5 มิลลิเมตรต่อนาที และตั้งแอมเพนนูเอเตอร์ 1 ปริมาณของกรดไขมันหาได้โดยเทียบพื้นที่ใต้พีคกับสารละลายมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมาตรฐานผสมและรายงานในหน่วยกรัม

ของกรดไขมันแต่ละชนิดเทียบกับปริมาณไขมัน 100 กรัม และเทียบกับปริมาณของกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด 100 กรัม (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ผ.1)

#### 5. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันด้วยวิธีการไทเทรต

##### ก. วิธีการเตรียมสารละลาย

ก.1 ตัวทำละลายผสมเอทานอลกับไดเอทิลอีเทอร์ ในอัตราส่วน 1: 1

เอทานอล 50 มิลลิลิตรผสมไดเอทิลอีเทอร์ 50 มิลลิลิตร และเก็บในขวดขนาด 100 มิลลิลิตร

ก.2 สารละลายฟีนอล์ฟธาลีนเข้มข้น 0.5 % (w/w)

ละลายฟีนอล์ฟธาลีน 0.50 กรัมใน 95% เอทานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ก.3 สารละลายโบแตสเซียมไฮโดรเจนฟาทาเลตเข้มข้น 0.500 โมลาร์

ละลายโบแตสเซียมไฮโดรเจนฟาทาเลต 10.2110 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ก.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 70%

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 2 กรัมละลายในเอทานอล 70% ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วหาความเข้มข้นที่แน่นอน โดยปิเปตสารละลาย 15 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาลีน 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลายโบแตสเซียมไฮโดรเจนฟาทาเลตเข้มข้น 0.5000 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสีบันทึกปริมาตรของสารละลายโบแตสเซียมไฮโดรเจนฟาทาเลตที่ใช้ แล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

##### ข. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันโดยการไทเทรต

ชั่งกรดไขมันที่เตรียมได้จากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายผสมเอทานอล 95% และไดเอทิลอีเทอร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1: 1 นำของผสมของกรดไขมันในสารละลายเอทานอลและไดเอทิลอีเทอร์ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ในเอทานอล 70% จุดยุติสังเกตจากการเปลี่ยนสีเหลืองเป็นสีแดงชมพูอย่างน้อย 30 วินาทีก่อนจางหายไป ปริมาณกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้รายงานเป็นหน่วยกรัมของกรดไขมันอิสระต่อ 100 กรัมของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ผ.2)

### 2.5.1.2 ผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาเมธิลเลชันกรดไขมัน

ซึ่งกรดสเตียริก ( stearic acid) 0.10 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรเติมสารละลาย 95% เมธานอล 10 มิลลิลิตรลงไปเพื่อละลายกรดไขมัน จากนั้นนำไปต้มให้ความร้อนเป็นเวลานาน 5 นาที และเติมสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ 14% ในเมธานอล 5 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนเป็นเวลา 5 , 10 , 15 , 20 และ 25 นาที ตามลำดับ จากนั้นสกัดเมธิลเอสเทอร์ที่ได้โดยเติมสารละลายอิมตัวไซเตียมคลอไรด์ 30 มิลลิลิตร และเฮกเซน 30 มิลลิลิตรลงไปตามลำดับโดยใช้กรวยแยกเขย่านาน 5 นาที และแยกเอาชั้นเฮกเซนออก ตามด้วยการกำจัดน้ำด้วยสารละลายอิมตัวไซเตียมคลอไรด์ 2 ครั้งและไซเตียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 1-3 กรัม ในขั้นตอนสุดท้ายให้ระเหยเฮกเซนออกจนเหลือปริมาณของเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันประมาณ 3 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส

### 2.5.1.3 การแยกกรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมันฝรั่งโดยการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสในสภาวะที่เหมาะสม

