บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารโดยไลเปสจากยางมะละกอเพื่อผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซล ผู้วิจัยได้นำตัวแปรต่าง ๆ มาออกแบบวิธีการดำเนินการวิจัย ดังต่อไปนี้

1. สารเคมีที่ใช้
2. เครื่องมือที่ใช้
3. วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร
4. เก็บยางมะละกอ
5. เตรียมเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ
6. ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ
7. ปรับปรุงแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการล้างด้วยแอลกอฮอล์
8. ตรวจหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยไลเปสจากยางมะละกอ
9. ตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ใช้แล้ว
10. สังเคราะห์ไบโอดีเซลจากน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารโดยเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ
11. ทดสอบไบโอดีเซลที่สังเคราะห์ได้กับเครื่องยนต์ดีเซล

3.1 สารเคมีที่ใช้

ยางมะละกอสดได้จากการกรีดผลมะละกอดิบ น้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารได้จากร้านขายกล้วยทอดในเขตอำเภอเมืองและร้านขายเกี๊ยวทอด ลูกชิ้นทอด หน่อไม้ทอด และเต้าหู้ทอดในเขตอำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ไอโซ-โพรพานอล เมธานอล เฮกเซน ได้มาจากบริษัทฟลูกา สำหรับเมธานอลิกโซเดียมไฮดรอกไซด์ โบรอนไตรฟลูออไรด์เมธานอล และแมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ได้มาจากบริษัทบีดีเอช สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดเป็นชนิด Analytical grade

3.2 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC Varian Star 3600 CX, Australia)

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ-แมสเปคโตรมิเตอร์ (MSD 5973(EI), Hewlett Packard, U.S.A.)

เครื่องวัดพีเอช(Accumet model 50, Fisher Scientific, U.S.A.)

เครื่องกวนสารละลาย (1203 Hoyplate&Stirrer, Jenway, U.K.)

เครื่องเขย่าสารพร้อมควบคุมอุณหภูมิ (Shaker bath model 1083, GFL, U.S.A.)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ(water bath model KG D-91126, Memmert, Germany)

3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารทำโดยชั่งน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ผ่านการกรองแล้วซึ่งมีลักษณะใสสีเหลืองเข้ม ซึ่งได้มาจากร้านขายของทอด ในเขตอำเภอเมืองและอำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ประมาณ 40 มิลลิกรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายเมธานอลิก โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (methanolic sodium hydroxide) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ลงไป 3 มิลลิลิตร ต้มสารละลายผสมในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์-เมธานอล (BF_3-methanol) 5 มิลลิลิตร เพื่อเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันให้เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ต้มสารละลายต่อประมาณ 2-3 นาที ตั้งไว้ให้เย็นแล้วเทลงในกรวยแยกที่มีสารละลายผสมของเฮกเซนและสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัวอยู่ในอัตราส่วน 1.25 : 1 เขย่าเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เก็บสารละลายในชั้นของ เฮกเซนซึ่งมีเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอยู่ไว้ เติมแอนไฮดรัสแมกนีเซียมซัลเฟต ประมาณ 1 กรัม แล้วกรองตะกอนทิ้งไป นำสารละลายที่ได้ไประเหย ตัวทำละลายออกในอ่างควบคุมอุณหภูมิให้เหลือปริมาตรประมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมทรี (GC-MS)

3.4 การเก็บยางมะละกอ

วิธีการเก็บยางมะละกอทำได้โดยกรีดยางมะละกอในช่วงเช้า (ประมาณ 07.00-10.00 น.) ใช้มีดปลายแหลมกรีดผลมะละกอดิบที่มีอายุประมาณ 70-100 วัน ให้เป็นรอยยาว ประมาณ 4-6 รอย รองน้ำยางที่ไหลลงมาด้วยแก้วพลาสติก และขูดน้ำยางบางส่วนที่แห้งติดอยู่ที่ผลลงมาด้วย เก็บยางมะละกอที่ได้ทั้งหมดไว้ในขวดพลาสติก นำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดลอง

3.5 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ

นำยางมะละกอที่แช่แข็งไว้มาละลายที่อุณหภูมิห้อง กรองยางมะละกอที่ละลายแล้วด้วยตะแกรงเพื่อแยกสิ่งเจือปนออก ชั่งน้ำหนักยางมะละกอที่ได้ แล้วเติมน้ำกลั่น (โดยน้ำหนัก) ลงไป 3 เท่าของน้ำหนัก ยงมะละกอ คนให้สารละลายเข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของสารละลายทิ้งไป ส่วนของตะกอนที่เหลือนำมาเติมน้ำกลั่นอีก3 เท่าของยางมะละกอ คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำส่วนตะกอนที่แยกได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้ง ขูดตะกอนที่แห้งแล้วใส่ขวดที่มีฝาปิด เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

