รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มใช้แล้ว โดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่มีความจำเพาะต่างกัน

Production of Biodiesel from Used Palm Oil by Immobilized Lipases with Different Specificity

โดย

ผศ.ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์
รศ.ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล
และนางสาวเกษรา ทองบริบูรณ์

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2552 รหัสโครงการ AGR520011S คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้ และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการ ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่เป็นเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้วกับเอทานอลด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในระบบกะและระบบต่อเนื่อง จากการคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 4 ชนิด คือเอนไซม์ไลเปสอิสระ Lipase PS, Lipase AK และ Lipase AY จากเชื้อ *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Candida rugosa* ตามลำดับ ที่ผ่านการตรึงรูปด้วยตัวพยุงแอคคูเรล EP 100 กับเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า Lipozyme TL IM จากเชื้อ *Thermomysis lauginosa* พบว่า Lipase AY และ Lipase AK มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตเอทิลเอสเทอร์ เนื่องจาก Lipase AY สามารถย่อยสลายน้ำมันให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระได้สูงเท่ากับร้อยละ 53 ในขณะที่ Lipase AK มีความสามารถในการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นให้เกิดเป็นเอทิลเอสเทอร์ได้สูงเท่ากับร้อยละ 91 โดยเมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด มาผสมกันเพื่อใช้ในการผลิตในระบบกะ พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานร่วมกันได้ดี โดยให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้เท่ากับร้อยละ 89 ในสภาวะที่ใช้ Lipase AY ต่อ Lipase AK ที่สัดส่วน 1:1 (ร้อยละ 50 ต่อ 50) ในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมันโดยมีน้ำในระบบร้อยละ 2 และสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และพบว่าการแบ่งเติมเอทานอลครั้งละ 1 เท่าของโมลน้ำมันจำนวน 3 ครั้ง จะให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดถึงร้อยละ 97 จากการศึกษาการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูป พบว่าสามารถใช้เอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซลได้ 12 ครั้ง โดยยังคงให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ที่มากกว่าร้อยละ 50 การผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยเอนไซม์ตรึงรูปผสมในระบบต่อเนื่องแบบแพคเบด พบว่าการบรรจุเอนไซม์โดยผสมเป็นเนื้อเดียวกันจะให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 20 แต่เมื่อแยกคอลัมน์ Lipase AY กับ Lipase AK โดยทำการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วด้วย Lipase AY ก่อน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันได้เป็นอย่างดีส่งผลให้เกิดการผลิตกรดไขมันอิสระได้มากกว่าร้อยละ 60 และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแยกน้ำออกและนำไปเติมเอทานอลเพื่อผลิตเอทิลเอสเทอร์ด้วย Lipase AK พบว่าเกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 70 ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติของเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลและระเหยเอทานอลส่วนเกินออก พบว่ามีค่าความหนืดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเท่ากับ 5.66 เซ็นติสโตก และมีค่าจุดวาบไฟ จุดขุ่น และจุดไหลเทเท่ากับ 120, 8 และ 6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ABSTRACT

Fatty acid ethyl ester (biodiesel) was produced by transesterification reaction of used palm oil and ethanol in batch and continuous systems using immobilized lipases. Four commercial lipases, three of them are free lipases, Lipase PS, Lipase AK and Lipase AY from *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Candida rugosa*, respectively, were immobilized on accurel EP100 and one of commercial immobilized lipase, Lipozyme TL IM from *Thermomysis lauginosa*, were screened. The results showed that Lipase AY and Lipase AK were suitable for ethyl ester production due to its high activity for hydrolysis and transesterification, respectively. The mixed enzymes Lipase AY and Lipase AK gave 89% of ethyl ester under the optimum condition: the ratio of Lipase AY and Lipase AK of 1:1, the amount of mixed immobilized enzymes of 10%, water content of 2% and molar ratio of ethanol/oil at 3:1 incubated at 45 °C for 12 h. The highest yield of ethyl ester of 97% was obtained when ethanol addition was applied in three steps. The reusability of mixed immobilized lipases was tested. It was found that the mixed immobilized lipases produced ethyl ester more than 50% in 12 replicates. Continuous production by the mixed immobilized lipases in packed-bed column produced only 20% of ethyl ester. While the separately packed column of Lipase AY and Lipase AK was more suitable for ethyl ester production. The used palm oil was hydrolyzed well by the column of Lipase AY which gave 60% of free fatty acid. The products from column of Lipase AY were further catalyzed by the column of Lipase AK and 70% of ethyl ester was obtained. Fatty acid ethyl ester from the used palm oil was purified by silica gel and the excess ethanol was removed using rotary evaporator. The analysis for biodiesel properties showed that the viscosity of produced ethyl ester was 5.66 cSt (at 40 °C) and flash point, cloud point and pour point were 120, 8 and 6 °C, respectively.

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ		(4)
รายการตาราง		(5)
รายการภาพประกอบ		(7)
บทที่		
1	บทนำ	
	บทนำต้นเรื่อง	1
	ตรวจเอกสาร	2
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	50
	ขอบเขตของการวิจัย	50
2	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
	วัสดุ	51
	อุปกรณ์	51
	วิธีการทดลอง	54
3	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
	การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มใช้แล้ว	64
	การตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล	67
	การศึกษาความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและการคัดเลือกเอนไซม์	69
	การศึกษาการใช้เอนไซม์ผสมและเวลาในการเติมเอทานอลในการผลิตเอทิลเอสเทอร์	82
	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยเอนไซม์ไลเปสผสม	92
	การศึกษาการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันใช้แล้วโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (Packed-bed reactor) ในระบบต่อเนื่อง	108
	การผลิตไบโอดีเซลเพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการในการเป็นพลังงานเชื้อเพลิง	117
4	สรุป	121
เอกสารอ้างอิง		123
ภาคผนวก		135
ประวัติผู้เขียน		149
ผลงานนำเสนอและตีพิมพ์		153

รายการตาราง

Table		Page
1.	Technical properties of biodiesel	3
2.	Physical and chemical properties of biodiesel from different oils	4
3.	Standard specification for characteristics and quality of fatty acid methyl ester as biodiesel fuel 2009	5
4.	Critical temperatures and critical pressures of various alcohols	9
5.	Comparison of the different technologies for biodiesel production	10
6.	Sample of commercialized lipases	14
7.	Specificity of lipases from different sources to types and position of fatty acid of triglyceride	20
8.	Major specificities of lipases and their applications	21
9.	Source of free and immobilized lipases used for biodiesel production	23
10.	Granulometric analysis of different accurel materials	27
11.	Structure, systematic, trivial, and shorthand names of some common fatty acids	29
12.	Iodine value and fatty acid content of the major commodity oils	30
13.	Chemical property of palm oil	31
14.	Melting and crystallization peaks of diglycerides by differential scanning calorimetry	32
15.	Some properties of alcohol fuels	36
16.	Comparison of ethanol production from various raw materials	37
17.	Biodiesel production by lipase through different conditions	46
18.	Properties and composition of used palm oil and palm olein	66
19.	Characteristic of lipases in palm olein hydrolysis	69
20.	Relative activity of immobilized lipases	81
21.	Some physical and chemical properties of biodiesel	120
22.	Available sample for P.V. determination	138
23.	Available sample for I.N. determination	139
24.	TLC/FID report	145

รายการตาราง (ต่อ)

Table		Page
25.	มอก. 288-2535 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันปาล์มสำหรับบริโภค: องค์ประกอบของกรดไขมัน	146
26.	มอก. 288-2535 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันปาล์มสำหรับบริโภค: คุณลักษณะทางฟิสิกส์และทางเคมี	147

รายการภาพประกอบ

Figure		Page
1.	Transesterification of triglyceride and alcohol	7
2.	Production of biodiesel by alkali process	8
3.	Schematic process of biodiesel fuel production by supercritical method	8
4.	Flow diagram of biodiesel production using the lipase-catalysis process	10
5.	Lipase production process for methanolysis with extracellular lipases	11
6.	Lipase production process for methanolysis with intracellular lipases	11
7.	Lipase catalyzed reactions	15
8	Shape of the binding site of lipases	16
9.	Hydrolysis of 1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol or 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-glycerol by crude lipase from *Geotrichum* sp.	18
10.	Structure and stereospecific numbering (*sn*) of acylglycerols	19
11.	Graphical representation of the mechanismic steps of triglyceride ester-bond transesterification	22
12.	Method of enzyme immobilization	24
13.	Illustration of general procedures for enzyme immobilization	25
14.	SEM of Accurel EP 100 in different particle sizes (p)	28
15.	Degradation of frying oil	33
16.	Physical and chemical reactions of oil that occur during frying	34
17.	Packed bed reactor of immobilized enzyme	47
18.	Lipase immobilization	55
19.	Continuous biodiesel productions in packed-bed column	61
20.	Continuous biodiesel production in packed-bed columns with separations column	62
21.	Recycle system for transesterificaton of used palm oil in packed-bed column	63
22.	Purification of biodiesel by silica gel column	63
23.	Time course of hydrolysis reaction of used palm oil by immobilized lipases	71
24.	Comparision of hydrolysis activity of used palm oil by four immobilized lipases	72
25.	Time course of transesterification of used palm oil by immobilized lipases	75

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

Figure		Page
26.	Comparison of transesterification activity of used palm oil by four immobilized lipases	76
27.	Time course of the direct esterification of palmitic acid using immobilized lipases	79
28.	Comparison of esterification activity of four immobilized lipases	80
29.	Comparision of ethyl ester production from used palm oil by single and mixed immobilized lipases	84
30.	Effect of ethanol addition time on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil using mixed immobilized Lipases AK and Lipase AY	87
31.	Comparison of ethanol addition time on tranesterification activity of mixed immobilized Lipase AK and Lipase AY	88
32.	Effect of enzyme ratio on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil using mixed immobilized lipases	90
33.	Comparison of immobilized lipases ratio on tranesterification reaction	91
34.	Effect of water content on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil using mixed immobilized lipases	94
35.	Comparison of water content on tranesterification reaction	95
36.	Effect of mixed immobilized lipase AK and AY (50: 50) content on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil	97
37.	Comparison of amount of mixed immobilized lipase AK and AY (50: 50) on tranesterification reaction	98
38.	Effect of ethanol molar ratio on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil	101
39.	Comparison of ethanol: oil molar ratio on tranesterification reaction	102
40.	Effect of stepwise ethanol adition on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil	104
41.	Comparison of stepwise ethanol adition on tranesterification reaction	105

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

Figure		Page
42.	Effect of repeated used of immobilized lipases on FAEE yield	106
43.	Effect of immobilized enzymes distribution on continuous biodiesel production in packed-bed column	109
44.	Effect of extended retention time on continuous biodiesel production in packed-bed column	111
45.	Continuous biodiesel production with dual packed-bed column	113
46.	Continuous biodiesel production in packed-bed column with stepwise ethanol addition	115
47.	Continuous biodiesel productions in packed-bed column by hydrolysis of used palm oil followed by transesterification	116
48.	Continuous biodiesel productions in packed-bed column with recycle system	118
49.	Standard curve of palmitic acid	142
50.	GC chromatogram of used palm oil fatty acid	143
51.	TLC/FID chromatogram of fatty acid ethyl ester	144

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิล ซึ่งได้แก่ น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ รวมถึงถ่านหิน กำลังลดปริมาณลงมาก และมีแนวโน้มว่าจะหมดลงภายในไม่กี่สิบปีข้างหน้า โดยมีการคาดการณ์ว่าหากมีการใช้พลังงานในอัตราที่สูงอยู่ในปัจจุบัน จะเหลือพลังงานในรูปของน้ำมันปิโตรเลียมและก๊าซธรรมชาติสำหรับใช้ได้อีกเพียง 40 และ 64 ปีตามลำดับ (Vasudevan and Briggs, 2008) จากวิกฤตการดังกล่าวก่อให้เกิดการตื่นตัวที่จะหาพลังงานทดแทนเพื่อจะนำมาใช้ในอนาคตไม่ว่าจะเป็นพลังงานจาก ลม แสงอาทิตย์ น้ำหรือชีวมวล ซึ่งหนึ่งในพลังงานทดแทนที่ประเทศต่างๆ กำลังให้ความสนใจกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ ไบโอดีเซล เนื่องจากไบโอดีเซลมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและสามารถใช้แทนกันได้ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติบางประการที่ดีกว่าอีกด้วย โดยการเผาไหม้ของไบโอดีเซลจะไม่ก่อให้เกิดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เนื่องจากองค์ประกอบของไบโอดีเซลไม่มีธาตุกำมะถัน เกิดก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และฝุ่นละอองที่น้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับดีเซลปกติ ไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันจากสัตว์มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล หรือ เมทานอล โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด ด่าง หรือเอนไซม์ไลเปส การผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมจะนิยมใช้ด่าง เนื่องจากสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ในปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว แต่กระบวนการดังกล่าวจะก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการอย่างสบู่ออกมามาก ใช้อุณหภูมิและความดันสูง รวมทั้งต้องอาศัยขั้นตอนในการแยกและกำจัดด่างที่ยุ่งยาก ปัจจุบันจึงมีผู้สนใจทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะมีความจำเพาะสูง เกิดสารที่ไม่ต้องการจากการทำปฏิกิริยาน้อย การแยกผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำได้ง่าย นอกจากนี้เอนไซม์เป็นสิ่งที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติจึงไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันน้ำมันปาล์มเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยเนื่องจากมีปริมาณมาก แต่การใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ในการผลิตไบโอดีเซลมีข้อจำกัดเรื่องต้นทุนที่มีราคาสูง อีกทั้งยังทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนน้ำมันเพื่อการบริโภค ส่งผลให้ราคาน้ำมันยิ่งสูงขึ้นไปอีก ดังนั้นการนำน้ำมันปาล์มใช้แล้วมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลจึงมีศักยภาพมากกว่า โดยเป็นการลดปัญหาการใช้น้ำมันทอดซ้ำ ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคและสามารถลดการปล่อยของเสียออกสู่สิ่งแวดล้อม สำหรับวัตถุดิบแอลกอฮอล์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลทางการค้าคือ เมทานอลเนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาถูก แต่ในอนาคตเอทานอลจะเป็นแอลกอออล์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลมากกว่าเนื่องจากเอทานอลมีความเป็นพิษน้อยกว่าจึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมทั้งยังสามารถผลิตได้จากวัสดุเศษเหลือที่มาจากภาคการเกษตรหรือจากภาคอุตสาหกรรม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจาก

น้ำมันปาล์มใช้แล้วกับเอทานอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่มีความจำเพาะต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ตรวจเอกสาร

1. ไบโอดีเซล

1.1 ความหมายของไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลหมายถึงน้ำมันเชื้อเพลิงที่สามารถใช้ทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมดีเซลได้ มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากและสามารถใช้ได้กับเครื่องยนต์ดีเซลแทบทุกชนิด คุณลักษณะของไบโอดีเซลแสดงดังตารางที่ 1 ไบโอดีเซลผลิตได้จากการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาผ่านการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับแอลกอฮอล์โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็นสารเอสเทอร์และกลีเซอรอล เรียกปฏิกิริยาที่เกิดว่าทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าน้ำมันที่ได้จากปิโตรเลียมเนื่องจากมีออกซิเจนสูงกว่าทำให้เกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์เกิดคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่า ไม่เกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์และให้เขม่าคาร์บอนน้อยกว่า (กล้าณรงค์ ศรีรอด และคณะ, 2546) ไบโอดีเซลที่เป็นที่รู้จักกันในประเทศไทยในช่วงแรกจะเป็นการนำน้ำมันพืชเติมลงไปในเครื่องยนต์โดยตรง โดยน้ำมันพืชที่ใช้คือน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันปาล์ม แต่เนื่องจากคุณสมบัติของน้ำมันพืชมีความแตกต่างจากน้ำมันดีเซลมากทำให้เกิดปัญหากับเครื่องยนต์หากใช้เป็นเวลานาน

ต่อมาจึงมีการพัฒนามาใช้การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อทำให้คุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากขึ้นจนสามารถใช้กับเครื่องยนต์ได้อย่างไม่มีปัญหา ทั้งยังเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของน้ำมันดีเซลให้ดีขึ้น

1.2 คุณสมบัติของไบโอดีเซล

พืชน้ำมันที่สามารถนำมาผลิตไบโอดีเซลมีด้วยกันหลายชนิด ส่งผลให้คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของไบโอดีเซลที่ได้มีความแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2 จึงต้องมีข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเตอร์ของกรดไขมันขึ้น เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการบ่งชี้คุณภาพของน้ำมันดังแสดงในตารางที่ 3 เนื่องจากไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชหรือไขมันจากสัตว์ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้คุณสมบัติหลายประการของไบโอดีเซลแตกต่างจากน้ำมันดีเซล (Demirdes, 2008) ซึ่งได้แก่ ค่าความหนืด (viscosity) ความหนาแน่น (density) และจุดวาบไฟ (flash point) โดยน้ำมันไบโอดีเซลจะมีค่าความหนืดและความหนาแน่นที่สูงกว่าน้ำมันดีเซล ซึ่งจะมีผลให้การไหลตลอดจนการสเปรย์น้ำมันภายในเครื่องยนต์ทำได้ช้า การจุดระเบิดภายในเครื่องยนต์จึงทำได้ยากกว่า ดังจะเห็นได้จากจุดวาบไฟที่สูงกว่าดีเซลปกติ นอกจากนี้ยังมีผลต่อค่าซีเทน (cetane number) จุดขุ่น (cloud point) และจุดไหลเท (pour point) โดยค่าซีเทนเป็นตัวเลขที่บ่งบอกดัชนีการจุด

ติดไฟซึ่งคำนวณจากความหนาแน่นและการระเหยของน้ำมันเชื้อเพลิงที่เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เฮกซะเดกเคน (hexadecane) และเฮปตะเมทิลโนเนน (heptamethylnonane) ซึ่งมีค่าซีเทนเป็น100 และ 15 ตามลำดับ

Table 1. Technical properties of biodiesel.

Property	Characteristic
Common name	Biodiesel (bio-diesel)
Common chemical name	Fatty acid (m)ethyl ester
Chemical formula range	C_{14}-C_{24} methyl esters or $C_{15\text{-}25}H_{28\text{-}48}O_2$
Kinematic viscosity range (mm^2/s, at 313 K)	3.3-5.2
Density range (kg/m^3, at 288 K)	860-894
Boiling point range (K)	>475
Flash point range (K)	430-455
Distillation range (K)	470-600
Vapor pressure (mm Hg, at 295 K)	<5
Solubility in water	Insoluble in water
Physical appearance	Light to dark yellow, clear liquid
Odor	Light musty/soapy odor
Biodegradability	More biodegradable than petroleum diesel
Reactivity	Stable, but avoid strong oxidizing agents

ที่มา: ดัดแปลงจาก Demirbas (2008)

2. กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีการผลิตกันอยู่ในปัจจุบันมีกระบวนการหลักๆ ที่สำคัญอยู่ 3 แบบด้วยกัน กระบวนการที่ 1 คือไพโรไลซีส (pyrolysis) ซึ่งเป็นการใช้ความร้อนที่สูงเพื่อทำให้โมเลกุลของน้ำมันพืชแตกตัวออกเป็นแอลเคน แอลคีนและกรดคาร์บอกซิลิก ทำให้ค่าดัชนีการจุดติดไฟหรือค่าซีเทนมีค่าเพิ่มขึ้น กระบวนการที่ 2 คือไมโครอิมัลชั่น (micro-emulsification) ซึ่งเป็นการนำน้ำมันพืชและแอลกอฮอล์มาผสมกันโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิวเป็นตัวประสาน กระบวนการที่ 3 ที่นิยมนำมาใช้กันมากที่สุดคือปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (Fukuda *et al.*, 2001) ซึ่งมีกระบวนการผลิตแบ่งออกได้ 3 รูปแบบคือ

Table 2. Physical and chemical properties of biodiesel from different oils.

Vegetable oil Methyl ester	Kinematics viscosity (mm^2/s)	Cetane number	Lower heating value (MJ/l)	Cloud point (°C)	Flash point (°C)	Density (g/l)	Sulfur (wt %)
Peanut	4.9(37.8°C)	54	33.6	5	176	0.883	-
Soybean[a]	4.5(37.8°C)	45	33.5	1	178	0.885	-
Soybean[a]	4.0(40°C)	45.7-56	32.7	-	-	0.880(15°C)	-
Babassu	3.6(37.8°C)	63	31.8	4	127	0.879	-
Palm[a]	5.7(37.8°C)	62	33.5	13	164	0.880	-
Palm[a]	4.3-4.5(40°C)	64.3-70	32.4	-	-	0.872-0.877(15°C)	-
Sunflower	4.6(37.8°C)	49	33.5	1	183	0.860	-
Tallow	-	-	-	12	96	-	-
Cottonseed	6.8(21°C)	51.2	-	-	110	-	-
Safflower	-	49.8	-	-	180	-	-
Rapeseed	4.2(40°C)	51-59.7	32.8	-	-	0.882(15°C)	-
Used rapeseed	9.48(30°C)	53	36.7	-	192	0.895	0.002
Used corn oil	6.23(30°C)	63.9	42.3	-	166	0.884	0.0013
Diesel fuel	12-3.5(40°C)	51	35.5	-	-	0.830-0.840(15°C)	-
JIS-2D (Gas oil)	2.8(30°C)	58	42.7	-	59	0.833	0.05

[a] : The reaction that used the same raw material but different conditions.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Fukuda และคณะ (2001)

Table 3. Standard specification for characteristics and quality of fatty acid methyl ester as biodiesel fuel 2009.