ซึ่งน้ำมันเมล็ดมันฝรั่ง 5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 20% ไซเตียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเอทานอล 95% 50 มิลลิลิตรลงไป นำไปให้ความร้อนด้วยหม้อน้ำต้มเดือดจนได้อุณหภูมิ 70-90 °C และกวนตลอดเวลานาน 60 นาที หลังจากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตรลงไปและกวนจนกระทั่งเกิดการแยกชั้น 2 ชั้น จากนั้นเติมเฮกเซน 100 มิลลิลิตรเพื่อสกัดเอชเอ็นที่มีกรดไขมันผสมออกมาและกำจัดน้ำด้วยสารละลายอิมตัวไซเตียมคลอไรด์ 2 ครั้งละ 30 มิลลิลิตร และไซเตียมซัลเฟตแอนไฮดรัส จากนั้นระเหยเฮกเซนออก จะได้กรดไขมันผสมที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสในเวลาที่เหมาะสม นำไปเตรียมอนุพันธ์กรดไขมันด้วยวิธีเมธิลเลชันโดยทำปฏิกิริยากับสารโบรอนไตรฟลูออไรด์ดังแสดงในข้อ 2.5.1.1(3) โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเมธิลเลชันนาน 15 นาที จะได้เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันประมาณ 3 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊สโดยใช้สภาวะเดียวกันกับข้อ 2.5.1.1(4) และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระจากการย่อยสลายด้วยวิธีการไทเทรต โดยทำการวิเคราะห์แบบเดียวกับข้อ 2.5.1.1(5)

## 2.5.2 การแยกกรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปส

### 2.5.2.1 การใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa*

#### 1. ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

ก. สารละลายเอนไซม์ไลเปส 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* 0.10 กรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลายผสมเอทานอลกับอะซิโตน (อัตราส่วน 1:1)

ผสมเอทานอล 500 มิลลิลิตรและอะซิโตน 500 มิลลิลิตรเข้าด้วยกันและเก็บไว้ในขวดเก็บสารละลาย

#### 2. ขั้นตอนการย่อยสลายน้ำมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa*

ซึ่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรและสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* 2 มิลลิลิตร (0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร มีแอกติวิตี 50 ยูนิต) จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง และทำการสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม (chloroform) กับน้ำ (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยใช้กรวยแยก จากนั้นเก็บชั้นคลอโรฟอร์มไว้ส่วนชั้นน้ำทิ้งไปและกำจัดน้ำด้วยเมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัสและกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วทำการระเหยคลอโรฟอร์มออก จะได้กรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระจากการย่อยสลายด้วยวิธีการไทเทรต โดยทำการวิเคราะห์แบบเดียวกับข้อ 2.5.1.1(5)

#### 3. ขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์และหาปริมาณโดยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส

นำกรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* มาเตรียมเป็นเมธิลเอสเทอร์โดยผ่านกระบวนการเมธิลเลชันเหมือนข้อ 2.5.1.1(3) ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันกับเมทานอลโดยมีสารโบรอนไตรฟลูออไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในช่วงเวลาที่เหมาะสม จะได้เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส โดยคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ คาร์บอแว็กซ์ ความยาว 50 เมตร โดยปริมาณที่ใช้ในการวิเคราะห์ 0.5 ไมโครลิตร และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เหมือนกับข้อ 2.5.1.1(4)

### 2.5.2.2 การใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp.

#### 1. การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ในอาหารเหลว

##### ก. กรรมวิธีในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp.

##### ก.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.0

ซึ่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.7650 กรัม และ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  17.2174 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเกือบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ด้วยสารละลาย 6.0 M HCl หรือ 6.0 M NaOH จน pH เท่ากับ 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

##### ก.2 ขั้นตอนการเตรียม preculture ของเชื้อ *Aspergillus* sp.

ทำการเชื้อเชื้อ *Aspergillus* sp. (จากหน่วยบริการเชื้อพันธุจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) ลงบนวุ้นเอียง (slant) ที่เตรียมไว้แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตรลงไป และเขย่าจนสปอร์ของเชื้อหลุดออกมา แล้วนำไปนับด้วย counting chamber (haemocytometer) โดยให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้นในการถ่ายเชื้อเท่ากับ  $10^7$  สปอร์ต่อ 10 กรัมของอาหารแข็ง

##### ก.3 การสกัดสารสกัดจากกากมันสตาร์ด

ซึ่งกากมันสตาร์ด 100 กรัม ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลานาน 20 นาที (เพื่อทำลายเอนไซม์ myrosinase และอื่นๆ) จากนั้นเติมน้ำเดือด 800 มิลลิลิตร และทำการคนด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาทีโดยใช้เครื่องกวน เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางและบีบน้ำออกจนหมด และนำไปปั่นด้วยเครื่องเซนติฟิวส์ความเร็ว 8000 g 15 นาที ทำการปั่นที่กปริมาตรทั้งหมดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