3.6 ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ

นำตะกอนไลเปสที่เตรียมได้มาตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาการสลายไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารให้เป็นกรดไขมันที่อุณหภูมิต่างๆ และในสารละลายปฏิกิริยาที่มีบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.15 โมลาร์ อยู่ด้วย ที่พีเอชต่างๆ

3.6.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ผสมน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร 0.50 มิลลิลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรดด่างของสารละลาย (pH) เท่ากับ 8 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย ปริมตร 10 มิลลิลิตร เข้าด้วยกันในขวดรูปชมพู่จำนวน 7 ใบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 40, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเติมเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอที่เตรียมได้จากการอบแห้ง 2 มิลลิกรัม ลงไปในขวดแต่ละใบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 40, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายผสมของอะซีโตน : เอทานอล ในอัตราส่วนโดยปริมาตร 1:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1000 โมลาร์ จนกระทั่งวัดค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายได้เท่ากับ 8 (Giordani, Moulin & Verger. 1991 : 1069-1072) บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้นำไปคำนวณจำนวนไมโครโมลของกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการย่อยน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารของไลเปส โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตไลเปส คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ได้กรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที

3.6.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ผสมน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร 0.50 มิลลิลิตร และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย (pH) เท่ากับ 5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้าด้วยกันในขวดรูปชมพู่ เติมไลเปสจากยางมะละกอที่เตรียมได้จากการอบแห้ง 2 มิลลิกรัม ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายผสมของอะซีโตน : เอทานอล ในอัตราส่วนโดยปริมาตร 1:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1000 โมลาร์ จนกระทั่งวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายได้เท่ากับ 8 บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ นำไปคำนวณจำนวนไมโครโมลของกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการย่อยน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารของไลเปส ในขณะเดียวกันให้ทำการทดลองที่พีเอชอื่นๆ ควบคู่กันไป โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย (pH) เท่ากับ 6, 7, 8 และ 9 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย

3.7 ศึกษาการปรับปรุงแอคติวิตีของเอนไซม์

เตรียมขวดตัวอย่างขนาด 5 มิลลิลิตร 3 ขวด ที่มีไอโซ-โพรพานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ชั่งตะกอนไลเปสที่เตรียมได้จากการอบแห้ง 4 มิลลิกรัม เติมลงไปในขวดตัวอย่างทั้ง 3 ขวด คนสารละลายให้เข้ากัน ตั้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายใสทิ้งไป แล้วเติมน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร และเมทิลโอลีเอต อย่างละ 3 มิลลิลิตร ลงในขวดตัวอย่างที่ 2 และ 3 ตามลำดับ คนสารละลายให้เข้ากัน ตั้งไว้จนสารตกตะกอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายใสทิ้งไป เก็บส่วนตะกอนของขวดตัวอย่างทั้ง 3 ขวด ไปตรวจสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเมทานอไลซีสของน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร โดยเติมเอนไซม์ที่เตรียมได้ลงไปในสารละลายผสมที่ประกอบด้วยน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ปราศจากน้ำ 0.851 กรัม และเมธานอลที่ปราศจากน้ำ 0.096 กรัม เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายผสมทั้งหมดไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายใสไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเออร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography; TLC) และวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นโดย GC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.8 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยไลเปสจากยางมะละกอ

3.8.1 ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาเมทานอไลซีสของไลเปสจากยางมะละกอ

สารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารซึ่งปราศจากน้ำ 0.851 กรัม และ เมธานอลที่ปราศจากน้ำ0.096 กรัม เติมไลเปสที่แช่ในไอโซ-โพรพานอล นาน 3 ชั่วโมงและแช่ในน้ำมันที่เหลือจากอการทอดอาหารอีก1 ชั่วโมง ปริมาณ4 มิลลิกรัม ลงไปเพื่อเริ่มปฏิกิริยา จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ45 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายผสมทั้งหมดไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายใสไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วย TLC และวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นโดย GC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.8.2 ศึกษาผลของอัตราส่วนความเข้มข้นของน้ำมันที่เหลือจากการทอดต่อเมทานอล