No.	Property	Level	Unit	Test method[a]
1	methyl ester	≥ 96.5	% wt	EN 14103
2	density at 15 °C	860-900	kg/m^3	ASTM D 1298
3	viscosity at 40 °C	3.5-5.0	cSt	ASTM D 445
4	flash Point	≥120	°C	ASTM D 93
5	sulphur	≤ 0.0010	% wt	ASTM D 2622
6	carbon residue, on 10%	≤ 0.30	%wt	ASTM D 4530
7	cetane number	≥51		ASTM D 613
8	sulphated ash	≤ 0.02	%wt	ASTM D 874
9	water	≤0.050	% wt	EN ISO 12937
10	total contaminate	≤0.0024	% wt	EN 12662
11	copper strip corrosion	≤ No. 1	No. 1	ASTM D 130
12	oxidation stability at 110 °C	≥10	hours	EN 14112
13	acid value	≤ 0.50	mg KOH/g	ASTM D 664
14	iodine value	≤ 120	g Iodine/100g	EN 14111
15	linolenic acid methyl ester	≤ 12.0	% wt	EN 14103
16	methanol	≤ 0.20	% wt	EN 14110
17	monoglyceride	≤ 0.80	% wt	EN 14105
18	diglyceride	≤ 0.20	% wt	EN 14105
19	triglyceride	≤ 0.20	% wt	EN 14105
20	free glycerin	≤ 0.02	% wt	EN 14105
21	total glycerin	≤ 0.25	% wt	EN 14105
22	Group I metals (Na+K)	≤ 5.0	mg/kg	EN 14108 and EN 14109
	group II metals (Ca+Mg)	≤ 5.0	mg/kg	pr EN 14538
23	phosphorus	≤0.0010	% wt	ASTM D 4951
24	additive	follow by department of energy business		

[a] : Alternative method could be used.

ที่มา: กรมธุรกิจพลังงาน (2552)

2.1 การผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทางเคมี

การผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทางเคมีเป็นการนำน้ำมันจากพืชหรือสัตว์มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นกับแอลกอฮอล์โดยมีกรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นสารเอสเทอร์ของกรดอินทรีย์ (organic acid esters) หรือ ไบโอดีเซล ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) หรือ เอทิลเอสเทอร์ (ethyl esters) ตามชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่เป็นเมทานอลหรือเอทานอลตามลำดับและมีกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาชนิดที่ย้อนกลับได้ (reversible reaction) จึงจำเป็นต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยาและแอลกอฮอล์มากพอเพื่อให้ได้ผลผลิตและชนิดของผลิตภัณฑ์ตามต้องการ

แอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจะเป็นแอลกอฮอล์สายตรงที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 1 โมเลกุลที่ตำแหน่งแรก (primary alcohol) หรือตำแหน่งที่สอง (secondary alcohol) มีจำนวนคาร์บอนอยู่ในช่วง 1-8 อะตอมได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอลและเอมิลแอลกอฮอล์ โดยมีการนำเมทานอลและเอทานอลมาใช้มาก เนื่องจากมีราคาถูก หาง่าย และมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเหมาะสม กล่าวคือเป็นสารประกอบที่มีขั้ว (polar compound) มีสายโมเลกุลสั้นทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์และตัวเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น (กล้าณรงค์ ศรีรอด และคณะ, 2546)

จากสมการเคมีในภาพที่ 1 เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์อัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อไตรกลีเซอไรด์ที่เหมาะสมจะเท่ากับ 3 ต่อ 1 หรืออาจมากกว่าเพื่อให้สมดุลเปลี่ยนไปในทางให้ผลผลิตของเอสเทอร์มากที่สุด ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้จะเป็นด่าง กรด หรือเอนไซม์ก็ได้ แต่ในทางอุตสาหกรรมมักนิยมใช้ด่างเนื่องจากทำงานได้เร็ว แต่แอลกอฮอล์และกรดไขมันต้องมีน้ำในโมเลกุลให้น้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากน้ำจะไปทำให้ด่างและไขมันทำปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชันเกิดเป็นสบู่ ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอสเทอร์ลดลงและส่งผลให้การแยกกลีเซอรอลออกจากเอสเทอร์ทำได้ยากขึ้น ดังนั้นการเตรียมด่างในปฏิกิริยาจึงใช้ด่างละลายในเมทานอลแทนน้ำเรียกว่าเมทอกไซด์ (methoxide) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะต้องแยกเอสเทอร์ออกจากส่วนผสมเหล่านั้น เนื่องจากเอสเทอร์ บริสุทธิ์เท่านั้นที่มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อเพลิงที่ดี ซึ่งขั้นตอนการทำบริสุทธิ์จะทำได้ยากเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จะประกอบด้วยส่วนผสมของสารต่างๆ มากมายได้แก่ เอสเทอร์ กลีเซอรอล แอลกอฮอล์ ตัวเร่งปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชัน กระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวเร่งที่เป็นด่างดังแสดงในภาพที่ 2

2.2 การผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีการใช้ของเหลวเหนือจุดวิกฤติ (supercritical method)

การผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีการใช้ของเหลวเหนือจุดวิกฤติเป็นกระบวนการผลิตแบบใหม่ซึ่งแตกต่างจากการผลิตไบโอดีเซลทางการค้าในปัจจุบันที่มีการใช้กรดหรือด่างในการเร่งปฏิกิริยา โดยเป็นการทำให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นด้วยแอลกอฮอล์ที่มีอุณหภูมิสูงในช่วง 350-400 องศาเซลเซียสและความดันสูงในช่วง 45-65 พันเท่าของความดันบรรยากาศ (MPa) เข้าทำปฏิกิริยากับน้ำมันเกิดเป็นสารประกอบเอสเทอร์ ซึ่งวิธีใหม่นี้เป็นกระบวนการที่ง่ายขึ้น ลดเวลาในการทำปฏิกิริยา

ไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิตสูง และสามารถแยกเอสเทอร์บริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ภาพที่ 3 เป็นการจำลองกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยการใช้เมทานอลเหนือจุดวิกฤติ

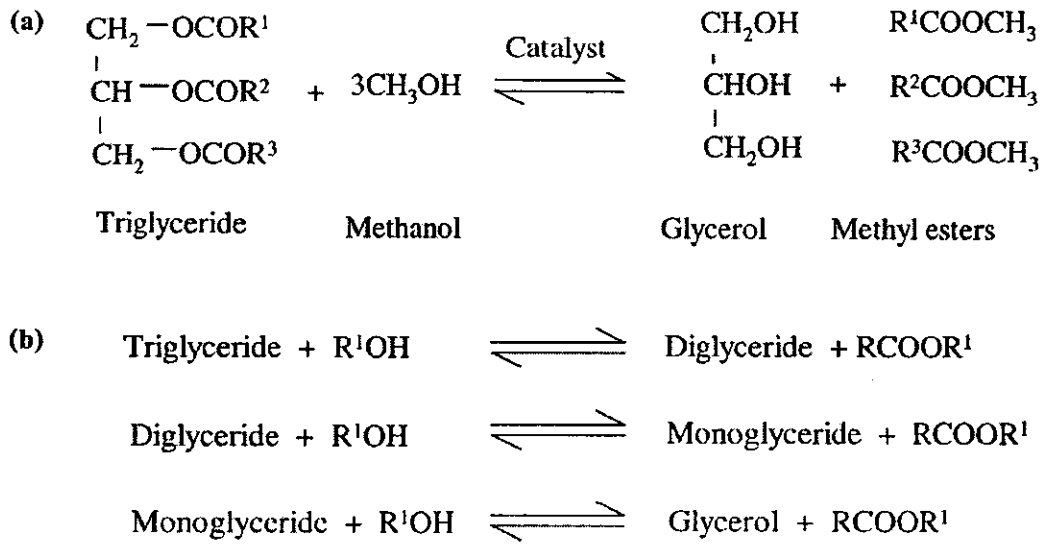


Figure 1. Transesterification of triglyceride and alcohol.

a: General equation for transesterification

b: Sequences of reactions

R: alkyl group

ที่มา: Meher และคณะ (2006)

อุณหภูมิและความดันที่ทำให้แอลกอฮอล์อยู่ในสภาวะวิกฤติจะแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4 โดยจำนวนคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้อุณหภูมิและความดันที่ใช้ในการทำให้แอลกอฮอล์เปลี่ยนสถานะเป็นของเหลวเหนือจุดวิกฤติมีค่าเปลี่ยนไป โดยต้องใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นในขณะที่ความดันที่ใช้กลับลดลง

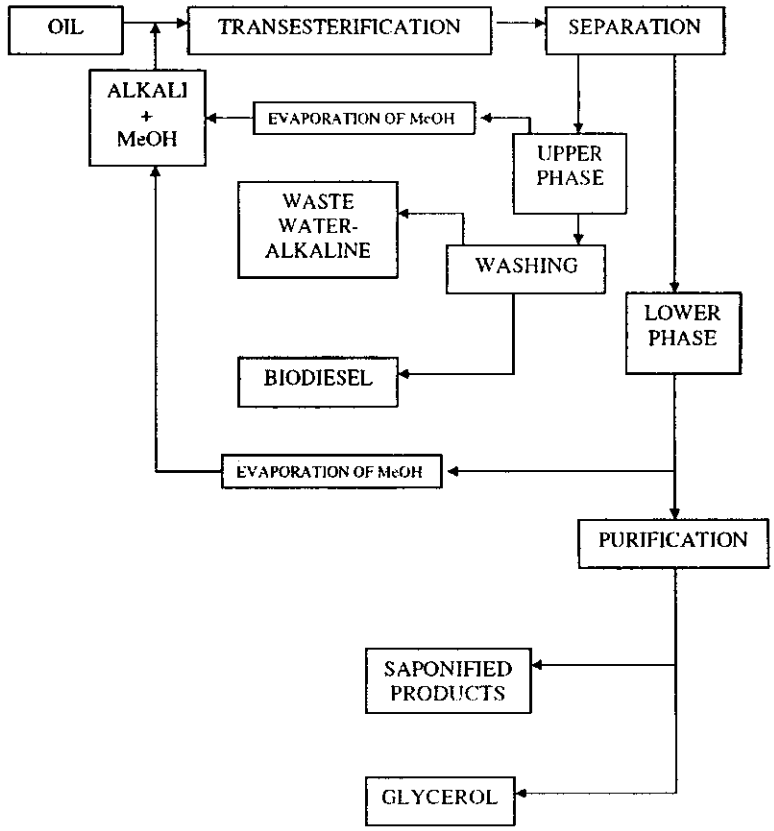


Figure 2. Production of biodiesel by alkali process.

ที่มา: Ranganathan และคณะ (2008)

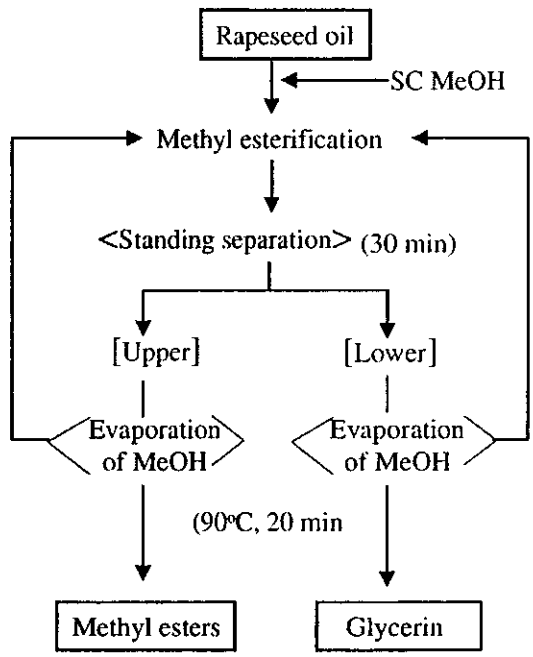


Figure 3. Schematic process of biodiesel fuel production by supercritical method.

SC MeOH = Super Critical Methyl alcohol

ที่มา : Saka และ Kusdiana (2001)

Table 4. Critical temperatures and critical pressures of various alcohols.

Alcohol	Critical temperature (K)	Critical pressure (MPa)
Methanol	512.2	8.1
Ethanol	516.2	6.4
1-Propanol	537.2	5.1
1-Butanol	560.2	4.9

ที่มา: Demirbas (2009)

Saka และ Kusdiana (2001) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเรปสีด (rapeseed oil) และใช้เมทานอลเหนือจุดวิกฤติโดยใช้สัดส่วนของน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:42 ที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ภายในเวลา 240 วินาทีและเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นโดยใช้ด่างในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าการใช้วิธีเมทานอลเหนือจุดวิกฤตจะให้ผลผลิตที่สูงกว่าอีกทั้งการทำบริสุทธิ์ก็สามารถทำได้ง่าย

Demirbas (2009) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันลินซีด (linseed oil) โดยใช้เมทานอลและเอทานอลเหนือจุดวิกฤติ สัดส่วนโมลของน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:41 ที่อุณหภูมิ 503 องศาเคลวิน (230 องศาเซลเซียส) และ 523 องศาเคลวิน (300 องศาเซลเซียส) พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ร้อยละ 88-98 ภายในเวลา 8-12 นาที ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่สุดต่อการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีนี้คือสัดส่วนโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา จากงานวิจัยยังพบว่าน้ำที่มีอยู่ในน้ำมันที่เป็นวัตถุดิบจะส่งผลดีต่อการผลิต

อย่างไรก็ตามการพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีมาเป็นการใช้ของเหลวเหนือจุดวิกฤติ ที่ไม่ต้องใช้ตัวเร่งในการทำปฏิกิริยาทำให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น แต่วิธีนี้ต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูงซึ่งทำได้ยาก และต้องอาศัยการลงทุนที่สูงตามไปด้วย โดยจากการศึกษาของ Kiwjaroun และคณะ (2009) พบว่า หากพิจารณาตลอดกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยการใช้เมทานอลเหนือจุดวิกฤติ พบว่าวิธีนี้ยังมีข้อด้อยกว่าวิธีทางเคมีเนื่องจากต้องใช้สัดส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสูงและต้องการพลังงานสูงในการนำเมทานอลกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมไม่น้อยกว่าการผลิตด้วยวิธีทางเคมี จึงมีการหาแนวทางใหม่ในการผลิตไบโอดีเซลที่จะสามารถแก้ไขปัญหาที่เป็นอยู่ได้ จึงเป็นที่มาของการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา

2.3 การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์เป็นกระบวนการผลิตที่อาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างน้ำมันกับแอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การผลิตด้วยวิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ปฏิกิริยาไม่รุนแรงสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิห้องปฏิกิริยามี

ความจำเพาะสูงและ เก็บเกี่ยวกลีเซอรอลได้ง่าย แต่การผลิตโดยเอนไซม์ไลเปสต้องใช้ต้นทุนสูงเมื่อเทียบกับกระบวนการอื่นๆ เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพง ตารางที่ 4 เป็นการเปรียบเทียบการผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการต่างๆ และแผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแสดงในภาพที่ 4

Table 5. Comparison of the different technologies for biodiesel production.

Variable	Alkali Catalysis	Lipase catalysis	Supercritical alcohol	Acid catalysis
-Reaction temperature (°C)	60-70	30-40	239–385	55–80
-Free fatty acids in raw materials	Saponified products	Methyl esters	Esters	Esters
-Water in raw materials	Interference with the reaction	No influence	-	Interference with reaction
-Yield of methyl esters	Normal	Higher	Good	Normal
-Recovery of glycerol	Difficult	Easy	-	Difficult
-Purification of methyl esters	Repeated washing	None	-	Repeated washing
-Production cost of catalyst	Cheap	Relatively expensive	Medium	Cheap

ที่มา: Machetti และคณะ (2007)

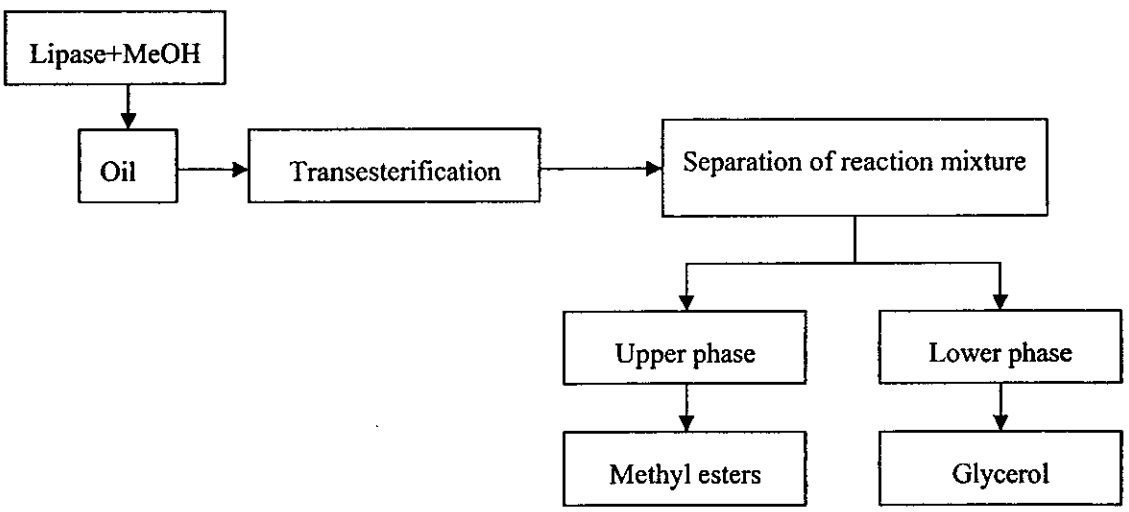


Figure 4. Flow diagram of biodiesel production using the lipase-catalysis processes.

ที่มา: Fukuda และคณะ (2001)

Fukuda และคณะ (2001) ได้แบ่งการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกเป็น 2 แบบด้วยกันคือ การใช้เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายนอกเซลล์และการใช้เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายในเซลล์

2.3.1 การใช้เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular lipase)

การใช้เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายนอกเซลล์ เป็นการนำเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ปล่อยออกนอกเซลล์มาใช้ประโยชน์ โดยวิธีนี้มีข้อดีคือเอนไซม์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงและสามารถควบคุมสภาวะในการทำปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากได้ผ่านขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์และนำมาตรึงกับตัวพยุง แต่มีข้อเสียคือกรรมวิธีการผลิตเอนไซม์มีหลายขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 5

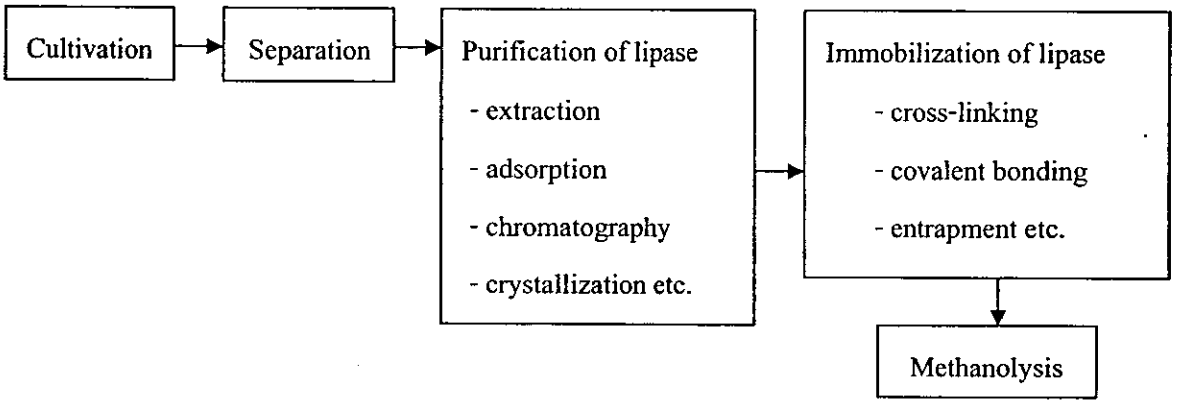


Figure 5. Lipase production process for methanolysis with extracellular lipases.

ที่มา: Fukuda และคณะ (2001)

2.3.2 การใช้เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular or whole cell biocatalyst)

การใช้เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายในเซลล์ เป็นการนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอดีเซลโดยการตรึงตัวเซลล์ไว้ด้วยตัวพยุงที่เป็นวัสดุตามธรรมชาติ (Biomass Support Particles: BSPs) ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือกรรมวิธีการผลิตสามารถทำได้ง่ายกว่าแบบแรกอีกทั้งเอนไซม์มีความคงตัวสูง แต่มีข้อเสียที่ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์จะต่ำกว่าแบบแรกและการควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาก็ทำได้ยากกว่า เนื่องจากต้องควบคุมสภาวะให้ตัวเซลล์สามารถคงสภาพอยู่ได้และให้เอนไซม์ในตัวเซลล์ยังสามารถทำงานได้ ขั้นตอนการใช้แสดงดังภาพที่ 6

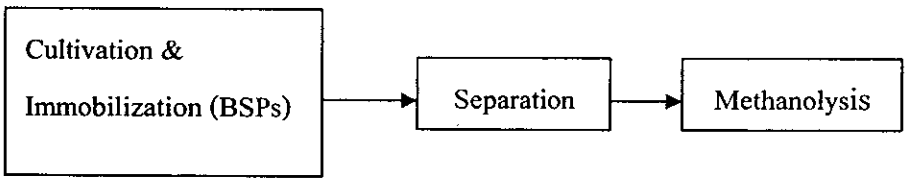


Figure 6. Lipase production process for methanolysis with intracellular lipases.