##### ก.4 การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. ในอาหารเหลวกากมันสตาร์ด

ปิเปตสารสกัดจากกากมันสตาร์ด 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) แล้วปล่อยให้เย็น จากนั้นถ่ายเชื้อความเข้มข้น  $10^7$  สปอร์ ลงไปในสารผสม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $31 \pm 1^\circ\text{C}$  และเขย่าด้วยความแรง 140 รอบต่อนาทีโดยใช้

เครื่องเขย่า (shaker / waterbath) และเก็บน้ำเลี้ยงทุก 12 ชั่วโมงโดยเริ่มเก็บในเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วนำสารละลายที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปกรองผ่าน celite -545 suction จากนั้นนำไปหาค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

## ข. การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp.

### ข.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 M pH 7.0  
ซึ่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.7650 กรัม และ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  17.2174 กรัม  
ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเกือบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ด้วยสารละลาย 6.0 M HCl หรือ 6.0 M NaOH จน pH เท่ากับ 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร
2. สารละลายผสมอะซิโตนและเอทานอลอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร  
ผสมอะซิโตน 500 มิลลิลิตรและเอทานอล 500 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน
3. สารละลายฟีนอล์ฟธาเลอินเข้มข้น 0.5 % (w/w)  
ละลายฟีนอล์ฟธาเลอิน 0.50 กรัมใน 95% เอทานอล ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟาทาเลตเข้มข้น 0.0500 โมลาร์  
ละลายโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟาทาเลต 1.0211 กรัมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์  
ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 2 กรัมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วหาความเข้มข้นที่แน่นอน โดยปิเปตสารละลาย 15 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาเลอิน 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลายโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟาทาเลตเข้มข้น 0.0500 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสีบันทึกปริมาตรของสารละลายโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟาทาเลตที่ใช้ แล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

### ข.2 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

ซึ่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 0.5 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตรจำนวน 2 ใบ จากนั้นปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.0 4 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรลงไป โดยให้ขวดใบที่ 1 เป็น blank และขวดใบที่ 2 เติม

สารสกัดเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำขวดทั้งสองไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker / water bath) ด้วยความเร็ว 140 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 60 นาทีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายผสมเอทานอลและอะซิโตน (อัตราส่วน 1:1) 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตรลงไปในช่วงที่ 1 แล้วนำขวดทั้งสองไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์โดยมีฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ วัดปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แล้วคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยไลเปสคือ ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถย่อยสลายไขมันให้ได้กรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

## 2. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ

*Aspergillus sp.*

### ก. ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ

*Aspergillus sp.*

ชั่งน้ำมันเมล็ดมันฝรั่ง 0.5 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 5.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ลงไป เติมสารสกัดเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 25, 37, 42, 50, 60 และ 70 ตามลำดับ และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 140 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายผสมเอทานอลและอะซิโตน (อัตราส่วน 1:1) 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ บันทึกปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เพื่อคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

### ข. ผลของพีเอชต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ

*Aspergillus sp.*

ชั่งน้ำมันเมล็ดมันฝรั่ง 0.5 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ กันระหว่าง 3 - 8 (พีเอช 3-6 ใช้สารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์ และพีเอช 7-8 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ลงไป เติมสารสกัดเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 140 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายผสมเอทานอลและอะซิโตน (อัตราส่วน 1:1) 20 มิลลิลิตร แล้วนำไป

ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ บันทึกรายการสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เพื่อคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

#### ค. ผลของเวลาต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ

*Aspergillus* sp.

ชั่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 0.5 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาณ 4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ลงไป เติมสารสกัดเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าเป็นเวลาต่างๆ กัน คือ 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาทีตามลำดับ หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายผสมเอทานอลและอะซิโตน (อัตราส่วน 1:1) 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์และใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ บันทึกรายการสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เพื่อคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

#### ง. ผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสต่อการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด

ชั่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ปริมาณต่างๆ กัน คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ( มีแอกติวิตีเท่ากับ 5, 10, 15, 20 และ 25 ยูนิต ) ตามลำดับ แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์มกับน้ำ (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยใช้กรวยแยก จากนั้นเก็บชั้นคลอโรฟอร์มไว้ส่วนชั้นน้ำทิ้งไปและกำจัดน้ำด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัสและกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ทำการระเหยคลอโรฟอร์มออกจะได้กรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. จากนั้นนำไปเตรียมเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันด้วยวิธีเมทิลเลชัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส เพื่อคำนวณหาปริมาณของกรดไขมันอิสระที่ถูกย่อยสลายจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายด้วยการไทเทรต โดยทำการวิเคราะห์แบบเดียวกับข้อ 2.5.1.1 (5)

3. การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และ *Aspergillus* sp.