เตรียมขวดตัวอย่างที่มีฝาปิดขนาด 3 มิลลิลิตร 4 ขวด โดยทั้ง4 ขวด ใส่น้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ปราศจากน้ำปริมาณ 0.851 กรัม ลงไป จากนั้นเติมเมทานอลที่ปราศจากน้ำปริมาณ 0.096, 0.128, 0.150 และ 0.192 กรัม ลงไปในขวดที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับจะได้สารละลายผสมของน้ำมันที่เหลือจากการทอดกับเมธานอลในอัตราส่วน 1: 3, 1 : 4, 1 : 5 และ 1 : 6 เติมไลเปสจากยางมะละกอแห้งที่ผ่านการแช่ในไอโซ-โพรพานอลมาแล้ว 3 ชั่วโมง และแช่ในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารอีก 1 ชั่วโมง ปริมาณ4 มิลลิกรัม เพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำขวดตัวอย่างทั้ง4 ขวดไปเขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บสารละลายใสที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมงปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วย TLC และวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นโดยGC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.8.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิ

เตรียมสารละลายผสมสับสเตรทตั้งต้นซึ่งประกอบด้วย น้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ปราศจากน้ำ 0.851 กรัม กับ เมทานอลที่ปราศจากน้ำ0.128 กรัม ใส่ในขวดตัวอย่างขนาด 3 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด นำขวดตัวอย่างที่1 ถึง 4 ไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เติมไลเปสจากยางมะละกอแห้งที่ผ่านการแช่ในไอโซ-โพรพานอลมาแล้ว 3 ชั่วโมง และแช่ในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอีก 1 ชั่วโมง ปริมาณ4 มิลลิกรัม ลงในขวดตัวอย่างทั้ง4 ขวด เพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำขวดตัวอย่างที่1 ถึง 4 ไปอุ่นที่อุณหภูมิเดิม พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเก็บสารละลายใสที่เวลา 6, 12, 18 และ 24

ชั่วโมง ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วย TLC และวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นโดยGC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.8.4 ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ

เตรียมสารละลายผสมที่ประกอบด้วยน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ปราศจากน้ำ 0.851 กรัม และเมทานอลที่ปราศจากน้ำ 0.128 กรัม ลงในขวดผสมสารตัวอย่างขนาด 3 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ชั่งไลเปสจากยางมะละกอแห้งที่ผ่านการแช่ในไอโซ-โพรพานอล 3 ชั่วโมง และแช่ในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอีก 1 ชั่วโมง ปริมาณร้อยละ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 โดยน้ำหนักของน้ำมันที่ใช้ทั้งหมด นำไปเติมในสารละลายผสมข้างต้น ในขวดที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บสารละลายใสที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC และวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นโดย GC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.8.5 ศึกษาผลของแอคติวิตีน้ำของเอนไซม์

ชั่งไลเปสจากยางมะละกอ100 มิลลิกรัม ที่ผ่านการปรับปรุงแอคติวิตีแล้วโดยการแช่ในไอโซ-โพรพานอล 3 ชั่วโมง และแช่ในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอีก 1 ชั่วโมง ใส่ลงในจานพลาสติกขนาดเล็กจำนวน 4 ใบ นำจานที่ใส่เอนไซม์ทั้ง4 ใบ ไปใส่ในโถดูดความชื้นใบที่ 1 ซึ่งบรรจุลิเทียมคลอไรด์ (LiCl, water activity, a_w = 0.11) ขวดใบที่ 2 บรรจุโพแทสเซียมอะซีเตท (CH_3COOK, a_w = 0.23) ขวดใบที่ 3 บรรจุแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$, a_w = 0.33) และขวดใบที่ 4 บรรจุแมกนีเซียมไนเตรท ($Mg(NO_3)_2$, a_w = 0.53) ตามลำดับ นำขวดตัวอย่างทั้ง4 ใบ ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำเอนไซม์ในแต่ละขวดไปวัดแอคติวิตีน้ำด้วยเครื่องวัดความชื้นดังนี้คือ ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดความชื้น (Thermoconstanter Humidat TH2, Novasina) ด้วยเกลือมาตรฐานที่มีค่าแอคติวิตีน้ำ(a_w) ใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้สารมาตรฐานเกลือลิเธียมคลอไรด์ (LiCl, a_w = 0.11) การปรับมาตรฐานของเครื่องทำได้โดยปรับอุณหภูมิของเครื่องให้เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส นำถ้วยบรรจุลิเธียมคลอไรด์ใส่ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง ปิดฝาเครื่อง ปรับเครื่องให้อ่านค่าความชื้นสัมพัทธ์ให้ได้ 11.3 แล้วนำเอาถ้วยลิเธียมคลอไรด์ออกจากเครื่อง ใส่ถ้วยที่บรรจุไลเปส (ประมาณ 100 มิลลิกรัม) ใส่ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง ปิดฝาเครื่อง อ่านค่าความชื้นสัมพัทธ์ทุก ๆ10 นาที จนค่าที่ได้คงที่ คำนวณค่าแอคติวิตีน้ำของไลเปส แห้งได้โดยใช้ความสัมพันธ์ดังนี้