ที่มา: Fukuda และคณะ (2001)

3. การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

เอนไซม์คือกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่พิเศษในการเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์เป็นหลายล้านเท่าด้วยปริมาณเอนไซม์เพียงระดับไมโครโมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรง (mild reaction) มีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่าสับสเตรทและสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น ดังแสดงในสมการที่ 1 โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาด้วยการลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นวิธีการที่มีการทำการศึกษาค้นคว้ากันอย่างกว้างขวางในประเทศต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยา จึงได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และไม่ก่อให้เกิดสารที่ไม่ต้องการจากการทำปฏิกิริยา ทำให้การแยกผลิตภัณฑ์และการทำบริสุทธิ์สามารถทำได้ง่าย อีกทั้งจากการที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง คือที่อุณหภูมิและความดันปกติ ทำให้สามารถควบคุมสภาวะของการทำงานได้ง่าย และตัวเอนไซม์เองก็เป็นสารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตจึงสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อม

$$E + S \rightarrow [ES] \rightarrow E + P \qquad (1)$$

E = enzyme

S = substrate

ES = enzyme-substrate complex

P = product

จากสมการที่ 1 จะเห็นได้ว่าหลังการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะได้เอนไซม์กลับคืนมาดังเดิม ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณสับสเตรทเริ่มต้นและสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์

3.1 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปส (EC. 3.1.1.3, glycerol ester hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นการพัฒนาในระดับของงานวิจัยต่างๆ หรือแม้กระทั่งการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าและระดับอุตสาหกรรม อีกทั้งการใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ได้จากสิ่งมีชีวิตยังเกิดผลดีต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้สารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสับสเตรทที่ใช้และการควบคุมสภาวะในการทำปฏิกิริยา เอนไซม์ไลเปสมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถเร่งปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เป็นสารไม่มีขั้วคือน้ำมันได้ ซึ่งทำให้สามารถนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งอาจจะผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายใน

และปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากพืชได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย ไลเปสในผลปาล์ม และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น ไลเปสจากสัตว์จะพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรัม สำหรับไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้มากเนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย ปัจจุบันไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและมีคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยโดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าได้หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 6 จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugosa* สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่นิยมผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ กลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* (วิภาวดี ปริพัฒนไพโรจน์, 2546)

Figure 7 แสดงปฏิกิริยาอันเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 ปฏิกิริยาหลักคือ ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมัน (hydrolysis) ซึ่งต้องอาศัยน้ำในการเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (esterification) ซึ่งมักเกิดในสภาวะที่มีน้ำน้อยเนื่องจากมีน้ำเป็นผลผลิตจากการเกิดปฏิกิริยา และปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ (transesterification) ซึ่งจำแนกออกได้เป็น 3 ปฏิกิริยาตามชนิดของสับสเตรทที่ใช้ ได้แก่ (1) ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่น (interesterification) เป็นการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ระหว่างสารเอสเทอร์ด้วยกัน เช่นการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรกลีเซอไรด์สองชนิด (2) ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส (alcoholysis) เป็นการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นสับสเตรท ซึ่งการผลิตไบโอดีเซลจัดอยู่ในปฏิกิริยาชนิดนี้ และ (3) ปฏิกิริยาอะซิโดไลซีส (acidolysis) ซึ่งเป็นการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ที่มีกรดอินทรีย์เป็นสับสเตรท

Table 6. Sample of commercialized lipases.

Type	Source	Another name	Company
	Mammalian lipase		
PPL	Porcine pancreas		Amano, Sigma, Fluka, Boehring Mannhein
CE (BSSL)	Pancreatic cholesterol esterase		Genzyme, Sigma
	Fungal lipase		
CRL	*Candida rugosa*	*Candida cylindracea*	Altus Biologics, Sangyo, Amano, Boehring,Mannheim
CAL-A	*Candida antartica A*		Boehring Mannheim, Novo Nordisk
CAL-B	*Candida antartica B*		Boehring Mannheim, Novo Nordisk
CLL	*Candida lipolytica*		Amano
GCL	*Geotrichum candidum*		
HLL	*Humicola lanuginosa*	*Thermomyces* I.	Boehring Mannheim, Novo Nordisk
PcamL	*Penicillium – camembertii*	*P. cyclopium*	Amano
ROL	*Rhizopus oryzae*	*R. javanicus, R. delemar, R. niveus*	Amano, Fluka, Sigma Seikagaku Kogyo Co
ANL	*Aspergillus niger*		Amano
ProqL	*Penicillium roqueforti*		Amano
	Bacterial lipase		
PCL	*Pseudomonas cepacia*	*Burkholderia cepacia*	Altus Biologics, Amano, Boehring Mannheim, Fluka, Sigma
PCL-AH	*Pseudomonas cepacia*		Amano
PFL	*Pseudomonas fluorescens*		Amano, Biocatalysts Ltd.
PfragiL	*Pseudomonas fragi*		Wako Pure Chemical
CVL	*Cromobacterium-viscosum*		Sigma, Genzyme, Asahi
	Pseudomonas sp.	*Pseudomonas glumae*	Chemical, Biocatalysts Ltd., Amano
BTL2	*Bacillus-thermocatenulatas*		Boehring Mannheim
	Alcaligenes species		Meito Sangyo

ที่มา: Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

i. Hydrolysis:

$$RCOOR' + H_2O \longrightarrow RCOOH + R'OH$$

ii. Esterification:

$$RCOOH + R'OH \longrightarrow RCOOR' + H_2O$$

iii. Transesterification:

(1). Interesterification

$$RCOOR' + R''COOR^* \longrightarrow RCOOR^* + R''COOR'$$

(2). Alcoholysis

$$RCOOR' + R''OH \longrightarrow RCOOR'' + R'OH$$

(3). Acidolysis

$$RCOOR' + R''COOH \longrightarrow R''COOR' + RCOOH$$

Figure 7. Lipase catalyzed reactions.

ที่มา: Gandhi (1997 อ้างโดย Reis *et al.* 2009)

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ละลายน้ำสามารถเร่งปฏิกิริยาของสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำได้และมีความคงตัวทั้งในสภาวะที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยแนวโน้มของการเร่งปฏิกิริยาจะมีสูงในสภาวะที่มีพื้นผิวระหว่างเฟสซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Interfacial activation โดยเกิดจากการที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มีโครงสร้างที่เรียกว่าฝาปิด (lid) หรือห่วง (loop) ซึ่งเป็นเกรียวของกรดอะมิโนที่จะคอยปิดหรือเปิดเพื่อควบคุมให้สับสเตรทได้เข้าไปสู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (Marangori, 2002) โดยฝาปิดและบริเวณเร่งของเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่างๆ จะมีความแตกต่างกันออกไปดังแสดงในดังภาพที่ 8

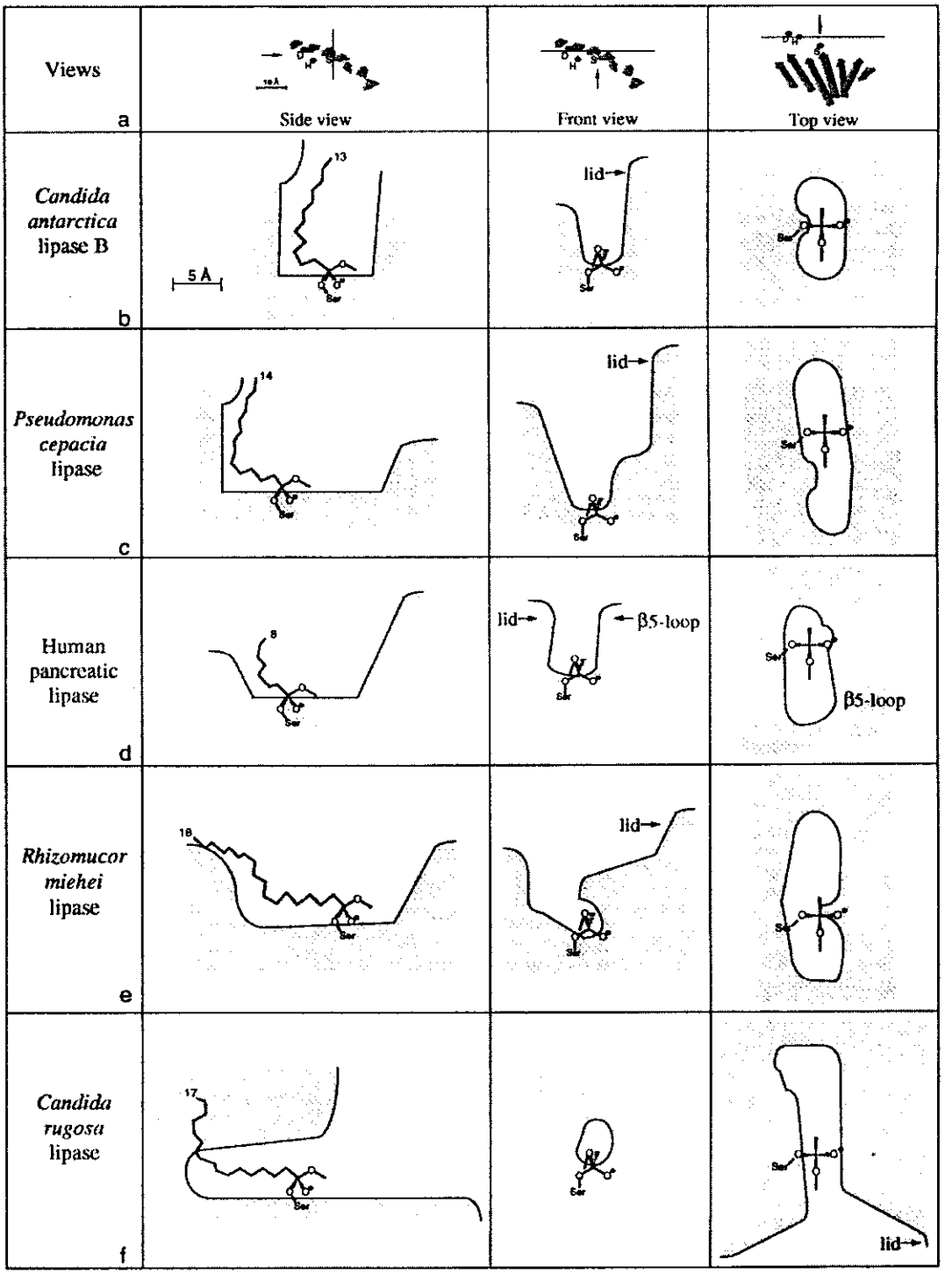


Figure 8. Shape of the binding site of lipases. (a) Orientation of the cross-sections which are planes perpendicular to the paper plane and indicated by a straight line. The direction of the view is indicated by an arrow. A number indicates the length of the longest fatty acid which completely binds inside the binding pocket.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Pleiss และคณะ (1998)

3.1.1 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

จากความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ได้ดังนี้

1) ความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนไตรกลีเซอไรด์ (regio or stereo-specificity) ตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันบนโมเลกุลของเอซิลกลีเซอรอลที่แตกต่างกันทำให้เกิดความจำเพาะของเอนไซม์ต่อโครงสร้างของน้ำมัน โดย Lai และคณะ (2000) ได้จำแนกเอนไซม์ไลเปสตามลักษณะของการเร่งปฏิกิริยาตามความจำเพาะออกได้ 2 ลักษณะคือ

- เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 ของพันธะเอสเทอร์ (1, 3-specific lipase) ตัวอย่างเอนไซม์ได้แก่ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus niger*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus javanicus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Alcaligenes* sp. เป็นต้น

- เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ (non-specific lipase) ตัวอย่างเอนไซม์ได้แก่ ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. และ *Candida rugosa*

2) ความจำเพาะต่อชนิดและความยาวของกรดไขมัน (type and chain length specification) เอนไซม์บางชนิดจะมีความจำเพาะต่อชนิดและความยาวของกรดไขมันซึ่งมีทั้งกรดไขมันสายสั้น ($C \leq 6$) กรดไขมันสายกลาง (C 8-10) และกรดไขมันสายยาว ($C \geq 14$) (Zhou *et al.*, 2000) รวมทั้งการมีพันธะคู่ในโมเลกุล ซึ่งจะส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาอาจจะไม่เกิดขึ้นหากน้ำมันที่ใช้ไม่ตรงกับความจำเพาะของเอนไซม์

Figure 9 แสดงความเป็นไปได้ในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ชนิด 1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol และ 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-glycerol ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum* sp. ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความจำเพาะของเอนไซม์ต่อชนิดและตำแหน่งของกรดไขมันบนไตรกลีเซอไรด์ เช่น หากเอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยสลาย 1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol ตามรูปแบบ a ก็แสดงว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันในตำแหน่งที่ 1 กับ 3 ของไตรกลีเซอไรด์เนื่องจากเกิดการย่อยกรดปาล์มิติกและโอเลอิกที่ตำแหน่ง 1 และ 3 ออกเหลือเพียงกรดปาล์มิติกในตำแหน่งที่ 2 หรือหากเอนไซม์ย่อยไตรกลีเซอไรด์ตามรูปแบบ c ก็แสดงว่ามีความจำเพาะในการย่อยสลายกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเนื่องจากเลือกย่อยเฉพาะกรดโอเลอิก เป็นต้น

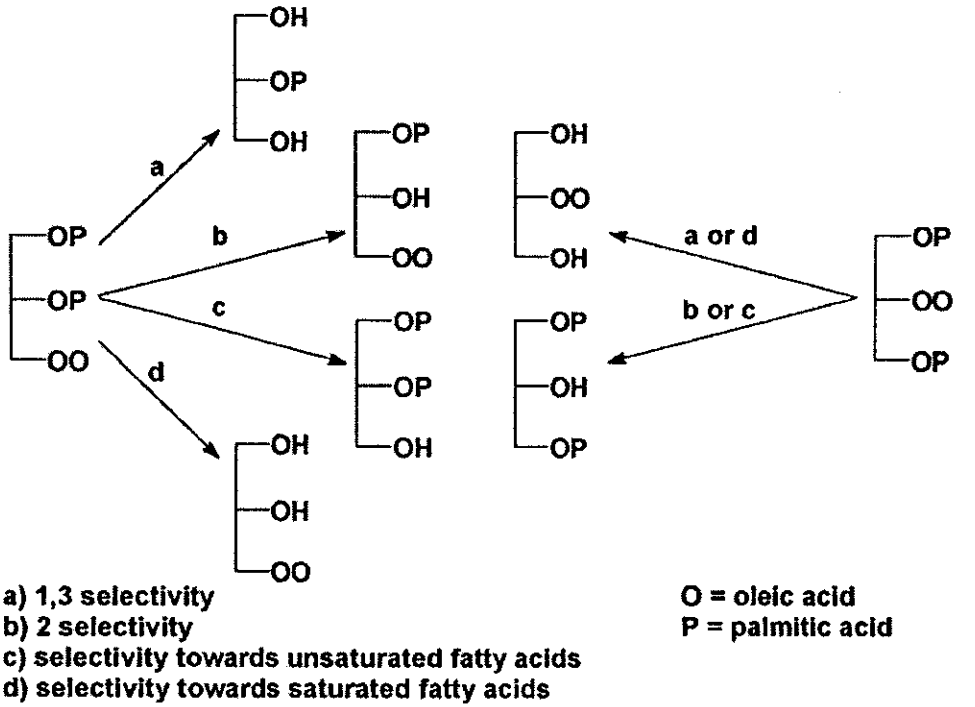


Figure 9. Hydrolysis of 1, 2-dipalmitoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol or 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-glycerol by crude lipase from *Geotrichum* sp.

ที่มา: Stransky และคณะ (2007)

Figure 10 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ รวมทั้งองค์ประกอบอื่นๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ โดยใช้สัญลักษณะ *sn*- แทนตำแหน่งต่างๆ ของกรดไขมันที่เกาะอยู่บนโครงสร้างของกลีเซอรอลและตัวอย่างแสดงสัญลักษณ์ของไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันปาล์มิติก (P) ลอริก (L) และโอเลอิก (O) เป็นองค์ประกอบ

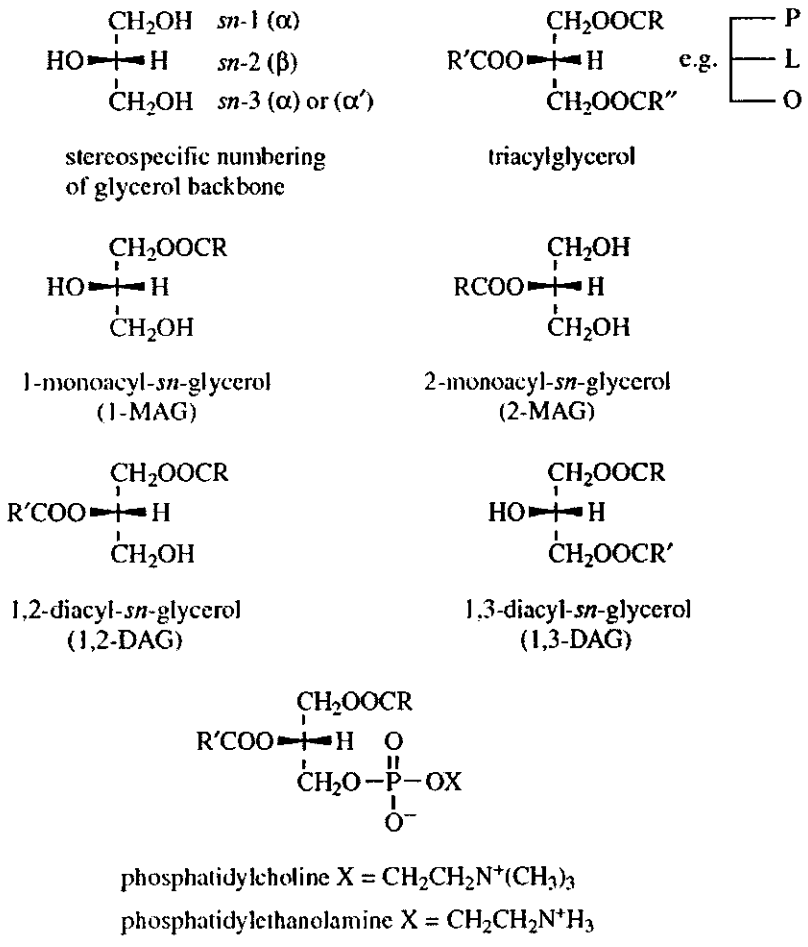


Figure 10. Structure and stereospecific numbering (*sn*) of acylglycerols.

ที่มา: Scrimgeour (2005)

เอนไซม์ไลเปสที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาได้ต่างกัน จากตารางที่ 7 เป็นตัวอย่างแสดงความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันต่อชนิดและตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ โดยพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะที่หลากหลายทั้งต่อกรดไขมันสายสั้น สายกลางและสายยาว ตลอดจนความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันซึ่งมีทั้งที่ไม่มีความจำเพาะคือสามารถย่อยสลายกรดไขมันได้ทุกตำแหน่ง ไปจนถึงมีความจำเพาะสูงต่อการย่อยสลายกรดไขมันเพียงหนึ่งตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เท่านั้น จากความจำเพาะที่ต่างกันของเอนไซม์ไลเปสทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตสารต่างๆ ได้หลากหลายดังแสดงในตารางที่ 8 โดยจากตารางจะเห็นได้ว่านอกจากเอนไซม์ไลเปสจะมีความจำเพาะในการย่อยสลายกรดไขมันแล้วยังพบความจำเพาะของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาอื่นๆ เช่น ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสและปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส เป็นต้น อีกทั้งยังพบความจำเพาะของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นของน้ำมันคือ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์อีกด้วย อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ยังมีข้อจำกัดในเรื่องราคาที่สูง อัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำและข้อจำกัดในด้านการละลายของสารละลายเอนไซม์ในน้ำมันทำให้การควบคุมปฏิกิริยาทำได้ยาก จึง

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

มีการคิดค้นวิธีการที่จะลดข้อจำกัดดังกล่าวโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวให้กลายเป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็ง ไม่ละลายน้ำ ทำให้ง่ายต่อการใช้งานอีกทั้งยังสามารถแยกเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้

Table 7. Specificity of lipases from different sources to types and position of fatty acid of triglyceride.

Source of lipase	Fatty acid specificity[a]	Positional specificity
Microorganisms		
Aspergillus niger	S, M, L	*sn*-1,3 >> *sn*-2
Candida antarctica	S > M, L	*sn*-3
Candida rugosa (syn. C. cylindracea)	S, L > M	*sn*-1,2,3
Chromobacterium viscosum	S, M, L	*sn*-1,2,3
Rhizomucor miehei	S > M, L	*sn*-1,3 >> *sn*-2
Penicillium roquefortii	S, M >> L	*sn*-1,3
Pseudomonas aeruginosa[b]	S, M, L	*sn*-1
Pseudomonas fluorescens	S, L > M	*sn*-1,2,3
Rhizopus delemar	S, M, L	*sn*-1,2,3
Rhizopus oryzae	M, L > S	*sn*-1,3 >> *sn*-2
Plants		
Rapeseed (*Brassica napus*)[c]	S > M, L	*sn*-1,3 > *sn*-2
Papaya (*Carica papaya*) latex[d]		*sn*-3
Animal tissues		
Porcine pancreatic	S > M, L	*sn*-1,3
Rabbit gastric[b]	S, M, L	*sn*-3

[a]: S, short chain; M, medium chain; L, long chain

[b]: Data from Villeneuve *et al.* (1995)

[c]: Data from Hills and Mukherjee (1990)

[d]: Data from Villeneuve *et al.* (1995)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Godfrey (1995 อ้างโดย Warner, 2008)

Table 8. Major specificities of lipases and their applications.