ก. การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa*

ชั่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรและสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* 1 มิลลิลิตร (แอกติวิตี 25 ยูนิต) จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 ชั่วโมงและทำการสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม(chloroform) กับน้ำ (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยใช้กรวยแยก จากนั้นเก็บชั้นคลอโรฟอร์มไว้ ส่วนชั้นน้ำทิ้งไปและกำจัดน้ำด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัสและกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วทำการระเหยคลอโรฟอร์มออก จะได้กรดไขมันผสมจากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* จากนั้นนำไปเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์โดยผ่านกระบวนการเมทิลเลชันโดยมีสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะได้สารละลายเมทิลเอสเทอร์กรดไขมันประมาณ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส โดยเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารละลายเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันผสมมาตรฐาน และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายด้วยการไทเทรต โดยทำการวิเคราะห์แบบเดียวกับข้อ 2.5.1.1 (5)

ข. การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp.

ชั่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรและสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp 5 มิลลิลิตร (แอกติวิตี 25 ยูนิต) และทำการย่อยสลายในสภาวะแบบเดียวกับการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ในหัวข้อ 3(ก) จะได้กรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. จากนั้นนำไปเตรียมเป็นอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์โดยผ่านกระบวนการเมทิลเลชันโดยมีสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะได้สารละลายเมทิลเอสเทอร์ประมาณ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส โดยเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารละลายเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันผสมมาตรฐาน และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายด้วยการไทเทรต โดยทำการวิเคราะห์แบบเดียวกับข้อ 2.5.1.1 (5)

### 2.5.3 การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และ *Aspergillus* sp. ร่วมกับดีเทอร์เจนต์ (detergent)

#### 2.5.3.1. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายดีเทอร์เจนต์เข้มข้น 0.04%

ก. สารละลาย sodium dodecylsulfate 0.04 %

ซึ่ง sodium dodecylsulfate 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

ข. สารละลาย sodium dodecylbenzene sulfonate 0.04 %

ซึ่ง sodium dodecylbenzene sulfonate 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

ค. สารละลาย tetraethyl ammonium chloride 0.04%

ซึ่ง tetraethyl ammonium chloride 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

ง. สารละลาย dodecyltrimethyl ammonium bromide 0.04 %

ซึ่ง dodecyltrimethyl ammonium bromide 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

#### 2.5.3.2. การย่อยน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ

*Candida rugosa* ร่วมกับดีเทอร์เจนต์

ซึ่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* 1 มิลลิลิตร (แอกติวิตี 25 ยูนิต) ลงไปทุกขวด และเติมสารละลายดีเทอร์เจนต์ sodium dodecyl sulfate , sodium dodecylbenzene sulfonate , tetraethylammonium chloride และ dodecyltrimethyl ammonium broide ลงในขวดรูปชมพู่ใบที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ จากนั้นนำขวดทั้ง 4 ใบ ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาทีและทำการสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม(chloroform) กับน้ำ (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยใช้กรวยแยก จากนั้นเก็บชั้นคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ชั้นล่างไว้ส่วนชั้นน้ำทิ้งไปและกำจัดน้ำด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัสและกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วทำการระเหยคลอโรฟอร์มออก จะได้กรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อย

สลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ร่วมกับดีเทอร์เจนต์ชนิดต่าง ๆ จากนั้นนำไปเตรียมเป็นอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์โดยผ่านกระบวนการเมธิลเลชันโดยมีสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะได้สารละลายเมธิลเอสเทอร์ประมาณ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส โดยเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารละลายเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันผสมมาตรฐาน และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายด้วยการไทเทรต โดยทำการวิเคราะห์แบบเดียวกับข้อ 2.5.1.1 (5)