แอคติวิตีน้ำ = ความชื้นสัมพัทธ์ 100

เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ปราศจากน้ำ 0.851 กรัม และเมธานอลที่ปราศจากน้ำ 0.128 กรัม ลงในขวดผสมสารตัวอย่างขนาด 3 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด ชั่งไลเปสจากยางมะละกอแห้งที่มีค่าแอคติวิตีน้ำเท่ากับ 0.11, 0.23, 0.33 และ 0.53 ซึ่งเตรียมได้จากวิธีข้างต้น อย่างละ 2% โดยน้ำหนักของน้ำมันที่ใช้เติมในสารละลายผสมข้างต้นในขวดใบที่ 1, 2, 3, และ 4 ตามลำดับ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายผสมทั้งหมดในแต่ละขวดไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายใสไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC และวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นโดย GC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.8.6 ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์

ผสมน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ปราศจากน้ำ 0.851 กรัม เข้ากับเมทานอลที่ปราศจากน้ำ 0.128 กรัม ในขวดผสมสารตัวอย่างขนาด 3 มิลลิลิตร จำนวน 5 ใบ แล้วเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ เทอร์-บิวทานอล (tert-butanol) เฮกเซน เฮพเทน และไดเอทิลอีเทอร์ อย่างละ 20% โดยน้ำหนักของน้ำมันที่ใช้ ลงในขวดใบที่ 1-5 ตามลำดับ จากนั้นเติมไลเปสแห้งที่มีแอคติวิตีน้ำเท่ากับ 0.11 (เตรียมได้จากข้อ 3.8.5) ปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนักของน้ำมันที่ใช้ ลงในขวดตัวอย่างแต่ละใบ นำขวดตัวอย่างทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายผสมทั้งหมดในแต่ละขวดไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายใสไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยวิธี TLC และวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นโดย GC ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.9 วิธีตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ใช้แล้ว

เตรียมขวดตัวอย่างขนาด 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 ใบ ขวดใบที่ 1 ผสมน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ปราศจากน้ำ 0.851 กรัม เข้ากับเมทานอลที่ปราศจากน้ำ 0.128 กรัม ขวดใบที่ 2 ผสมน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารที่ปราศจากน้ำ 0.851 กรัม เมทานอลที่ปราศจากน้ำ 0.128 กรัม และเทอร์-บิวทานอล 0.170 กรัม ให้เข้ากัน เติมไลเปสจากยางมะละกอที่มีแอคติวิตีน้ำเท่ากับ 0.11 ปริมาณ 0.017 กรัม ลงไปในขวดตัวอย่างทั้ง 2 ใบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกเอาส่วนของสารละลายใส

ไปวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ และส่วนของตะกอนซึ่งมีเอนไซม์อยู่ของขวดใบที่1 และ ใบที่ 2 นำไปเติมสับสเตรทใหม่ ของแต่ละใบ ทำการทดลองซ้ำอีกจนครบ30 ครั้ง

3.10 การสังเคราะห์ไบโอดีเซลจากน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร

ผสมน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร100 กรัม เข้ากับเมทานอลที่ปราศจากน้ำ 113 กรัม และ เฮกเซน 20 กรัม ในถังอลูมิเนียมที่มีฝาปิดขนาด500 มิลลิลิตร กวนสารละลายให้เข้ากันด้วยแท่งแม่หล็ก เติมไลเปสแห้งที่มีแอคติวิตีน้ำเท่ากับ0.11 ปริมาณ 314 กรัม ลงไปเพื่อเริ่มปฏิกิริยา กวนสารละลายอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิ40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้แยกชั้นใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง แยกสารละลายชั้นบนไปทดสอบกับเครื่องยนต์ดีเซลรอบต่ำ โดยผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนของไบโอดีเซลต่อน้ำมันดีเซลเท่ากับ 20: 80 ทำการวัดอัตราการสิ้นเปลืองเชื้อเพลิงเป็นลิตรต่อชั่วโมงของเครื่องยนต์ที่ทดลองใช้