Specificity	Lipases	Production of
Regio specificity		
1,3-Regio specific	*Rhizomucor miehei* *Rhizopus oryzae*	triglyceride synthesis
	Rhizopus arrhizus	1,2(2,3)-diglycerides by triglyceride hydrolysis
	Rhizopus delemar	1,3-diglyceride by fatty acid (directed) esterification
	Rhizopus niveus	
	Porcine pancreatic lipase	2-monoglycerides by triglyceride hydrolysis 1(3)-monoglycerides by fatty acid esterification
Non-specific	*Candida rugosa* *Chromobacterium viscosum*	fatty acid production by hydrolysis
	Pseudomonas fluorescens *Pseudomonas cepacia*	mono- and diglycerides by directed glycerolysis
Fatty acid specific		
Long chain poly-unsaturated acids	*Geotrichum candidum* *Candida rugosa*	Selective hydrolysis
Saturated acids	*Fusarium oxysporum*	Selective hydrolysis
cis-Δ9 unsaturated acids	*Geotrichum candidum B*	Selective hydrolysis
Short acids	*Cuphea* sp.	Selective hydrolysis
Acylglycerol specific		
Monoacylglycerols	Potato acylhydrolase (patatin)	Monoglycerides by fatty acid esterification
Mono- and diacylglycerols	*Penicillium camembertii*	Mono- and diglycerides by fatty acid esterification
	Penicillium cyclopium M1 *Fusarium* sp.	
Triacylglycerols	*Penicillium roquefortii*	1,2-Diglycerides by triglyceride hydrolysis or alcoholysis
	Penicillium cyclopium M1 *Penicillium expansum*	

ที่มา: Diks และ Bosley (2000)

3.1.2 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล

ปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลประกอบไปด้วยสับสเตรท 2 ชนิดคือน้ำมันและแอลกอฮอล์ ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์จึงมีความซับซ้อนมากกว่าปกติเนื่องจากเอนไซม์สามารถจับกับสับสเตรทได้ครั้งละ 1 ชนิด ดังนั้นจึงมีผู้สนใจศึกษาถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลโดย Al-Zuhair (2005) กล่าวว่าการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์สามารถอธิบายได้ด้วยแบบจำลองของสมการในทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่ชื่อ Ping-Pong kinetic model ดังแสดงในภาพที่ 11 โดยเอนไซม์ (E) จะเข้าจับกับสับสเตรทตัวแรกคือน้ำมัน (S) กรณีนี้เป็นไตรกลีเซอไรด์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (E.S) จากนั้นเอนไซม์จะย่อยน้ำมันและปล่อยกลีเซอรอลที่ถูกย่อยแล้วออกมา แต่ยังคงจับกับกรดไขมันอยู่ (E.F) จากนั้นจึงจับกับโมเลกุลของแอลกอฮอล์ (A) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (E.F.A) และเอนไซม์จะทำปฏิกิริยาเกิดเป็นผลผลิต (E.Bd.G) และปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกลีเซอรอล (G) และเอสเทอร์หรือไบโอดีเซล (Bd) ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถจับกับแอลกอฮอล์ (E.A) แต่ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ โดยค่า k แสดงถึงค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาของแต่ละปฏิกิริยา

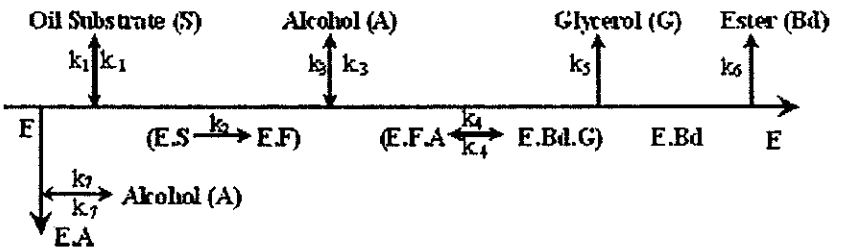


Figure 11. Graphical representation of the mechanismic steps of triglyceride ester-bond transesterification.

E: enzyme, F: intermediate product, Bd: biodiesel

ที่มา: Al-Zuhair (2005)

3.2 เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล

เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันจะเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เนื่องจากมีข้อได้เปรียบที่สามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากและในระยะเวลาอันรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแหล่งอื่นๆ ความแตกต่างของสายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลดังแสดงในตารางที่ 9

Table 9. Source of free and immobilized lipases used for biodiesel production.

Lipase source	Commercial name	Supplier	Support	Reference
Candida antarctica	SP435	Novo	Acrylic resin[(a)]	Nelson *et al.*, 1996
	Novozym 435	Novo	Acrylic resin[(a)]	Shimada *et al.*, 1996
	Chirazyme L-2	Roche	None	Lee *et al.*, 2002
Candida cylindracea	OF	Meito Sangyo	None	Lara and Park 2004
Candida rucosa	-	Meito Sangyo	None	Kaieda *et al.*, 2001
Chromobacteriun viscosum	-	Asahi	Celite-545[(b)]	Shah *et al.*, 2004
Cryptococcus spp. S-2	Lipase produced in the researcher' laboratory		None	Kamini and Iefuji 2001
Pocine pancreatic	-	Sigma	Anion exchange resin	Yesiloglu, 2004
Pseudomonas cepacia	PS	Amano	Sol-gel matrix[(b)]	Noureddini *et al.*, 2005
	PS	Amano	None	Kaieda *et al.*, 2001
	PS-30	Amano	None	Abigor *et al.*, 2000
	PS-30	Amano	Pyllosilicate sol-gel matrix [(b)]	Hsu *et al.*, 2002
	PS-D	Amano	Diatomaceous earth[(a)]	Salis *et al.*, 2005b
Pseudomonas fluorescence	-	Rhom GmbH	None	Mittlebach, 1990
	AK	Amano	None	Kaieda *et al.*, 2001
	AK	Amano	Porous kaolinite[(b)]	Iso *et al.*, 2001
	AK	Amano	Polypropylene EP100[(b)]	Soumanou and Bornscheuer, 2003b
Mucor Miehei	Lipozyme IM60	Novo	Anion exchange resin[(a)]	Nelson *et al.*, 1996
Rhizopus oryzae	F-AP15	Amano	None	Kaieda *et al.*, 1999
Thermomyces lanuginosa	Lipozyme TL IM	Novo	Acrylic resin[(a)]	Du *et al.*, 2003
	-	Novo	Pyllosilicate sol-gel matrix[(b)]	Hsu *et al.*, 2004b

[(a)]: Commercially available immobilised lipases.

[(b)]: Lipases immobilised by researchers in their own laboratories.

b: reference no.2

ที่มา: Salis และคณะ (2007)

3.3 การตรึงรูปเอนไซม์

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมีหรือ ไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้น หรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนสถานะจากตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็ง (solid catalyst) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) การตรึงเอนไซม์กับสารที่ใช้ยึดเกาะโดยที่เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมอยู่ทำให้สะดวกในการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ ทั้งยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้งและเหมาะสำหรับการใช้ในระบบต่อเนื่อง กระบวนการตรึงเอนไซม์สามารถทำได้หลายวิธีโดยอาศัยกระบวนการต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 12 ซึ่งแบ่งได้ 2 กลุ่มหลักคือ การตรึงเอนไซม์ให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายกับการตรึงเอนไซม์ให้อยู่ในรูปสารละลาย โดยการตรึงเอนไซม์ให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายสามารถแบ่งได้เป็นสองแบบคือ การตรึงด้วยวิธีจับยึดกับการตรึงด้วยวิธีห่อหุ้ม

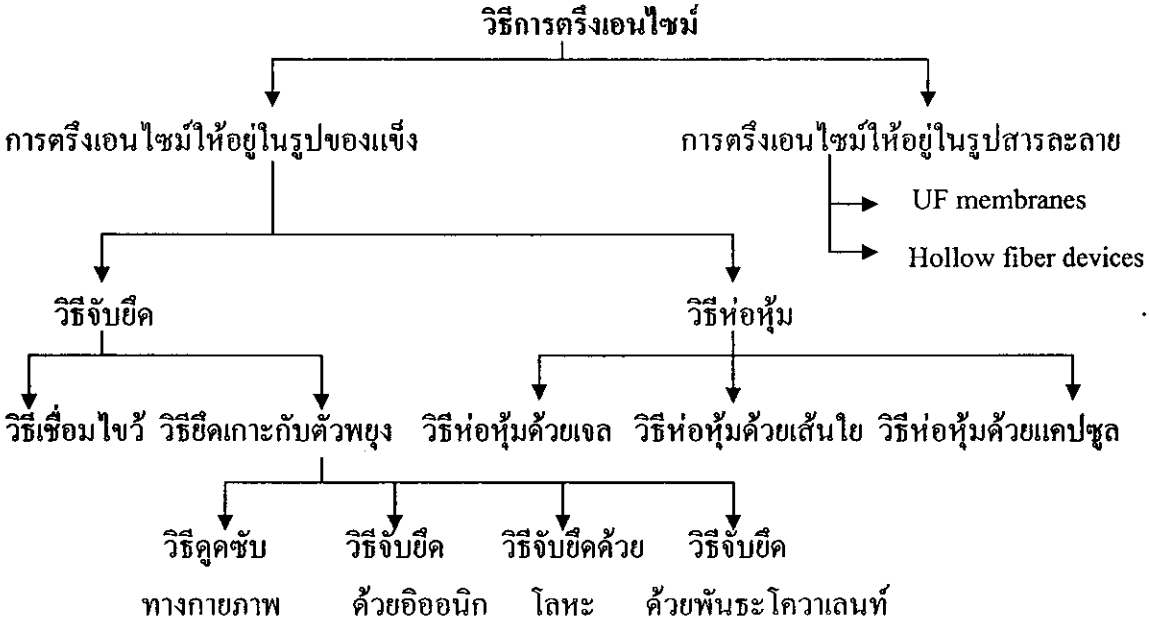


Figure 12. Method of enzyme immobilization.

ที่มา: Kennedy และ Cabral (1987)

การตรึงเอนไซม์ต้องคำนึงถึงหลายปัจจัยทั้งก่อนและหลังการตรึงรูปซึ่งล้วนส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์หลังการตรึงรูปทั้งสิ้น โดยภาพที่ 13 เป็นการแสดงภาพรวมของกระบวนการตรึงเอนไซม์ ที่ต้องพิจารณาตั้งแต่ตัวเอนไซม์ที่จะใช้ในการตรึงรูปในเรื่องของกิจกรรม ความคงตัวและความจำเพาะในการทำปฏิกิริยา ตัวพยุงที่ใช้ในการตรึงก็ควรพิจารณาถึงคุณลักษณะทั้งทางเคมีและทางกายภาพ การปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ตลอดจนขั้นตอนการปฏิบัติที่ถูกต้องหลังการตรึงเอนไซม์เพื่อไม่ให้เอนไซม์เสียกิจกรรมหลังการตรึงรูปและมีความคงตัวต่อสภาวะที่จะนำไปใช้ในอนาคต

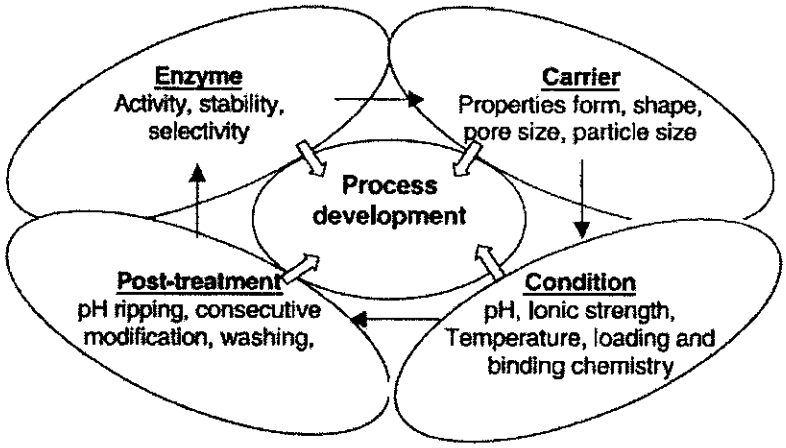


Figure 13. Illustration of general procedures for enzyme immobilization.
ที่มา: Cao (2005)

3.3.1 การตรึงแบบจับยึด (Adsorption method)

การตรึงแบบจับยึดโดยเฉพาะวิธียึดเกาะกับตัวพยุงเป็นวิธีที่นิยมใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปส เป็นการตรึงโดยการเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำโดยสามารถแบ่งได้เป็น 4 แบบคือ

1) วิธีดูดซับทางกายภาพ (physical-adsorption method) เป็นการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน แรงวานเดอร์วาล (vanderwals force) และแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ซึ่งยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับผิวของตัวพยุงที่เป็นของแข็ง (solid support)

2) วิธีจับยึดด้วยพันธะอิออนิก (ionic-binding method) เป็นการตรึงเอนไซม์ด้วยแรงดึงดูดประจุเป็นวิธีที่ง่ายและมีใช้กันมานาน วิธีนี้อาศัยหลักการดึงดูดประจุของเอนไซม์กับตัวพยุงที่มีส่วนของโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยนอิออนได้ นอกจากนี้ยังมีแรงวานเดอร์วาลเป็นตัวจับยึดเอนไซม์ไว้กับตัวพยุง

3) วิธีจับยึดด้วยโลหะ (metal-binding method) เป็นการตรึงโดยอาศัยโลหะทรานซิชันส่วนมากเป็นเกลือของไททาเนี่ยม และเซอโคเนียม เนื่องจากออกไซด์ของโลหะเหล่านี้ไม่มีพิษ

4) วิธีจับยึดด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent-binding method) เป็นการตรึงเอนไซม์โดยอาศัยการเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนต์ วิธีนี้กระทำได้ยากเนื่องจากปฏิกิริยาซับซ้อนและรุนแรง แต่การเชื่อมพันธะมีความแข็งแรงสูง

3.3.2 การตรึงแบบห่อหุ้ม (Entrapment method)

การตรึงแบบห่อหุ้มเป็นการตรึงเอนไซม์อิสระไว้ภายในช่องว่างของตาข่ายหรือห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ด้วยเยื่อบางๆ ที่ยอมให้สารบางตัวผ่านเข้าออกได้ โดยจะยอมให้มีการแพร่เข้าออกของโมเลกุลของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ วิธีการห่อหุ้มด้วยเจล วิธีการห่อหุ้มด้วยเส้นใย และวิธีการห่อหุ้มด้วยแคปซูลขนาดเล็ก (Kennedy and Cabral, 1987)

อย่างไรก็ตามวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ การใช้วิธีดูดซับทางกายภาพเนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและต้นทุนต่ำอีกทั้งการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้จะอาศัยการจับกันของเอนไซม์กับผิวของตัวพยุงที่เป็นของแข็งด้วยพันธะอ่อนๆ (พันธะไฮโดรเจน, แรงวานเดอร์วาล และแรงไฮโดรโฟบิก) ซึ่งจะมีผลต่อรูปร่างของโมเลกุลเอนไซม์หรือบริเวณเร่งน้อยมาก

3.4 ตัวพยุงสำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปส

ตัวพยุงแต่ละชนิดมีวิธีการตรึงที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป คุณสมบัติของตัวพยุงที่ดีคือ มีพื้นที่ผิวสำหรับการยึดเกาะมาก มีคุณสมบัติในการคัดเลือกการซึมผ่านของสาร (permeability) มีลักษณะชอบน้ำ (hydrophilicity) แต่ไม่ละลายในน้ำ มีความคงตัวต่อสารเคมี แรงกลและความร้อน มีความแข็งแรง มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสม สามารถป้องกันการถูกทำลายจากจุลินทรีย์ได้ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Kennedy and Cabral, 1987) โดยตัวพยุงมีทั้งชนิดที่มีรูพรุนให้เอนไซม์สามารถเข้าไปอยู่ในรูพรุนเหล่านั้นและตัวพยุงที่ไม่มีรูพรุน ผลิตได้จากวัสดุหลากหลายชนิดทั้งที่มีอยู่ในธรรมชาติและผ่านการสังเคราะห์ขึ้น เอนไซม์ไลเปสสามารถตรึงรูปบนตัวพยุงได้หลายชนิดเช่นกันหนึ่งในนั้นก็คือตัวพยุงที่เป็นเม็ดพอลิเมอร์

แอคคูเรล (accurel) เป็นตัวพยุงเอนไซม์ทางการค้าที่เป็น porous polypropylene ซึ่งมีรูพรุนหลากหลายขนาดและมีหมู่ฟังก์ชั่นเป็นสารไม่มีขั้ว (Salis *et al.*, 2009) ที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เนื่องจากแอคคูเรลเป็นตัวพยุงที่มีพื้นที่ผิวในการยึดเกาะของเอนไซม์มาก ทั้งยังเป็นสารที่ไม่มีขั้วจึงไม่ละลายน้ำทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้และการนำกลับมาใช้ใหม่ ตารางที่ 10 แสดงขนาดอนุภาคของแอคคูเรลขนาดต่างๆ รวมทั้งขนาดของรูพรุนที่ต่างกันไป โดยจะเห็นได้ว่าค่าที่นำมารายงานส่วนใหญ่จะเป็นค่าเฉลี่ยเนื่องจากขนาดของตัวพยุงมีความไม่แน่นอนอาจเล็กหรือใหญ่กว่าที่รายงาน และจะเห็นได้ว่าขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นส่งผลให้รูพรุนของตัวพยุงมีขนาดใหญ่ขึ้นตามไปด้วยซึ่งจะส่งผลให้คุณสมบัติในการตรึงเอนไซม์มีความแตกต่างๆ กันออกไป

Table 10. Granulometric analysis of different accurel materials.

Accurel sample	Particle size[a] (μm)	Span[b]	Average pore diameter (μm)	Range pore diameter (μm)
Accurel EP 100, <200 μm	200	1.1	9[c]	4-17[c]
Accurel EP 100, 200-350 μm	230	1.0	11[c]	8-15[c]
Accurel MP 1001, 400-1000 μm	440	0.81	23[d]	12-35[d]
Accurel MP 1000, <1500 μm	610	1.5	25[d]	12-35[d]

[a] Determined by laser light scattering, presented as the volume median diameter $d(0.5)$.

[b] Size distribution is expressed as span = $d(0.5)/[d(0.9) - d(0.1)]$.

[c] Measured manually on SEM picture with magnification 500×.

[d] Measured on SEM picture with magnification 100×.

ที่มา: Sabbani และคณะ (2006)

โดยจากงานวิจัยของ Kaewthong (2004) ซึ่งได้ศึกษาการน้ำเอนไซม์ Lipase PS ที่ตรึงรูปบนแอครูเรลไปใช้ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลและได้ศึกษาถึงปัจจัยของชนิดของตัวพยุงต่อการตรึงเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized activity) และผลผลิตหลังการตรึง (Immobilized yield) พบว่าเอนไซมที่ตรึงรูปบนแอคคูเรลขนาดเล็กคือขนาดอนุภาคน้อยกว่า 200 ไมโครเมตร(Accurel EP 100, <200 μm) จะสามารถตรึงเอนไซม์ได้ดีกว่าแอคคูเรลขนาดใหญ่คือขนาดอนุภาคระหว่าง 200 ถึง 400 ไมโครเมตร (Accurel EP 100, 200-450 μm) โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปเป็น 0.37 และ 0.30 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของตัวพยุงและให้ผลผลิตหลังการตรึงรูปเป็นร้อยละ 37 และ 31 ตามลำดับภาพที่ 14 แสดงลักษณะของแอคคูเรลขนาดต่าง ๆ ภายใต้กล้อง Scanning electron microscopy (SEM) เผยให้เห็นถึงลักษณะของรูพรุนขนาดเล็กในตัวพยุงซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

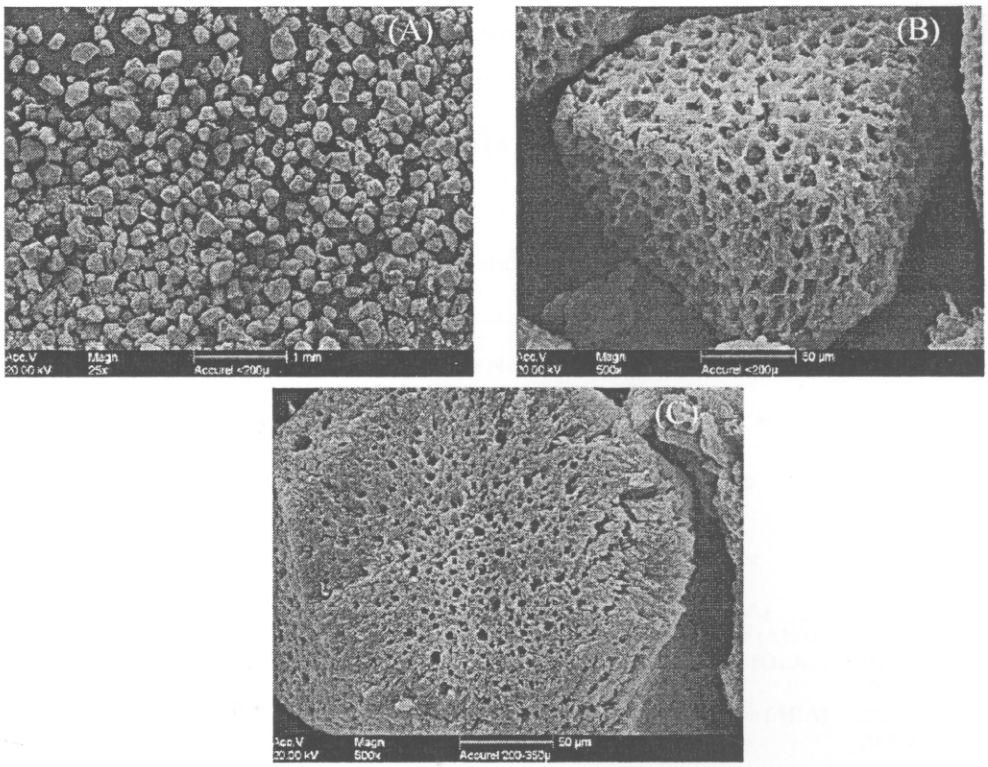


Figure 14. SEM of Accurel EP 100 in different particle sizes (p).