#### 2.5.3.3. การย่อยน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ

*Aspergillus sp.* ร่วมกับดีเทอร์เจนต์

ซึ่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus sp.* 5 มิลลิลิตร (แอกติวิตี 25 ยูนิต ) ลงไปทุกขวด และเติมสารละลายดีเทอร์เจนต์ 0.04 % ทั้ง 4 ชนิดลงไปแต่ละขวด จากนั้นนำไปย่อยสลายในสภาวะแบบเดียวกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus sp.* จะได้กรดไขมันผสม แล้วนำไปเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์กรดไขมันโดยผ่านกระบวนการเมธิลเลชันโดยมีสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะได้สารละลายเมธิลเอสเทอร์ประมาณ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส โดยเทียบกับพื้นที่ใต้พีคของสารละลายเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันผสมมาตรฐาน และวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายด้วยการไทเทรต โดยทำการวิเคราะห์แบบเดียวกับข้อ 2.5.1.1 (5)

#### 2.5.4 การแยกกรดไขมันอิสระโดยวิธีตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ (crystallization at low temperature)

##### 2.5.4.1 การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ

*Candida rugosa* และ *Aspergillus sp.*

ซึ่งน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตรและสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida*

*rugosa* 1 มิลลิลิตร(แอกติวิตี 25 ยูนิต ) และจากเชื้อ *Aspergillus* sp. 5 มิลลิลิตร( แอกติวิตี 25 ยูนิต )ลงในขวดใบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 20 ชั่วโมงและทำการสกัดกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม (chloroform) กับน้ำ (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้กรวยแยก จากนั้นเก็บชั้นคลอโรฟอร์มไว้ส่วนชั้นน้ำทิ้งไปและกำจัดน้ำด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัสและกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วทำการระเหยคลอโรฟอร์มออก ได้กรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมันฝรั่งด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และจากเชื้อ *Aspergillus* sp.

#### 2.5.4.2 การตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำเพื่อแยกกรดไขมันโดยใช้สารละลายน้ำผสมตัวทำละลายต่างๆ

##### 1. ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

###### ก. สารละลายน้ำผสมเอทานอล

ทำการผสมน้ำกับเอทานอล ในอัตราส่วน 3:1(4.35 : 1.45 v/v) โดยเติมลงไปเท่ากับ 5.8 มิลลิลิตรต่อกรัมของกรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อย

###### ข. สารละลายน้ำผสมเมทานอล

ทำการผสมน้ำกับเมทานอล ในอัตราส่วน 8:1( 3.91: 0.49 v/v) โดยเติมลงไปเท่ากับ 4.4 มิลลิลิตรต่อกรัมของกรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อย

###### ค. สารละลายน้ำผสมอะซิโตน

ทำการผสมน้ำกับอะซิโตน ในอัตราส่วน 5:1( 4.83: 0.97 v/v) โดยเติมลงไปเท่ากับ 5.8 มิลลิลิตรต่อกรัมของกรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อย

##### 2. การตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำเพื่อแยกกรดไขมันโดยใช้สารละลายน้ำผสมตัวทำละลายต่างๆ

ซึ่งกรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตรจำนวน 3 ใบ และจากเชื้อ *Aspergillus* sp. 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ใบ โดยขวดใบที่ 1 ของทั้งสองชุด เติมเอทานอล 5 มิลลิลิตรและเติมสารละลายน้ำผสมเอทานอลลงไป 5.8 มิลลิลิตร ขวดใบที่ 2 ของทั้งสองชุด จะเติมเมทานอล 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายน้ำผสมเมทานอลลง

ไป 4.4 มิลลิลิตร และขวดใบที่ 3 ของทั้งสองชุด จะเติมอะซิโตน 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายน้ำผสมอะซิโตนลงไป 5.8 มิลลิลิตร จากนั้นนำขวดทั้งหมดไปแช่ในตู้แช่แข็งที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่  $-11^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองผลึกที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 โดยจะทำในตู้แช่แข็งตลอดเวลา แล้วทำการล้างผลึกด้วยสารละลายที่ใช้ตกผลึกด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดที่แช่ที่อุณหภูมิ  $-11$  องศาเซลเซียส 3 ครั้ง จากนั้นนำชุดผลึกออกจากกระดาษกรองแล้วนำผลึกที่ได้มาละลายด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์กรดไขมันเพื่อสามารถที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีก๊าซ