A : p <200 μm at a magnification of 25×

B: p <200 μm at a magnification of 500×

C : p 200–350 μm at a magnification of 500×

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sabbani และคณะ (2006)

4. ชนิดของน้ำมัน

น้ำมันที่สามารถนำมาผลิตไบโอดีเซลมีด้วยกันหลากหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นน้ำมันจากพืช น้ำมันจากสัตว์ หรือน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้ว การนำมาใช้จะมีความแตกต่างกันไปตามคุณสมบัติของวัตถุดิบน้ำมันแต่ละชนิดโดยแบ่งเป็นน้ำมันบริสุทธิ์และน้ำมันใช้แล้ว

4.1 น้ำมันบริสุทธิ์

โดยส่วนใหญ่แล้วน้ำมันที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลจะเป็นน้ำมันจากพืช เนื่องจากในน้ำมันพืชมีองค์ประกอบหลักเป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) หรือ ไตรโอเลอิน (triolein) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid ester) หรือไบโอดีเซลนั่นเอง พืชที่สามารถนำมาสกัดน้ำมันที่จะใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมีหลายประเภท ไม่ว่าจะเป็นธัญพืช พืชดอก และพืชให้น้ำมันอื่น ๆ ตัวอย่างน้ำมันพืชที่ใช้ได้แก่

- พืชน้ำมัน เช่น ปาล์ม (palm oil) ถั่วเหลือง (soybean oil) ถั่วลิสง (peanut oil) ข้าวโพด (corn oil)

- พืชดอก เช่น ดอกทานตะวัน (sunflower oil) ดอกคำฝอย (safflower oil) น้ำมันจากเมล็ดเรป (rapeseed oil) ฝ้าย (cottonseed oil)

องค์ประกอบหลักของน้ำมันพืชคือ กรดไขมันซึ่งมีโครงสร้างและการเรียกชื่อดังตารางที่ 11

Table 11. Structure, systematic, trivial, and shorthand names of some common fatty acids.

Structure	Systematic Name	Trivial Name/ Abbreviation	Shorthand Name	n- or ω
$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Dodecanoic	lauric	12:0	
$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Tetradecanoic	myristic	14:0	
$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Hexadecanoic	palmitic	16:0	
$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	*Z*-9-hexadecenoic	palmitoleic	16:1 9*c*	7
$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Octadecanoic	stearic	18:0	
$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	*Z*-9-octadecenoic	oleic	18:1 9*c*	9
$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$	*Z*-11-octadecenoic	*cis*-vaccenic	18:1 11*c*	7
$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$	*E*-11-octadecenoic	vaccenic	18:1 11*t*	7
$CH_3(CH_2)_3(CH_2CH=CH)_2(CH_2)_7COOH$	*Z,Z*- 9,12-octadecadienoic	linoleic (LA)	18:2 9*c*,12*c*	6
$CH_3(CH_2CH=CH)_3(CH_2)_7COOH$	*Z,Z,Z*- 9,12,15-octadecatrienoic	α-linolenic (ALA)	18:3 9*c*,12*c*,15*c*	3
$CH_3(CH_2)_3(CH_2CH=CH)_3(CH_2)_4COOH$	*Z,Z,Z*- 6, 9,12-octadecatrienoic	γ-linolenic (GLA)	18:3 6*c*,9*c*,12*c*	6
$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	eicosanoic[a]	arachidic	20:0	
$CH_3(CH_2)_3(CH_2CH=CH)_4(CH_2)_3COOH$	*Z,Z,Z,Z*- 5,8,11,14-eicosatetraenoic[a]	arachidonic (ARA)	20:4 5*c*,8*c*,11*c*,14*c*	6
$CH_3(CH_2CH=CH)_5(CH_2)_3COOH$	*Z,Z,Z,Z,Z*- 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic[a]	EPA	20:5 5*c*,8*c*,11*c*,14*c*,17*c*	3
$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	docosanoic	behenic	22:0	
$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{11}COOH$	*Z*-13-docosenoic	erucic	22:1 13*c*	9
$CH_3(CH_2CH=CH)_6(CH_2)_2COOH$	*Z,Z,Z,Z,Z,Z*- 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	DHA	22:6 4*c*,7*c*, 10*c*,13*c*,16*c*,19*c*	3
$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	tetracosanoic	lignoceric	24:0	
$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$	*Z*-15-tetracosenoic	nervonic	24:1 15*c*	9

[a] : Icosa- replaced eicosa- in systematic nomenclature in 1975, but the latter is still widely used in the current literature.

ที่มา: Scrimgeour และ Harwood (2005)

โดยกรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated Fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated Fatty acid) สัดส่วนของกรดไขมันในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 12

Table 12. Iodine value and fatty acid content of the major commodity oils.

Type of oil	Iodine value	Fatty acid						
		C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Palm oil	14.1-21.0	ND-0.5	0.5-2.0	39.3-47.5	3.5-6.0	36.0-44.0	9.0-12.0	ND-0.5
Palm olein	≥ 56	0.1-0.5	0.5-1.5	38.0-43.5	3.5-5.0	39.8-46.0	10.0-13.5	ND-0.6
Palm sterin	≤ 48	0.1-0.5	1.0-2.0	48.0-74.0	3.9-6.0	15.5-36.0	3.0-10.0	0.5
Palm kernel	50.0-55.0	45.0-55.0	14.0-18.0	6.5-10.0	1.0-3.0	12.0-19.0	1.0-3.5	ND-0.2
Coconut	6.3-10.6	45.1-53.2	16.8-21.0	7.5-10.2	2.0-4.0	5.0-10.0	1.0-2.5	ND
Peanut	86-107	ND-0.1	ND-0.1	8.0-14.0	1.0-4.5	35.0-67.0	13.0-43.0	ND-0.3
Jatropha	101	ND	ND	14.9	6.0	41.2	37.4	ND
Rape seed	94-120	ND	ND-0.2	1.5-6.0	0.5-3.1	8.0-60.0	11.0-23.0	5.0-13.0
Soybean	124-139	ND-0.1	ND-0.2	8.0-13.5	2.0-5.4	17.7-28.0	49.8-59	5.0-11.0

ที่มา: ธราพงษ์ วิทิตศานต์ และคณะ (2546)

จากความแตกต่างของกรดไขมันในน้ำมันแต่ละชนิดทำให้คุณสมบัติของน้ำมันมีความแตกต่างกัน น้ำมันพืชส่วนใหญ่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในกรดไขมันระหว่าง 12 ถึง 18 และมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวที่แตกต่างกัน น้ำมันพืชที่มีกรดไขมันอิ่มตัวในปริมาณสูงจะมีค่าไอโอดีนต่ำ และเมื่อมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวลดลงหรือมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงขึ้นค่าไอโอดีนจะสูงขึ้นตามลำดับ น้ำมันพืชเป็นสารที่ไม่อยู่ตัวเมื่อสัมผัสกับอากาศจะถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรซ์ได้ที่อุณหภูมิสูง เมื่อเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรซ์แล้วน้ำมันจะมีสภาพเป็นสารเหนียวขึ้น โดยทั่วไปค่าไอโอดีนของน้ำมันพืชจะเป็นดัชนีบอกถึงปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีอยู่ในน้ำมันนั้นๆ ซึ่งบอกถึงความยากง่ายของการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรซ์ด้วย เมื่อค่าไอโอดีนสูงจะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรซ์ง่าย ฉะนั้นการเลือกใช้น้ำมันพืชที่มีค่าไอโอดีนต่ำเป็นเชื้อเพลิงจะเป็นการป้องกันการเกิด

สารเหนียวที่เกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรซ์ในเครื่องยนต์ได้ในเบื้องต้น (คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

น้ำมันที่น่าสนใจในการนำมาผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยคือน้ำมันปาล์มซึ่งได้มาจากปาล์มน้ำมัน (*Elaies guineensis*) ซึ่งเป็นพืชเศรฐกิจที่สำคัญของประเทศ การเพาะปลูกปาล์มน้ำมันมีมากในจังหวัดทางภาคใต้ โดยนิยมปลูกกันมากในจังหวัด กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูลและตรัง ผลผลิตของปาล์มน้ำมันจะถูกนำไปแปรรูปเป็นน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี

กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมี 3 วิธี คือกระบวนการผลิตแบบใช้ไอน้ำ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน กระบวนการผลิตแบบย่างผลปาล์มหรือหีบน้ำมันผสม และกระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม ซึ่งจะได้น้ำมันปาล์ม 2 ชนิดหลักๆ คือ ถ้าได้จากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (Palm kernel) เรียกว่า น้ำมันเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) ส่วนที่ได้จากเส้นใยข้างนอกผลปาล์ม (mesocarp) เรียกว่า น้ำมันปาล์ม (palm oil) เมื่อนำน้ำมันปาล์มไปแยกส่วนและทำให้บริสุทธิ์จะได้ส่วนของของเหลวที่เรียกว่าน้ำมันปาล์มโอเลอีน (palm olein) ซึ่งเป็นน้ำมันปาล์มที่ใช้กันทั่วไป และได้ส่วนของของแข็งที่เรียกว่าปาล์มสเตียริน (palm stearin)

น้ำมันปาล์มมีส่วนประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปาล์ม พื้นดินบริเวณเพาะปลูก และภูมิอากาศ น้ำมันเมล็ดปาล์มและน้ำมันปาล์มมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยน้ำมันจากเมล็ดปาล์มจะมีร้อยละของกรดไขมันอิ่มตัวสูงที่ร้อยละ 78.82 ในขณะที่น้ำมันปาล์มมีเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 48.05 และ 51.95 ตามลำดับ

Table 13. Chemical property of palm oil.

Property of palm oil	Palm kernel oil	Palm oil
Iodine value	14-20	43-59
Acid value	20	15
Saponification value	240-257	195-210
Unsaponification matter (%)	1	1
Color (Lovibond)	10Y:1R25	Y:2.5R
Total saturated fatty acid (%)	78.82	48.05
Total unsaturated fatty acid (%)	21.18	51.95

ที่มา : ดัดแปลงจากไพจิตร จันทรวงศ์ (2530) อ้างโดย วิภาวดี ปริพัฒนไพโรจน์ (2546)

จากการที่น้ำมันปาล์มโอเลอีนมีองค์ประกอบหลักเป็นกรดปาล์มิติกและกรดโอเลอิก เมื่อเกิดการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันจึงเกิดเป็นไดกลีเซอไรด์ในรูปแบบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 14 โดยไดกลีเซอไรด์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไปตามชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ

Table 14. Melting and crystallization peaks of diglycerides by differential scanning calorimetry.

Diglyceride	Fusion peak (°C)	Melting point (°C)	Crystallization peak (°C)	Onset of crystallization (°C)
1,2 PP	50.7	52.5	47.4	50.0
1,3 PP	71.5	75.0	62.5	65.0
1,2 0 0	22.7	26.0	3.2	10.0
1,3 0 0	24.6	28.3	10.9	15.7
1,2 PO	51.5	54.0	47.5	49.8
1,3 PO	41.7	45.3	28.0	30.6
PDG	22.8, 30, 43	47.0	-15, 9, 26.7	32.0

PDG: palm diglyceride mixture

ที่มา: Siew และ Ng (2000)

4.2 น้ำมันที่ใช้แล้ว

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของน้ำมันหรือไขมันระหว่างทอดที่เห็นได้ชัด คือน้ำมันเป็นสีดำ ความหนืดเพิ่มขึ้น จุดเกิดควันลดลง เกิดฟองเพิ่มขึ้น เมื่อไขมันได้รับความร้อนจะมีการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาเคมีใน 3 รูปแบบคือ (มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด, 2535)

1) การไฮโดรไลซ์ไขมันทำให้เกิดกรดไขมันอิสระโมโนและไดกลีเซอไรด์

2) การออกซิไดซ์ไขมัน ทำให้เกิดสารประกอบหลายชนิดซึ่งระเหยได้ เช่น ไฮโดรเพอออกไซด์ (hydroperoxide) คอนจูเกตเดทไดอีโนอิกแอซิด (conjugated dienoic acid) อีพอกไซด์ (epoxide) ไฮดรอกไซด์และคีโทน สารประกอบเหล่านี้อาจเกิดการแตกตัวต่อไปอีกหรืออาจจะยังคงเป็นโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และเกิดพันธะข้าม (cross-link) ซึ่งกันและกันทำให้เกิดไดเมอริกและโพลิเมอร์ไตรกลีเซอไรด์ที่สูงขึ้น

3) การเกิดพันธะใหม่ระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอนโดยไม่มีอะตอมของออกซิเจนในโมเลกุลของไขมัน ถ้าพันธะเหล่านี้เกิดขึ้นในกรดไขมัน 1 โมเลกุลจะทำให้เกิดกรดไขมันแบบต่อกันเป็นวง (cyclic fatty acid) ถ้าเกิดพันธะระหว่างกรดไขมัน 2 โมเลกุล อาจเกิดภายในโมเลกุลเดียวกันหรือ

ระหว่างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ทำให้เกิดกรดไดเมอริกและถ้าเกิดพันธะข้ามระหว่างโมเลกุลเหล่านี้ต่อไปก็ทำให้เกิดพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นอีก

สารประกอบที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงในน้ำมันทอดที่กล่าวแล้วข้างต้นสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

- สารประกอบสลายตัวที่ระเหยได้ (volatile decomposed product) สามารถกลั่นแยกออกจากน้ำมันที่ใช้ทอดได้

- สารประกอบสลายตัวที่ไม่ระเหย (nonvolatile decomposed product) สารที่ไม่ระเหยเหล่านี้ยังคงอยู่ในน้ำมันทอด และจะเสื่อมสลายต่อไปทุกครั้งที่ใช้น้ำมันนี้ทอดอาหาร และอาหารจะดูดซึมสารเหล่านี้ไว้ เชื่อกันว่าถ้าใช้น้ำมันทอดหลายๆ ครั้งจะทำให้เกิดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสะสมอยู่ในน้ำมันและไม่ระเหย ทำให้ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันเปลี่ยนไป คือ ความหนืดเพิ่มขึ้น เกิดสีและฟอง ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ได้แก่ปริมาณกรดไขมันอิสระ ค่าคาร์บอนิล ปริมาณไฮดรอกซิล และค่าซาปอนิฟิเคชั่นเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวลดลงดังแสดงในภาพที่ 15 และ 16

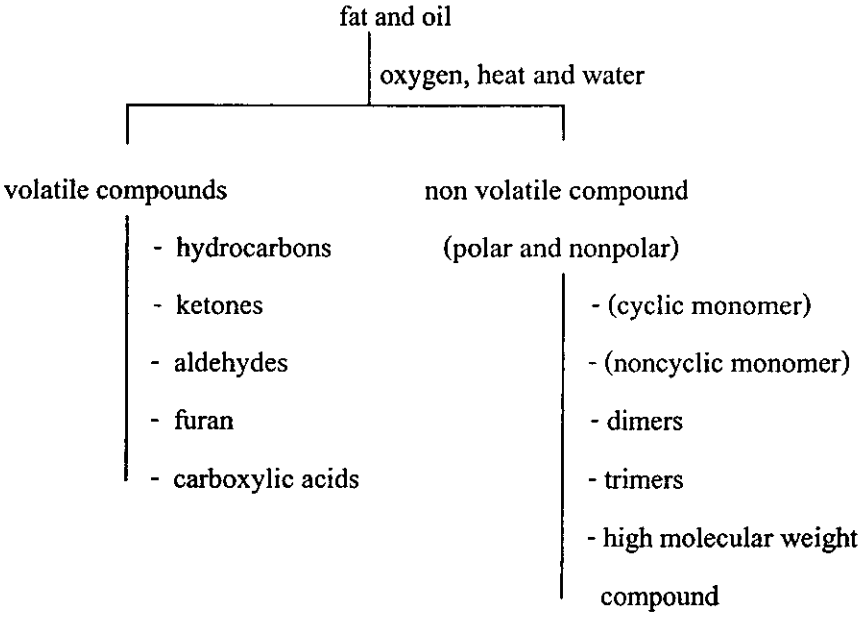


Figure 15. Degradation of frying oil.

ที่มา: ดัดแปลงจาก มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด (2535)

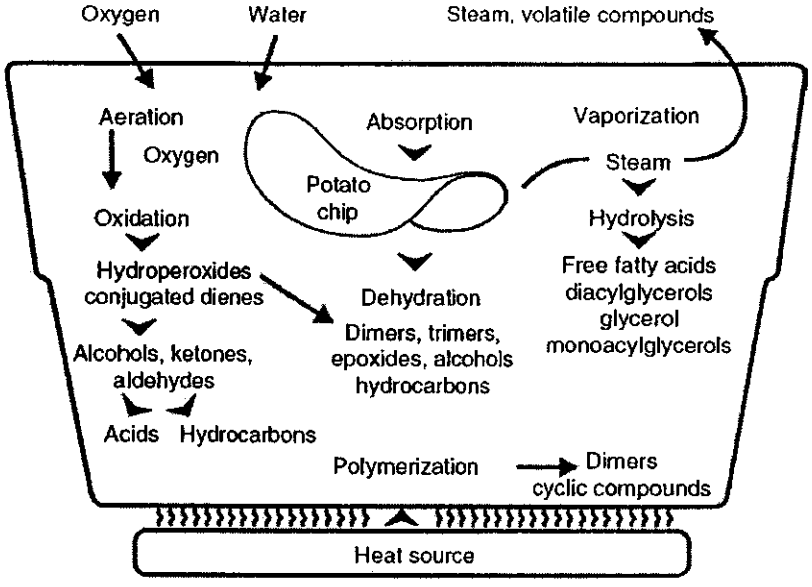


Figure 16. Physical and chemical reactions of oil that occur during frying.
ที่มา: Warner (2008)

ในการนำน้ำมันใช้แล้วมาผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทางเคมีจำเป็นต้องเตรียมน้ำมันที่ใช้แล้วก่อนการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทางเคมี เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วจะมีน้ำและส่วนของของแข็งที่เป็นกากหรือเศษอาหารจากการทอดรวมทั้งองค์ประกอบที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในการทำปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทางเคมีจะต้องมีขั้นตอนในการเตรียมน้ำมันดังนี้ (Cvengros and Cvengrosova, 2004)

(1) การล้างด้วยน้ำเพื่อแยกส่วนของแข็งที่เป็นกากหรือเศษอาหารซึ่งปนอยู่ในน้ำมันออก โดยของแข็งเหล่านั้นจะอยู่ในส่วนของน้ำด้านล่างซึ่งจะทำการแยกออกได้ง่ายขึ้น

(2) นำส่วนของน้ำมันที่อยู่ในส่วนของของเหลวไปให้ความร้อนเพื่อให้น้ำที่ปนอยู่ในน้ำมันระเหยออกไป

(3) ทำการ neutralization กรดไขมันด้วยด่างเพื่อให้เกิดสบู่

(4) แยกสบู่ออกด้วยเครื่อง decanter

(5) แยกส่วนที่เป็นพอลิเมอร์ด้วยการดูดซับด้วยถ่าน (active charcoal) หรือดินเหนียว (clay)

จะเห็นได้ว่าการเตรียมน้ำมันที่ใช้แล้วก่อนการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทางเคมี จะมีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยากเนื่องจากต้องกำจัดกรดไขมันและน้ำที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยากับตัวเร่งที่เป็นด่างในทางกลับกันการใช้วิธีทางเอนไซม์ไม่จำเป็นต้องกำจัดกรดไขมันเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาสูงดังนั้นขั้นตอนการเตรียมน้ำมันก่อนการผลิตไบโอดีเซลโดยเอนไซม์จึงมีเพียงการกรองอนุภาคของแข็งออกและการระเหยน้ำออก (Dehydrate) เนื่องจากน้ำจะไปมีผลต่อสภาวะในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Wu *et al.*,1999)

5. เอทานอล

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohol) มีสูตรโครงสร้างคือ CH_3–CH_2–OH อาจเขียนแทนด้วย EtOH เอทานอลมีคุณสมบัติในการเป็นตัวทำละลายสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายตามความบริสุทธิ์ของเอทานอล เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ การผลิตสุรา ไวน์ เบียร์ สาเก เป็นต้น ด้านการแพทย์สามารถใช้ในการฆ่าเชื้อโรค ปัจจุบันมีการให้ความสำคัญกับการนำเอทานอลเพื่อเป็นพลังงานทดแทนในรูปของเชื้อเพลิงเหลว โดยการเติมเป็นส่วนผสมในน้ำมันเบนซินเรียกว่าน้ำมันแก๊สโซฮอล์ (gasohol) หรือเติมในน้ำมันดีเซลเรียกว่าดีโซฮอล์ (desohol) การนำเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงจะส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง อ้อย ข้าว หรือวัสดุที่เป็นเส้นใยของพืช นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติของการเป็นสารออกซีจีเนต (oxygenate) ทำให้การเผาไหม้ของเอทานอลสามารถลดการปล่อยมลพิษออกสู่สิ่งแวดล้อม (Hansen *et al.*, 2005 อ้างโดย Balat *et al.*, 2008) การผลิตไบโอดีเซลนิยมใช้เมทานอลเป็นสารตั้งต้นเนื่องจากมีราคาถูกและมีคุณสมบัติของการเป็นตัวทำละลาย เมทานอลที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันผลิตได้จากมีเทนที่ได้จากก๊าซธรรมชาติ หรือได้จากการเผาไหม้ของถ่านไม้จึงมีชื่อเรียกว่า wood alcohol ในธรรมชาติเมทานอลสามารถผลิตได้จากการหมักของแบคทีเรียโดยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ (anaerobic metabolism) (Methanol, 2008) อย่างไรก็ตามการนำเมทานอลมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลยังมีข้อด้อยอยู่หลายประการ เนื่องจากเมทานอลมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสามารถดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังทั้งยังไม่ละลายน้ำ การรั่วไหลของเมทานอลแม้เพียงเล็กน้อยจึงอาจก่อให้เกิดปัญหาตามมามากมาย (Bouaid *et al.*, 2007) จากเหตุผลข้างต้นจึงมีการนำเอทานอลมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลแทนการใช้เมทานอลเนื่องจากเอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้โดยใช้กระบวนการหมักตามธรรมชาติจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรและอุตสาหกรรม จึงไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม คุณสมบัติด้านการเป็นเชื้อเพลิงของแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 15

Table 15. Some properties of alcohol fuels.

Fuel property	Isoctane	Methanol	Ethanol
Cetane number	-	5	8
Octane number	100	112	107
Auto-ignition temperature (K)	530	737	606
Latent heat of vaporization (MJ/Kg)	0.26	1.18	0.91
Lower heating value (MJ/Kg)	44.4	19.9	26.7

ที่มา: Balat (2007) อ้างโดย Balat และคณะ (2008)

ปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่าการนำเอทานอลมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลถือได้ว่าเป็นกระบวนการผลิตพลังงานที่ได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรตลอดทั้งกระบวนการ ทั้งนี้ไบโอดีเซลที่ผลิตจากเอทานอลยังส่งผลดีต่อคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ได้ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มค่าซีเทนและค่าความร้อน เนื่องจากเอทานอลมีโมเลกุลของคาร์บอนที่มากกว่า อีกทั้งยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของการเผาไหม้ให้มีความสะอาดมากยิ่งขึ้น (Encinar *et al.*, 2007) เทคโนโลยีที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจะมีความแตกต่างกันไปตามประเภทของวัตถุดิบและให้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 16

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น

2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาลได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีทรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

3) วัตถุดิบประเภทเส้นใยส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

Table 16. Comparison of ethanol production from various raw materials.

Raw material (1 ton)	**Yield (liter)**
molasses	260
sugar cane	70
cassava	180
sorghum	70
cereal (corn etc.)	375
coconut water	83

ที่มา: คณะกรรมาธิการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร (2545)

แม้จะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณา คือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดปี หาได้ง่าย ราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบและพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์

จากข้อพิจารณาในการเลือกใช้วัตถุดิบข้างต้น ทำให้แต่ละประเทศที่ผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิง ใช้วัตถุดิบที่แตกต่างกันไป เช่น ประเทศบราซิลซึ่งเป็นผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ที่สุดของโลก ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลัก ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพด เป็นต้น

สำหรับประเทศไทยวัตถุดิบที่ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเอทานอลมี 3 ชนิด ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง โดยเฉพาะหัวมันสำปะหลังสด จากการสำรวจปริมาณการผลิตเอทานอลทั่วโลกพบว่าประเทศไทยมีปริมาณการผลิตเอทานอลในปี ค.ศ. 2006 ติดอันดับ 10 ของโลก (Sanchez and Cardona, 2008 and Balat *et al*, 2008) ซึ่งส่วนใหญ่เราจะใช้ประโยชน์จากเอทานอลในการเป็นส่วนผสมของน้ำมันเบนซินเพื่อลดการนำเข้าน้ำมัน จะเห็นได้ว่าประเทศไทยสามารถพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอทานอลซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เรามีศักยภาพในการผลิต

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลมีด้วยกันหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็นปัจจัยในด้านของตัววัตถุดิบที่ใช้ สภาวะในการทำปฏิกิริยา กลไกในการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่จะส่งผลให้ปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปได้อย่างสมบูรณ์และได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในปริมาณที่สูง ปัจจัยต่างๆ ที่ต้องพิจารณามีดังต่อไปนี้

6.1 ชนิดของเอนไซม์ไลเปส

ปัจจัยในส่วนของเอนไซม์ที่จะนำมาผลิตไบโอดีเซลเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากปฏิกิริยาการผลิตจะเกิดได้สมบูรณ์หรือดีมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับกิจกรรมการเร่งปฏิริยาของเอนไซม์เป็นหลัก การควบคุมปัจจัยอื่นๆ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพและมีความคงตัวสูงสุด การนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลในระยะแรกของการศึกษาจะเป็นการใช้เอนไซม์อิสระในการทำปฏิกิริยา แต่เนื่องจากข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระที่ไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ จึงได้มีการพัฒนาเป็นการใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีความสะดวกในการใช้งานและการนำกลับมาใช้ใหม่โดยการใช้งานเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสามารถใช้ได้ทั้งเอนไซม์ชนิดเดียวหรือสองชนิดรวมกัน

6.1.1 การใช้เอนไซม์ชนิดเดียว

เอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชมีอยู่หลายชนิด เช่น ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* หรือชื่อทางการค้าคือ Lipase PS ไลเปสจากเชื้อ *Mucor miehei* หรือชื่อทางการค้าคือ Lipozyme และไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* หรือชื่อทางการค้าคือ Lipase SP435 หรือ Novozym 435 ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยที่ได้ศึกษากันมาดังนี้

Nelson และคณะ (1996) ศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของไตรกลีเซอไรด์เพื่อผลิตอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่า เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Mucor miehei* จะมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ให้กลายเป็นอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้แอลกอฮอล์ปฐมภูมิซึ่งเป็นแอลกอฮอล์สายสั้น โดยสามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 94.8-98.5 ส่วนการใช้แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (secondary alcohol) ที่มีการแตกแขนง (branch alcohol) จะเหมาะสำหรับการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* โดยสามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 61.2-83.8 ในขณะที่ Samukawa และคณะ (2000) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Novozym 435 ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง โดยศึกษาการแข่เอนไซม์ใน methyloleate เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงก่อนการทำปฏิกิริยาพบว่าสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 97 และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 3.5 ชั่วโมง นอกจากนี้ Wu และคณะ (2004) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *Candida antarctica* ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นน้ำมันที่ใช้แล้ว (waste

oil) เพื่อผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่ไม่มีตัวทำละลาย พบว่าสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 88.6 หลังการทำปฏิกิริยา 30 ชั่วโมง

Noureddini และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลและเอทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 9 ชนิด พบว่า Lipase PS จาก *Pseudomonas cepacia* สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด โดยพบว่าปฏิกิริยาที่มีการเติมเมทานอลจะให้เมทิลเอสเทอร์จากการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระและไลเปสตรึงรูปร้อยละ 41 และ 65 โดยโมล ตามลำดับ และในปฏิกิริยาของเอทานอลจะให้เอทิลเอสเทอร์ในระบบที่ใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเท่ากับร้อยละ 36 และ 63 โดยโมล ตามลำดับ และเมื่อทำการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาโดยการใช้เอนไซม์ Lipase PS ที่ตรึงรูปโดยการจับยึดด้วย sol-gel polymer matrix จะสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดร้อยละ 67 และ 65 mol% ตามลำดับ ในขณะที่ Iso และคณะ (2001) ได้ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ด้วยตัวจับยึดที่เป็นดินขาว (kaolinite) ที่เรียกว่า Toyonite 200-M ของประเทศญี่ปุ่น เพื่อศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันไตรโอเลอีนและน้ำมันสกัดจากดอกคำฝอย (safflower oil) ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ในการผลิต propyl oleate และ butyl oleate (biodiesel) จะให้ผลผลิตออกมาในปริมาณที่สูงกว่าการใช้ไลเปสอิสระ และจากการศึกษาของ วิภาวดี ปริพัฒนไพโรจน์ (2546) เรื่องการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขปาล์มและน้ำมันปาล์มกับเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า 7 ชนิด คือ Lipase AY (*Candida rugosa*) Lipase PS (*Pseudomonas* sp.) Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) Lipase D (*Rhizopus delemar*) Lipase M (*Mucor javanicus*) Lipase OF (*Candida rugosa*) และ Lipase FAM-15 (*Rhizopus oryzae*) พบว่าเอนไซม์ Lipase PS มีประสิทธิภาพในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด โดยสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขปาล์มในระบบกะได้ร้อยละ 92.2 ทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการผลิตขนาดใหญ่ขึ้นรวมทั้งการผลิตในระบบต่อเนื่องด้วยการใช้ Packed bed reactor ได้อีกด้วย

นอกจากนี้ ญาใจ วิทยะพงศ์ (2548) ยังได้ศึกษาการใช้ประโยชน์ของไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 5 ชนิด ได้แก่ Lipase AY (*Candida rugosa*) Lipase FAP-15 (*Rhizopus oryzae*) Lipase OF (*Candida rugosa*) Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) และ Lipase PS (*Pseudomonas* sp.) ที่ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนตัวพยุงแอคคูเรล (Accurel EP-100) พบว่าเอนไซม์ Lipase PS สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียและจากกรดไขมันที่แยกจากไขมันของบ่อบำบัดได้สูงสุดโดยผลิตได้ร้อยละ 72.33 และ 87.36 ตามลำดับ

6.1.2 การใช้เอนไซม์ผสม

จากคุณสมบัติเด่นของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ใช้ ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่แตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ ความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์ที่ไม่เท่ากัน รวมทั้งข้อจำกัดในด้านราคาของเอนไซม์ ทำให้มี

แนวคิดในการนำเอนไซม์ผสมมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ รวมทั้งลดต้นทุนในการผลิตและปรับปรุงประสิทธิภาพในการทำงานให้ดียิ่งขึ้น โดย Wu และคณะ (1999) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* (Lipase PS-30) ร่วมกับไลเปสจาก *Candida antarctica* (Lipase SP435) ในการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้ว (grease) ในปริมาณที่เท่ากันคือร้อยละ 5 ของน้ำหนักสารตั้งต้น โดยใช้ Lipase PS-30 ในการทำปฏิกิริยาก่อนในช่วง 1 ชั่วโมงแรกจากนั้นจึงเติม Lipase SP435 ร้อยละ 5 ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเอทิลเอสเทอร์จากการใช้เอนไซม์ Lipase PS-30 ชนิดเดียวที่ได้ประมาณร้อยละ 80 เป็นร้อยละ 96 ในขณะที่ Li และคณะ (2006) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Novozym 435 ร่วมกับไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosa* (LipozymeTL IM) ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันที่เป็นผลพลอยได้จากการกลั่นน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil deodolizer distillate) และพบว่าการใช้เอนไซม์ผสมสามารถให้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ได้เท่ากับการใช้ Novozym 435 เพียงชนิดเดียวแต่สามารถลดข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์ในเรื่องราคาเนื่องจาก Lipozyme TL IM มีราคาถูกกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าหากปรับสภาวะการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมคือ ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Novozym 435 ร่วมกับ Lipozyme TL IM ในปริมาณร้อยละ 2 และ 3 ตามลำดับ อัตราส่วนสารตั้งต้นเมทานอลต่อน้ำมัน 3.2:1 จะสามารถให้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ได้ถึงร้อยละ 94 หลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง

6.2 ปริมาณเอนไซม์

ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา โดยจะต้องมีมากพอที่จะสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นที่มีอยู่ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุดและไม่มากจนเกินความจำเป็น ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่ใช้อาจจะอยู่ในรูปของน้ำหนักหรือร้อยละของเอนไซม์ต่อน้ำหนักของสารตั้งต้นน้ำมัน (Samukawa *et al.*, 2000) หรือการเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการทำปฏิกิริยาในหน่วยของยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ แล้วจึงคำนวณหาปริมาณยูนิตของเอนไซม์ที่ต้องเติมเทียบกับปริมาณของสารตั้งต้นที่จะใช้ ทั้งนี้เนื่องจากหากมีสัดส่วนปริมาณของเอนไซม์และสารตั้งต้นที่ไม่เหมาะสม ปริมาณของสารตั้งต้นที่มากกว่าจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์บางส่วนเสียสภาพและไม่สามารถทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ซึ่งมักเกิดขึ้นในปฏิกิริยาของการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เมทานอลเป็นสารตั้งต้น (Samukawa *et al.*, 2000)

Noureddini และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลและเอทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสทางการค้าโดยใช้เอนไซม์ Lipase PS อิสระในปริมาณ 0 ถึง 700 มิลลิกรัมและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 0 ถึง 3.5 กรัม ผลการทดลองพบว่าปริมาณของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อถึงจุดที่มีปริมาณเอนไซม์สูงมากพอกลับพบว่าการเพิ่มประมาณเอนไซม์ทำให้ร้อยละของผลผลิตค่อนข้างคงที่โดยมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกันทั้งในระบบที่ใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป และงานวิจัยของ Shah และคณะ (2004) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่

ดำและเอทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในสภาวะที่ใช้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 4 ต่อ 1 พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ 10, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัม ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปคือที่ 100 มิลลิกรัมจะส่งผลให้ระบบมีความหนืดสูงและทำให้ผลผลิตลดลง โดยปริมาณเอนไซม์ 50 และ 70 มิลลิกรัมมีความเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาและการนำไปใช้มากที่สุดเนื่องจากให้ผลผลิตที่สูงประมาณร้อยละ 60 และ 70 ตามลำดับและยังเป็นการลดต้นทุนในการผลิตได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ Shah และ Gupta (2007) ยังได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำกับเอทานอลด้วยการเร่งปฏิกิริยาของ Lipase PS ที่ตรึงรูปบนซีไลท์ (celite) ในปริมาณต่างๆ (12.5- 100 มิลลิกรัม) ในสภาวะที่ใช้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 4 ต่อ 1 ที่ 40 องศาเซลเซียส หลังการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง พบว่าแนวโน้มของการผลิตจะสูงขึ้นตามปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน โดยที่ปริมาณเอนไซม์ 75 มิลลิกรัมจะให้ผลผลิตสูงสุดที่ร้อยละ 70 แต่จะลดลงเล็กน้อยเมื่อปริมาณเอนไซม์มีมากขึ้นเป็น 100 มิลลิกรัม และจากงานวิจัยของ Yesiloglu (2004) ซึ่งได้ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันและเอทานอล โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจากตัวอ่อนที่ตรึงรูปบนเรซิน (ionic linkage on a macroporous anion exchange resin ในสภาวะที่ใช้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1ที่ 45 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเติมน้ำ พบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์จาก 200, 300, 400 และ500 มิลลิกรัม จะส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นและร้อยละของผลผลิตสุดท้ายเพิ่มขึ้นภายในเวลาอันสั้น โดยที่ปริมาณเอนไซม์ 500 มิลลิกรัมจะให้ผลผลิตสูงสุดหลังการทำปฏิกิริยา 7 ชั่วโมง ที่ร้อยละ 80

6.3 ชนิดและสัดส่วนของแอลกอฮอล์

6.3.1 ชนิดของแอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์เป็นวัตถุดิบที่มีความสำคัญในการที่จะกำหนดชนิดของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ โดยส่วนใหญ่แอลกอฮอล์ที่จะใช้ผลิตไบโอดีเซลจะเป็นแอลกอฮอล์สายสั้น ๆ (short chain alcohol) เช่น เมทานอล เอทานอล โพรพานอล (propanol) บิวทานอล (butanol) เป็นต้น โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้ด่างในการเร่งปฏิกิริยาจะนิยมใช้เมทานอลเนื่องจากสามารถหาได้ง่ายและมีความบริสุทธิ์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับแอลกอฮอล์ชนิดอื่น แต่การใช้เมทานอลก็มีข้อจำกัดในส่วนของปริมาณการใช้ เนื่องจากหากใช้มากเกินไปเมทานอลจะเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงมีการให้ความสำคัญกับการศึกษาชนิดของแอลกอฮอล์ต่อการผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปสมากขึ้นดังในงานวิจัยของ Mittelbach (1990) ที่ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* โดยเปรียบเทียบชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ เมทานอล เอทานอล และบิวทานอล พบว่าในสภาวะที่ไม่เติมตัวทำละลายให้ร้อยละของไบโอดีเซลสูงสุดเมื่อใช้เอทานอลที่ร้อยละ 82 รองลงมาคือบิวทานอลร้อยละ 76 และเมทานอลร้อยละ 3 ตามลำดับ ในขณะที่ Salis และคณะ (2005) ได้เปรียบเทียบชนิดของ

แอลกอฮอล์ที่จะใช้ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันไตรโอเลอีนโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* พบว่าแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ แอลกอฮอล์สายสั้นซึ่งมีหมู่แอลคิลเป็นสายคาร์บอนจำนวน 2-4 ทั้งที่เป็นสายตรงและแตกแขนง (linear and branched primary alcohols with short alkyl chains) ในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและ a_w เป็น 0.432 โดยพบว่าการใช้บิวทานอล ไอโซบิวทานอล โพรพานอล และไอโซเมอร์ของเพนทานอลในการทำปฏิกิริยาสามารถให้ผลผลิตโอเลอิกเอทิลเอสเทอร์กว่าร้อยละ 95 ในขณะที่การใช้เอทานอลจะให้ผลผลิตที่สูงเช่นกันที่ประมาณร้อยละ 90 ส่วนแอลกอฮอล์ทุติยภูมิคือ 2-บิวทานอล ให้ผลผลิตที่น้อยกว่าที่ประมาณร้อยละ 85 เนื่องจากผลของความไม่เข้ากันของแอลกอฮอล์กับสารในปฏิกิริยา (steric hindrance) ส่วนเมทานอลให้ผลผลิตต่ำที่สุดที่ประมาณร้อยละ 40 เนื่องจากการละลายของเมทานอลในน้ำมันจะมีน้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การเติมแอลกอฮอล์ที่เป็นสายแขนงยังช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของไบโอดีเซลโดยช่วยให้เครื่องยนต์ทำงานได้ดีขึ้นทำให้สามารถใช้ไบโอดีเซลได้ในภูมิประเทศที่มีอากาศหนาว

6.3.2 สัดส่วนของแอลกอฮอล์

สัดส่วนของแอลกอฮอล์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยหากใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมก็จะทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลงหรืออาจทำให้ปฏิกิริยาไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ Shimada และคณะ (2002) รายงานว่าความสามารถในการละลายของแอลกอล์ฮอล์ในน้ำมันมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยเมทานอลและเอทานอลสามารถละลายในน้ำมันได้ในปริมาณ 1/2 และ 2/3 ของโมลน้ำมัน(stoichiometric amount) ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจะเกิดปัญหาจากการถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเมทานอลที่ไม่ละลายจึงแก้ไขปัญหาโดยใช้การเติมเมทานอลแบบ 2 ขั้นตอนคือเติมในสัดส่วน 1/2 โมล (molar equivalent) ในช่วงแรกและเติมเพิ่มอีก 2/3 โมลในช่วงหลัง และหากเป็นระบบการผลิตแบบต่อเนื่องจะใช้ระบบแพกเบด (packed bed reactor) โดยแบ่งการเติมเมทานอลครั้งละ 1/3 โมลเป็น 3 ช่วง พบว่าการผลิตในระบบทั้ง 2 แบบสามารถให้ผลผลิตได้กว่าร้อยละ 90 และสามารถใช้เอนไซม์ได้ซ้ำมากกว่า 100 วันโดยไม่สูญเสียกิจกรรมและยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการทำปฏิกิริยาของเอทานอลกับน้ำมันจากปลาทูน่าได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้อาจป้องกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากแอลกอฮอล์ได้โดยการใช้ตัวทำละลายมาเจือจางหรือเป็นตัวช่วยให้แอลกอฮอล์ละลายได้ดีขึ้น (Su and Wei , 2008)

6.4 ตัวทำละลายอินทรีย์

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเฟส กล่าวคือ เฟสที่เป็นสารมีขั้วสูงคือน้ำและแอลกอฮอล์ซึ่งมีเอนไซม์ไลเปสละลายอยู่ และเฟสที่เป็นสารตั้งต้นที่มีขั้วน้อยคือน้ำมัน โดยทั่วไปสารทั้งสองไม่สามารถละลายเข้ากันได้จึงต้องใช้ตัวทำละลายเป็นตัวประสาน อีกทั้งตัวทำละลายยังช่วยลดการยับยั้งของเอนไซม์เนื่องจากความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่มากเกินไป ทั้งนี้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้จะต้องสามารถทำละลายได้ทั้งน้ำ น้ำมันและแอลกอฮอล์ ซึ่งการพิจารณา

ความสามารถในการละลายของตัวทำละลายจะรายงานในรูปของค่า Log *P* (partition coefficient or distribution coefficient) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความมีขั้วของตัวทำละลาย เนื่องจากค่าดังกล่าวได้มาจากการวัดสัดส่วนของสารที่สามารถละลายได้ในสาร 2 ชนิดโดยทั่วไปจะใช้น้ำและออกทานอล (octanol) เป็นสารละลายที่ใช้อ้างอิงในการวัดค่าดังกล่าว โดยหากตัวทำละลายชนิดใดมีค่า log *P* สูงแสดงว่าเป็นสารที่มีขั้วน้อยโดยสารที่มีค่า log $P > 2$ จัดเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Li *et al.*, 2006) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันและแอลกอฮอล์ในบางกรณีอาจจะต้องอาศัยตัวทำละลายเพื่อช่วยให้องค์ประกอบของสารตั้งต้นสามารถเข้าทำปฏิกิริยากันได้

Nelson และคณะ (1996) ศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นไตรกลีเซอไรด์เพื่อผลิตอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในตัวทำละลายเฮกเซนพบว่าสามารถเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ไปเป็นอัลคิลเอสเทอร์ได้กว่าร้อยละ 90 ที่ 45 องศาเซลเซียสในเวลา 5 ชั่วโมง ในขณะที่ Li และคณะ (2006) ศึกษาการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นน้ำมันเรปสีดกับเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสผสมของ Novozyme 435 และ Lipozyme TL IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้ *tert*-butanol เป็นตัวทำละลายในสัดส่วน 1: 1 พบว่าการใช้ตัวทำละลายทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีโดยผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้กว่าร้อยละ 95 เนื่องจาก *tert*-butanol สามารถละลายได้ทั้งเมทานอลและกลีเซอรอลที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่งผลให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้กว่า 200 ครั้ง แต่อย่างไรก็ตามการใช้ตัวทำละลายในการผลิตไบโอดีเซลก็ยังมีผลเสียคือจะต้องมีกระบวนการแยกตัวทำละลายออกหลังการทำปฏิกิริยา อีกทั้งคุณสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดยังส่งผลเสียต่อเอนไซม์เนื่องจากตัวทำละลายจะแย่งน้ำที่จับอยู่กับเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ จึงมีการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยไม่ใช้ตัวทำละลาย (solvent-free medium) เพื่อเป็นการลดต้นทุนของการผลิตในส่วนของการระเหยตัวทำละลายและการลดความยุ่งยากในการทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ โดยในการผลิตไบโอดีเซลโดยเอนไซม์ไลเปสอาจไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายเนื่องจากแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีคุณสมบัติในการเป็นตัวทำละลายโดยจะแตกต่างกันไปตามชนิดและความบริสุทธิ์ของแอลกอฮอล์ที่ใช้

Vacek และคณะ (2001) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเอทาโนไลซีสของน้ำมันจากปลาแบรคเดอเรน (blackcurrant oil) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ทำปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เอทานอลเป็นทั้งตัวทำละลายและสารตั้งต้น (reactant) พบว่าหลังการทำปฏิกิริยา 8 ชั่วโมงจะสามารถเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ไปเป็นเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 52 ในขณะที่ Hsu และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันที่ใช้แล้วจากร้านอาหาร (grease) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปของ *Pseudomonas cepacia* พบว่าการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่ไม่มีตัวทำละลายจะให้ร้อยละของผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ที่สูงกว่าการเติมตัวทำละลายคือ เฮกเซน โดยสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 77และ 42 ตามลำดับ

6.5 ปริมาณน้ำ

น้ำเป็นสิ่งจำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้เอนไซม์ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จะต้องอาศัยน้ำเป็นตัวช่วยแต่บางครั้งปริมาณน้ำที่มากเกินไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ทำให้เกิดการสูญเสียคุณสมบัติของไบโอดีเซล ปริมาณน้ำที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามสภาวะของการทำปฏิกิริยา โดยจะต้องเป็นปริมาณที่จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในอัตราที่สูง และเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสน้อย Selmi และ Thomas (1998) ศึกษาการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันดอกทานตะวันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Mucor miehei* พบว่าการเติมน้ำในปริมาณร้อยละ 0.125 โดยปริมาตร จะให้ร้อยละของเอทิลเอสเทอร์สูงสุดที่ 72 เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ในขณะที่ Salis และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลของไตรโอเลอินและบิวทานอลโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* พบว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจะอยู่ในช่วงค่า water activity (a_w) 0.4-0.6 ในการศึกษาของ Noureddini และคณะ (2005) พบว่าการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลและเอทานอลมีค่า water content ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันอยู่ที่ 0.5 และ 0.3 กรัมต่อน้ำมัน 10 กรัม ตามลำดับ

6.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์เป็นองค์ประกอบของโปรตีน ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจึงอยู่ในช่วงอุณหภูมิปกติคือ 30-40 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างกันตามชนิดเอนไซม์ที่ใช้ จากงานวิจัยของ Selmi และ Thomas (1998) ศึกษาการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันดอกทานตะวันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Mucor miehei* เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด ในขณะที่ Shimada และคณะ (1999) ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันจากเมล็ดเรป (rapeseed oil) โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปจาก *Candida antarctica* ใช้อัตราส่วนของน้ำมันต่อเมทานอล 1:1 ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ร้อยละของการทำเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดหลังทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และจากงานวิจัยของ Hsu และคณะ (2003) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วง 40-70 องศาเซลเซียสต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันที่ใช้แล้ว (grease) โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปจาก *Pseudomonas cepacia* พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจะให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด และในงานวิจัยของ Noureddini และคณะ (2005) ที่ศึกษาการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* ในการผลิตไบโอดีเซลของน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจะอยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส และการผลิตจะลดลงตามการเพิ่มอุณหภูมิที่สูงกว่า 35 องศาเซลเซียส

6.7 พีเอช

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนค่าพีเอชที่ควรนำมาพิจารณาก็จะมีความสัมพันธ์กับค่า PI (Isoelectric point) ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ แต่ในการผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจะเป็นปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งจะเติมน้ำในปฏิกิริยาน้อยมาก จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาผลของพีเอชออกมาน้อย โดยทั่วไปในการทำปฏิกิริยาเมทาโนไลซีสของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจะทำปฏิกิริยาที่พีเอชเป็นกลางคือที่พีเอช 7 ดังงานวิจัยของ ญาใจ วิทยะพงศ์ (2548) ที่ศึกษาการใช้ประโยชน์ของไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยเอนไซม์ Lipase PS ใช้สารละลายผสมของสับสเตรทคือไขมันและเมทานอลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 พบว่าสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียและจากกรดไขมันที่แยกจากไขมันของบ่อบำบัดได้ร้อยละ 72.33 และ 87.36 ตามลำดับ Chen และคณะ (2008) ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธ์ *Aspergillus oryzae* NS81020 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จากการหาค่ากิจกรรมการทำงานจะอยู่ที่คือ 6.86 และพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของระหว่างกรดโอเลอิกและเมทานอลของเอนไซม์ก็คือ 6.86 เช่นเดียวกัน

ตัวอย่างการผลิตไบโอดีเซลโดยเอนไซม์ไลเปสในสภาวะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 17 โดยจะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ในหลายสภาวะทั้งที่ใช้ตัวทำละลายและไม่ใช้ตัวทำละลาย ทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง ซึ่งกลุ่มของนักวิจัยที่ศึกษาเรื่องนี้มีอยู่แทบทุกทวีปทั่วโลก ซึ่งความหลากหลายของน้ำมันและแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบรวมทั้งปัจจัยภายนอกอื่นๆ ล้วนมีผลทำให้สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีหลากหลายตามไปด้วย

7. ถังปฏิกรณ์เอนไซม์ชนิดแพคเบด (Packed bed bioreactor)

การขยายขนาดการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปในถังปฏิกรณ์ขนาดใหญ่ โดยถังปฏิกรณ์เอนไซม์มีด้วยกันหลากหลายรูปแบบ เช่น ถังปฏิกรณ์แบบถังกวนแบบต่อเนื่อง (continuous stirred tank reactor; CSTR) ถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed bed reactor) ถังปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด (fluidized bed reactor) ซึ่งถังปฏิกรณ์แต่ละชนิดต่างมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ถังปฏิกรณ์ชนิดแพคเบดในกระบวนการชีวภาพกันอย่างกว้างขวาง รวมทั้งการผลิตไบโอดีเซลด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ต้นทุนต่ำ ง่ายต่อการควบคุมระบบและการบำรุงรักษา (Vikbjerg *et al.*, 2005) แต่อาจเกิดปัญหาเรื่องความดันตก (pressure drop) ซึ่งเป็นผลเนื่องจากขนาดของคอลัมน์ต่อความเร็วปฏิกิริยา (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) ที่มักเกิดขึ้นในการเดินระบบเป็นเวลานานติดต่อกันจนเกิดการอุดตันภายในถังหมักภาพที่ 17 แสดงเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปชนิดแพกเบดในรูปแบบต่างๆ

Table 17. Biodiesel production by lipase through different conditions.

Oil/fat source	Alcohol	Lipase source	Solvent	Type of reactor	Conversion (c) or yield (y) (mol or wt%)	Reference
Sunflower oil	Ethanol	*Pseudomonas fluorescens*	Petroleum ether	Batch	82 (y)	Mittlebach, 1990
	Methanol	*Pseudomonas fluorescens*	Solvent free	3-step batch	> 90	Soumanou and Bornscheuer, 2003b
	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	Membrane reactor	97 (c)	Bélafi-Bakó *et al.*, 2002
	Ethanol	*Mucor miehei*	Solvent free	Batch (4 cycles)	83 (y)	Selmi and Thomas, 1998
	Ethanol	*Porcine pancreatic*	Solvent free	Batch	81 (y)	Yesiloglu, 2004
	Methanol	*Rhizomucor miehei*	Solvent free	3-step batch (8 cycles)	> 80 (c)	Soumanou and Bornscheuer, 2003a
High oleic sunflower oil	Butanol	*Rhizomucor miehei*	*n*-Hexane	Packed bed reactor	> 80 (c)	Dossat *et al.*, 1999
Sunflower acid oil	Methanol	*Candida antarctica*	*n*-Hexane	Batch	63.6 (y)	Tuter *et al.*, 2004
Soybean oil	Methanol	*Pseudomonas cepacia*	Solvent free	Batch	~ 60(y)	Kaieda *et al.*, 2001
	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	3-step batch (20 cycles)	97 (y)	Samukawa *et al.*, 2000
	Methanol	*Thermomyces lanuginosa*	Solvent free	Continuous batch	80–90 (y)	Du *et al.*, 2003
	Methanol	*Thermomyces lanuginosa*	Solvent free	3-step batch (15 cycles)	94 (y)	Xu *et al.*, 2004
	Methanol – ethanol	*Pseudomonas cepacia*	Solvent free	Batch (12 cycles)	67 (y)	Noureddini *et al.*, 2005
	Methanol	*Rhizopus oryzae*	Solvent free	Batch	80 (y)	Kaieda *et al.*, 1999
Degummed soybean oil	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	3-step batch (25 cycles)	93.8 (c)	Watanabe *et al.*, 2002
Soybean and rapeseed oil mixture	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	3-step batch 50 cycles	98.4 (c)	Shimada *et al.*, 1999
	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	3-packed-bed reactors (100 days)	93 (y)	Watanabe *et al.*, 2000
Triolein – safflower oil	1-propanol	*Pseudomonas*	1,4-dioxane	Batch		Iso *et al.*, 2001
	1-propanol	*fluorescens*	Solvent free	Batch (10 cycles)		
Triolein	Fusel oil-like mixture	*Pseudomonas cepacia*	Solvent free	Batch	100 (c)	Salis *et al.*, 2005b
Nigerian lauric oils (palm kernel and coconut)	Ethanol	*Pseudomonas cepacia*	Solvent free	Batch	72 (c)	Abigor *et al.*, 2000
	1-butanol	*Pseudomonas cepacia*	Solvent free	Batch	40 (c)	
Castor oil	Ethanol	*Rhizomucor miehei*	*n*-Hexane	Batch	98 (c)	De Oliveira *et al.*, 2004
Cotton seed-oil	Primary and secondary alcohols	*Candida antarctica*	Solvent free	Batch	91.5 (methanol)	Köse *et al.*, 2002
	Methanol	*Rhizomucor miehei*	Solvent free	Batch (8 cycles)	> 90 (c)	Soumanou and Bornscheuer, 2003b
Rice bran oil	Methanol	*Cryptococcus* spp. S-2	Solvent free	Batch	80.2 (y)	Kamini and Iefuji, 2001
	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	Batch	98 (c)	Lai *et al.*, 2005
Jatropha oil	Ethanol	*Chromobacterium viscoum*	Solvent free	Batch	92 (y)	Shah *et al.*, 2004
Waste activated bleaching earths (ABE) oil	Methanol	*Candida cylindracea*	Diesel fuel	Batch	~ 100 (y)	Kojima *et al.*, 2004
	Methanol	*Rhizopus oryzae*	Water	Batch	55 (y)	Lara Pizarro and Park, 2003
Waste edible-oil	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	Packed-bed reactor (100 days)	90 (y)	Watanabe *et al.*, 2001
Tallow (other oils)	Primary alcohols	*Mucor Miehei*	*n*-Hexane	Batch	> 90 (c)	Nelson *et al.*, 1996
Restaurant grease	Methanol	*Pseudomonas cepacia*	Solvent free	Batch	98 (y)	Hsu *et al.*, 2002
	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	Batch	96 (c)	Lee *et al.*, 2002
	Ethanol	*Burkholderia cepacia*	Solvent free	Packed bed reactor	> 96 (y)	Hsu *et al.*, 2004a
Fractionated lard	Methanol	*Candida antarctica*	Solvent free	Batch	58 (c)	Lee *et al.*, 2002

a : Commercially available immobilised lipases.

b : Lipases immobilised by researchers in their own laboratories.

ที่มา: Salis และคณะ (2007)

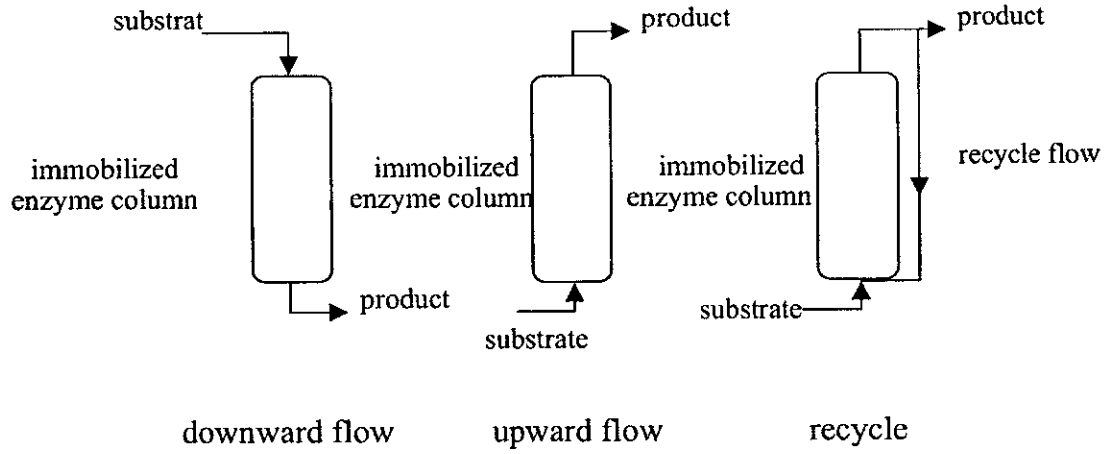


Figure 17. Packed bed reactor of immobilized enzyme.

ที่มา: ดัดแปลงจาก ปราณี อ่านเปรื่อง (2543)

จากภาพที่ 17 แสดงทิศทางการไหลของสับสเตรทในคอลัมน์แบบแพคเบดซึ่งมี 3 รูปแบบคือ การไหลจากระดับสูงไปต่ำ (downward flow) การไหลจากระดับต่ำไปสูง (upward flow) และการไหลซ้ำรอบ (recycle) โดยการไหลจากระดับต่ำไปสูงจะเป็นวิธีที่เหมาะสมกับอุตสาหกรรม ทั้งนี้เพราะวิธีการไหลจากระดับสูงไปต่ำมักจะก่อนให้เกิดกรณีการอัดแน่นของเอนไซม์ในคอลัมน์ นอกจากนี้เมื่อปฏิกิริยามีแก๊สเกิดขึ้นวิธีการไหลจากระดับต่ำไปสูงจะเหมาะสมกว่ามาก (ปราณี อ่วนเปรื่อง, 2543) ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการพิจารณาการออกแบบระบบการผลิตด้วยถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด คือ เวลาที่สับสเตรทเจอกับเอนไซม์ในคอลัมน์ (residence time) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของสับสเตรทโดยสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2 (Vikbjerg *et al.*, 2005)

$$\text{residence time} = \frac{\pi . r^2 . l . \varepsilon}{V_f} \qquad (2)$$

r : inner radius of column

l : column length

Ɛ: bed void fraction

V_f : flow rate of substrate

ค่า bed void fraction เป็นค่าช่องว่างที่อยู่ภายในคอลัมน์ซึ่งหาได้จากการคำนวณค่าผลหารของปริมาตรสับสเตรทต่อปริมาตรของเอนไซม์ในคอลัมน์

8. งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทย

การผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยได้ริเริ่มมาจากพระราชดำริของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ด้วยทรงเล็งเห็นถึงปัญหาในเรื่องของวิกฤตการณ์ราคาน้ำมันปิโตรเลียมที่นับวันจะยิ่งสูงขึ้น อีกทั้งทรงเห็นว่าประเทศไทยมีศักยภาพด้านวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถนำมาผลิตเป็นพลังงานทดแทนได้ โครงการต่างๆ ที่เกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจึงถือกำเนิดขึ้น งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยมีจากหลากหลายสถาบันทั่วประเทศ ดังตัวอย่าง

งานวิจัยของ วัฒนา ปิ่นเสม และคณะ (2549) ที่ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) จากน้ำมันพืชที่สกัดได้จากรำข้าวผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น โดยใช้โซเดียม-ไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้ปริมาตรน้ำมันรำ 500 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 60 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โซเดียมไฮดรอกไซด์ 7 กรัม และเมทานอล 100 มิลลิลิตร จะสามารถเตรียมเมทิลเอสเทอร์ได้ผลผลิตประมาณร้อยละ 90 โดยมีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 5.360 – 5.488 เซนติสโตรค จุดวาบไฟที่ 320 องศาเซลเซียส และค่าดัชนีซีเทนประมาณ 46 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลทั่วไป และงานวิจัยของ เฉลิมพร ณ พัทลุง (2549) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดยางพาราและการประยุกต์ใช้งาน พบว่าในสภาวะที่ใช้โพแทสเซี่ยมไฮดรอกไซด์ (KOH) ร้อยละ 1 โดยมวลและอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันที่ 6 ต่อ 1 สามารถผลิตไบโอดีเซลได้ร้อยละ 84 ของผลได้ และไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 94 โดยเมื่อนำไบโอดีเซลที่ได้มาทดสอบกับเครื่องยนต์พบว่า สามารถใช้ได้ทั้งกับเครื่องยนต์แบบห้องเผาไหม้โดยตรงและเครื่องยนต์แบบมีห้องเผาไหม้ช่วย นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาหาแหล่งของน้ำมันที่จะนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เช่น โครงการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งน้ำมันสบู่ดำเป็นน้ำมันที่ไม่สามารถนำมาบริโภคได้จึงมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทน หรือการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ผลิตได้จากสาหร่ายสีเขียวขนาดเล็ก โดย ดร.รัตนภรณ์ ลีสิงห์ และทีมนักวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายให้มีการผลิตน้ำมันซึ่งเป็นการลดพื้นที่ที่ต้องใช้ในการผลิตเนื่องจากการเลี้ยงสาหร่ายใช้พื้นที่น้อยทั้งยังโตเร็วทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตได้มากกว่าน้ำมันจากพืช เป็นต้น

หน่วยงานทางภาคใต้ที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซล หน่วยงานหนึ่งคือ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยคณะวิศวกรรมศาสตร์เป็นแกนหลักสำคัญ มีการจัดตั้งโรงงานต้นแบบในการผลิตไบโอดีเซลจำหน่ายให้กับประชาชนในพื้นที่ โดยงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นการใช้วิธีทางเคมีในการผลิต เช่น งานวิจัยของ สิริรัตน์ พึ่งชมภู (2548) ซึ่งศึกษาความเป็นไปได้เชิงเทคนิคและเชิงเศรษฐศาสตร์ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันในระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยนำไขน้ำมันเสีย (waste palm oil) และเมทานอลทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส ความดัน 1-1.2 บรรยากาศ และที่เวลา 4 ชั่วโมง โดยมีความบริสุทธิ์ของเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 95.45 ภายหลังการ

ปรับปรุงคุณภาพของเมทิลเอสเทอร์โดยการกลั่นใสจะได้ความบริสุทธิ์ของเมทิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 98.69 และสามารถใช้เครื่องควบแน่นดึงเมทานอลมาใช้ใหม่ได้ร้อยละ 87.7 และจากการวิเคราะห์เชิงเศรษฐศาสตร์โดยกำหนดระยะเวลาโครงการ 10 ปี กำลังการผลิต 1 ตันไขน้ำมันเสียต่อวัน พบว่าโครงการนี้เหมาะสมที่ภาคเอกชนจะนำไปพิจารณาลงทุนได้ เนื่องจากผลตอบแทนการลงทุน (IRR) สูงกว่าอัตราผลตอบแทนต่ำสุด (MARR) ร้อยละ 18 ต่อมา กิตติศักดิ์ ทวีสินโสภา (2549) ศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มหีบรวม ด้วยกระบวนการผลิตแบบเอสเทอริฟิเคชั่นและทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นจากน้ำมันปาล์มดิบชนิดหีบรวมโดยใช้กรดและด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์แบบกะ ทำการผลิตแบบ 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกเป็นกระบวนการเอสเทอริฟิเคชั่น โดยใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ขั้นตอนที่สองเป็นกระบวนการผลิตแบบทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น โดยใช้โซเดียมไฮดร็อกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันโดยรวมร้อยละ 30 และ 36 โดยปริมาตรน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ให้มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 97 สัดส่วนเมทานอลที่สูงขึ้นจะส่งผลให้ความบริสุทธิ์ของเมทิลเอสเทอร์สูงขึ้นตามไปด้วย โดยปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ที่ทุกอัตราส่วนของเมทานอลมีค่าใกล้เคียงกันที่ประมาณร้อยละ 88 โดยปริมาตรของน้ำมัน

นอกจากนี้คณะอุตสาหกรรมเกษตรได้มีส่วนร่วมในการค้นคว้า วิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเป็นแนวทางใหม่ในการพัฒนากระบวนการผลิตต่อไปในอนาคต งานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีทางชีวภาพคือการใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิต วิภาวดี ปริพัฒนไพโรจน์ (2546) ศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขปาล์มและน้ำมันปาล์มกับเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า พบว่าเอนไซม์ Lipase PS มีประสิทธิภาพในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด และเมื่อนำเอนไซม์มาทำการตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนตัวพยุงแอคคูเรลจะสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 92.2 และในงานวิจัยของญาใจ วิทยะพงศ์ (2548) ที่ศึกษาการใช้ประโยชน์ของไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยเอนไซม์ไลเปสทางการค้า พบว่าสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียและจากกรดไขมันที่แยกจากไขมันของบ่อบำบัดได้ร้อยละ 72.33 และ 87.36 ตามลำดับ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความจำเพาะและชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มใช้แล้ว
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอทาโนไลซีสโดยเอนไซม์ที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาความจำเพาะและคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันใช้แล้ว จากนั้นจึงศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาเอทาโนไลซีส ได้แก่ การใช้เอนไซม์เดี่ยวเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ผสม ปริมาณน้ำ ปริมาณเอนไซม์ สัดส่วนเอทานอล การแบ่งเติมเอทานอล เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงทำการผลิตในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องและศึกษาคุณสมบัติบางประการของไบโอดีเซลที่ได้เทียบกับน้ำมันไบโอดีเซลทั่วไป

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

- น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วจากบริษัท ซีเวลท์โฟรเซ่นฟู้ดส์ จำกัด ซึ่งตั้งอยู่ที่ เลขที่ 70 ม.6 ต.ทำนบ อ.สิงหนคร จ.สงขลา
- เอทิลแอลกอฮอล์ 95% จากห้างหุ้นส่วนจำกัดไฮซายน์ (High Science Limited Partnership)

2. เอนไซม์ไลเปสทางการค้า

2.1 เอนไซม์ไลเปสชนิดผงทางการค้า

- Lipase PS *(Pseudomonas cepacia)*, Lipase AY (*Candida rugosa*), Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Amano Pharmaceutical Co. Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

2.2 เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า

- Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa*) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Novozyme ประเทศเดนมาร์ค

3. ตัวพยุงสำหรับตรึงรูปเอนไซม์

- แอคคูเรล (Accurel) EP-100 Polypropylene powder ขนาดรูพรุนต่ำกว่า 400 ไมโครเมตร จากบริษัท Akzo Nobel Membrana ประเทศเยอรมนี

4. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ ไตรเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันเป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ รายละเอียดในภาคผนวก ก

อุปกรณ์

- เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ยี่ห้อ Fine PCR รุ่น ST5 ประเทศเยอรมนี
- ตู้อบ (incubator) ยี่ห้อ Binder รุ่น BD 115 ประเทศสหรัฐอเมริกา

- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Biochrom รุ่น Libra S22 ประเทศอังกฤษ 47
- เครื่องวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมัน Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) ยี่ห้อ Iatron รุ่น Iatroscan MK-5 ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ Chromarod Slll (Silica gel powder coated)
- เครื่องวัดปริมาณน้ำในน้ำมัน (Karl Fischer Titrator) ยี่ห้อ Metrohm รุ่น 831 KF Coulometer ประเทศสวิตเซอแลนด์
- เครื่องเขย่าพร้อมควบคุมอุณหภูมิ Eppendorfthermomixer ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น Eppendorf AG 22331 ประเทศเยอรมนี
- ปั๊มแบบลูกกลิ้ง (Peristaltic pump) ยี่ห้อ Longer pump รุ่น BT00-300T ประเทศจีน
- ปั๊มแบบลูกกลิ้ง (Peristaltic pump) ยี่ห้อ Chomatograph Atto รุ่น SJ-I211 ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ Denver รุ่น 320 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น W 350 ประเทศเยอรมนี
- เดสซิเคเตอร์แบบสุญญากาศ ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องเขย่าแบบตั้งโต๊ะ (Vortex) ยี่ห้อ Fine PCR รุ่น Finevortex ประเทศเกาหลี
- เครื่องกรองสุญญากาศ ยี่ห้อ Tokyo Rikakikai รุ่น A-3S ประเทศญี่ปุ่น
- Rotary vacuum evaporator N-N series ยี่ห้อ EYELA รุ่น SB651 ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องเหวี่ยงแยกแบบตั้งโต๊ะ (microcentrifuge) รุ่น MPW-52 ประเทศโปแลนด์

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว

วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมัน ได้แก่ ค่ากรด ค่าสปอนิฟิเคชัน ค่าเปอร์ออกไซด์ และค่าไอโอดีน โดยสารเคมีและขั้นตอนที่ใช้ตามวิธีการของ AOAC (1990) ดังรายละเอียดใน ภาคผนวก ก โดยกรองน้ำมันด้วยผ้าขาวบางก่อนการวิเคราะห์เพื่อแยกตะกอนออกจากน้ำมัน

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำในน้ำมัน

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำในน้ำมันสามารถทำได้โดยการไตเตรทด้วยเครื่อง Karl Fischer Titrator ซึ่งวิธีนี้เป็นการไตเตรทตัวอย่างในเมทานอลร่วมกับสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของ Karl Fischer ซึ่งประกอบด้วยไอโอดีน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เอมีน และเมทานอล ซึ่งไอโอดีนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์นี้จะถูกใช้ไปตามปริมาณน้ำที่มีอยู่ในตัวอย่างในเวลาที่รวดเร็ว จุดยุติของการไตเตรทนั้นสามารถวัดได้จากสีที่เปลี่ยนไปตามไฟฟ้าเคมีและปริมาณของไอโอดีนอิสระ

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วและผลผลิตหลังการทำปฏิกิริยา

วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางและผลผลิตภายหลังจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส เอสเทอริฟิเคชั่นและทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ซึ่งได้แก่ เอทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ ด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer สำหรับขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Freedman *et al.*, 1984 อ้างโดย ญาใจ วิทยะพงศ์, 2548) ดังนี้

- เตรียม quartz rods (silica gel powder coated Chromarod S-III) โดยแช่ในสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาทีและนำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปทำ blank scan ด้วย TLC/FID analyzer ภายใต้เวลาในการสแกน 30 วินาทีต่อ rod อัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของอากาศ 2000 มิลลิลิตรต่อนาที

- เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยดูดสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรนำมาเจือจางให้เหมาะสมด้วยการเติมคลอโรฟอร์ม 50 ไมโครลิตร

- หยดสารตัวอย่างที่เตรียมได้ลงบน quartz rods ประมาณ 1 ไมโครลิตร และนำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์และกรดฟอร์มิกในอัตราส่วน 50:20:0.3 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ จนสารละลายเคลื่อนที่บน quartz rods สูงประมาณ 8 เซนติเมตรโดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วยเฮกเซนและเบนซิน ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูง 10 เซนติเมตรโดยใช้เวลาประมาณ 35 นาที

- นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปสแกนภายใต้สภาวะเดียวกันกับ blank scan ซึ่งโปรแกรมคอมพิวเตอร์จะคำนวณปริมาณขององค์ประกอบแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้กราฟเทียบจากพื้นที่ทั้งหมด

4. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ใช้วิธี Two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

4.1 สารผสมในปฏิกิริยา

สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทน ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) 1.0 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาห์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรจากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส 0.2 มิลลิลิตร หรือกรณีเป็นเอนไซม์ตรึงรูปจะใช้ 1 มิลลิกรัม นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยเติม

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมอย่างรวดเร็วทิ้งให้แยกชั้นและนำส่วนใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระด้วยวิธี cupric acetate method

4.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยใช้วิธี cupric acetate method

วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยใช้วิธี cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986 อ้างโดย Lee and Rhee, 1993) โดยดูดสารละลายส่วนบนในปฏิกิริยาจากข้อ 4.1 มา 0.1 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทนให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมกันอย่างรวดเร็ว (จับเวลา 15 วินาที) และทิ้งให้แยกชั้นจากนั้นนำส่วนของไอโซออกเทนไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร เพื่อวัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปกรดปาล์มมิติก นำค่าที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากสมการที่ 3

$$\text{Activity (U)} = \frac{\text{OD715}}{\text{slope} \times \text{samp.} \times 0.1 \times \text{T}} \qquad (3)$$

slope: หาได้จากกราฟมาตรฐานกรดปาล์มิติก

samp.: ปริมาณตัวอย่างเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ (มิลลิลิตร หรือ มิลลิกรัม)

T: เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในที่นี้คือ 15 นาที

4.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ หรือ 1 ยูนิต (U) ของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มิติกปริมาณ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างน้ำมันปาล์มใช้แล้วก่อนการทดลอง

กรองน้ำมันปาล์มใช้แล้วด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบและใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์ในระบบกะ ส่วนในระบบต่อเนื่องจะเตรียมน้ำมันโดยการกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นตามด้วยการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยใช้ปั๊มสุญญากาศเป็นตัวช่วยในการกรอง

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว

วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันด้วยเครื่อง TLC/FID โดยหาร้อยละขององค์ประกอบต่างๆ ในน้ำมันได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์และกรดไขมันอิสระ พร้อมทั้งศึกษาชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมัน (ภาคผนวก ก) ได้แก่ ค่ากรด ค่าสปอนิฟิเคชัน ค่าเปอร์ออกไซด์และค่าไอโอดีน

3. การตรึงเอนไซม์ไลเปส

ตรึงเอนไซม์ Lipase PS, Lipase AY และ Lipase AK ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนตัวพยุงแอคคูเรลตามวิธีการของ Soumanou และ Bornscheuer (2003a) ดังภาพที่ 18 โดยการเตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสโดยเติมเอนไซม์ 0.5 กรัม ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เตรียมตัวพยุงเอนไซม์โดยชั่งน้ำหนักตัวพยุงมา 0.5 กรัม เติมเอทานอล 95% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที ผสมสารละลายเอนไซม์ที่ได้กับตัวพยุงแอคคูเรลโดยการกวนผสมด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองตัวพยุงและเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน

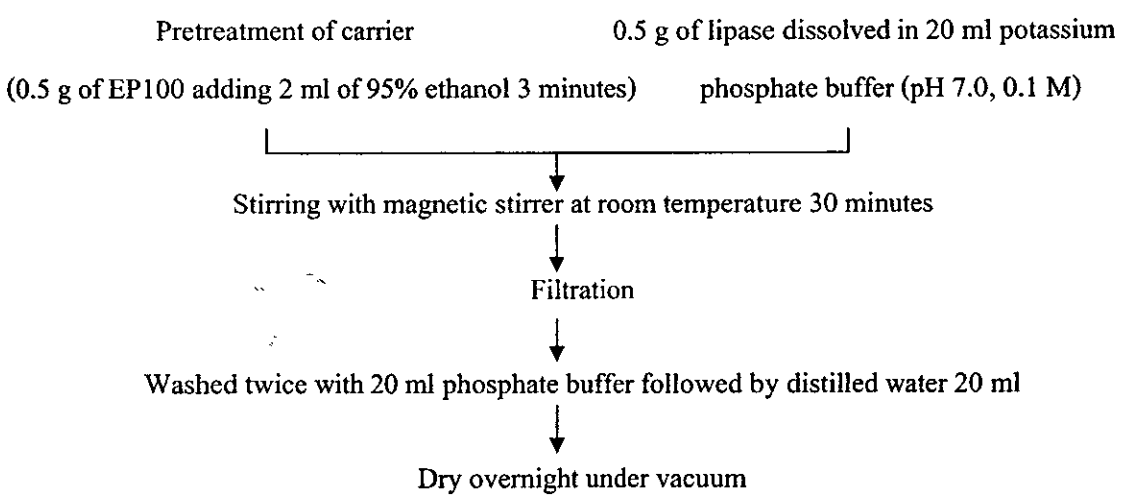


Figure 18. Lipase immobilization.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Soumanou and Bornscheuer (2003a)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป (ตามวิธีการในภาคผนวก ก) และคำนวณค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะรวมทั้งค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะของเอนไซม์ตามสมการ

ประสิทธิภาพการยึดเกาะ(%) (Immobilized Yield) = $\frac{\text{(กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ- กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย)x100}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}}$

กิจกรรมหลังการยึดเกาะ (%) (Immobilized ratio) = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ที่ถูกตรึง x100}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ- กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}$

เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงบนตัวพยุงจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดแก้วปิดสนิทก่อนจะนำไปใช้

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

4.1 ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

4.1.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปของ Lipase PS, Lipase AY, Lipase AK และ Lipozyme TL IM ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมน้ำจนมีน้ำรวมในปฏิกิริยาเป็นร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน เอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ผสมให้เข้ากันใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และบ่มไว้ในเครื่อง Eppendorf thermomixer โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมง โดยดูดตัวอย่างครั้งละ 5 ไมโครลิตร นำมาละลายในคลอโรฟอร์ม 50 ไมโครลิตรเพื่อเจือจางตัวอย่าง จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer คัดเลือกเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันอิสระได้ดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.1.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปของ Lipase PS, Lipase AY, Lipase AK และ Lipozyme TL IM ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมเอทานอล 0.0291 กรัม (สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1) เอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำการทดลองด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 โดยคัดเลือกเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.1.3 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น

ทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นกรดปาล์มมิติกกับเอทานอลโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปของ Lipase PS, Lipase AY, Lipase AK และ Lipozyme TL IM ในสภาวะที่ใช้กรดปาล์มมิติก 0.168 กรัม เติมเอทานอล 0.0301 กรัม (สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อกรดไขมันเท่ากับ 1 ต่อ 1) ในตัวทำละลาย

เฮกเซน 1 มิลลิลิตร เอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำการทดลองด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 โดยคัดเลือกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.2 การศึกษาการใช้เอนไซม์ผสมและเวลาในการเติมเอทานอลในการผลิตเอทิลเอสเทอร์

4.2.1 การใช้เอนไซม์ผสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลองที่ 1 เติมเอนไซม์ที่มีกิจกรรมทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นสูงสุดผสมกับเอนไซม์ที่มีกิจกรรมไฮโดรไลซีสสูงสุด ชุดการทดลองที่ 2 เติมเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอสเทอริฟิเคชั่นสูงสุดผสมกับเอนไซม์ที่มีกิจกรรมไฮโดรไลซีสสูงสุด และชุดการทดลองที่ 3 เติมเอนไซม์ที่มีกิจกรรมทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นสูงสุดเพียงชนิดเดียว โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปในสัดส่วนที่เท่ากันในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมระหว่างน้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมเอทานอล 0.0291 กรัม (สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1) และเติมน้ำจนมีน้ำรวมในระบบเท่ากับร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และบ่มไว้ในเครื่อง Eppendorf thermomixer โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ด้วยการดูดตัวอย่างครั้งละ 5 ไมโครลิตร นำมาละลายในคลอโรฟอร์ม 50 ไมโครลิตร เพื่อเจือจางตัวอย่างจากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer คัดเลือกชุดการทดลองที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.2.2 การศึกษาเวลาในการเติมเอทานอลต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

เติมเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ตรึงรูปที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.1 โดยใช้เอนไซม์ในสัดส่วนที่เท่ากันในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมระหว่างน้ำมันปาล์มใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมน้ำจนมีน้ำรวมในปฏิกิริยาร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน โดยศึกษาการเติมเอทานอล 0.0291 กรัม (สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1) ที่เวลาต่างกันคือที่ 0 นาที และเวลาที่เอนไซม์สามารถย่อยน้ำมันให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระได้สูง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เอนไซม์ที่มีความสามารถในการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเพียงชนิดเดียวและเติมเอทานอลที่ 0 นาที ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2.1 โดยเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0.5, 1, 2, 4, 6 และ 12 และคัดเลือกชุดการทดลองที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.2.3 การศึกษาผลของสัดส่วนเอนไซม์ต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

เติมเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ตรึงรูปที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.1 ในสัดส่วนที่แตกต่างกันคือ 25:75, 50:50 และ 100:0 ปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมของน้ำมันปาล์มใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมเอทานอล 0.0291 กรัม (สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1) เติมน้ำจนมีน้ำรวมในปฏิกิริยาร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2.1 โดย

เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0.5, 1, 2, 4, 6 และ 12 และคัดเลือกชุดการทดลองที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยเอนไซม์ไลเปสผสม

4.3.1 การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

เติมเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ตรึงรูปที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.1 ในสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.3 ปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมระหว่างน้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมเอทานอล 0.0291 กรัม (สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1) ตามเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.2 เติมน้ำเพิ่มในปฏิกิริยาจนมีน้ำรวมในปฏิกิริยาเป็นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำเพิ่ม ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และบ่มไว้ในเครื่อง Eppendorf thermomixer โดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0.5, 1, 2, 4, 6 และ 12 ด้วยการดูดตัวอย่างครั้งละ 5 ไมโครลิตร นำมาละลายในคลอโรฟอร์ม 50 ไมโครลิตร เพื่อเจือจางตัวอย่างจากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer คัดเลือกชุดการทดลองที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3.2 การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

เติมเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ตรึงรูปที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 ในสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.3 ปริมาณร้อยละ 1, 5, 10 และ 15 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมระหว่างน้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมเอทานอล 0.0291 กรัม (สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1) ตามเวลาในข้อ 4.2.2 เติมน้ำในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.1 ทำการทดลองตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.3.1 คัดเลือกชุดการทดลองที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3.3 การศึกษาผลของสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

เติมเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ตรึงรูปที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 ในสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.3 ในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.2 ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมระหว่างน้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมเอทานอลที่สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันต่างๆ คือ 1:1, 2:1 และ 3:1 โดยเติมตามเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.2 เติมน้ำในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.1 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3.1 คัดเลือกชุดการทดลองที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3.4 การศึกษารูปแบบในการเติมเอทานอลต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

เติมเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ตรึงรูปที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 ในสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.3 ในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.2 ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมระหว่างน้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมน้ำในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.1 แบ่งการเติมเอทานอลออกเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ 1 เรียกว่าการเติมแบบ 3 ขั้นตอน เติมเอทานอลในสัดส่วนเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 1:1

ที่เวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ส่วนชุดการทดลองที่ 2 เรียกว่าการเติมแบบ 2 ขั้นตอน ซึ่งเป็นการเติมเอทานอลที่สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 2:1 ที่ 0 ชั่วโมงและ 1:1 ที่ 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมเอทานอลในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 ที่ 0 ชั่วโมง ซึ่งเรียกว่าการเติมแบบ 1 ขั้นตอน (ผลการทดลองจากข้อ 4.3.3) ทำการทดลองในสภาวะเดียวกับข้อ 4.3.1 คัดเลือกชุดการทดลองที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3.5 การนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่

เติมเอนไซม์ผสมของเอนไซม์ตรึงรูปที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 ในสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.3 ในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.2 ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัมและเติมเอทานอลในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 เติมน้ำในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.1 เติมเอทานอลตามเวลาในข้อ 4.2.2 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3.1 เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องประกอบด้วยเครื่อง TLC/FID จากนั้นนำเอนไซม์และตัวอย่างที่เหลือไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5000 g นาน 10 นาที จากนั้นจึงดูดน้ำมันส่วนที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออกและนำเอนไซม์ไปใช้ใหม่ โดยการเติมสับสเตรทแบบเดิมทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยทำปฏิกิริยาซ้ำเช่นนี้จนกว่าผลผลิตที่ได้จะมีปริมาณเอทิลเอสเทอร์ต่ำกว่าร้อยละ 50

5. การศึกษาการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันใช้แล้วโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (Packed-bed reactor) ในระบบต่อเนื่อง

5.1 การเปรียบเทียบวิธีการบรรจุเอนไซม์ผสม

นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.3 ปริมาณ 1 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร ซึ่งมีปริมาตรรวม 7.85 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยแบ่งการบรรจุออกเป็น 2 คอลัมน์คือคอลัมน์ที่ 1 บรรจุเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการผสมกันก่อนจะบรรจุลงในคอลัมน์ ส่วนคอลัมน์ที่ 2 บรรจุเอนไซม์ผสมแบบแยกคือบรรจุเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสก่อนในส่วนด้านล่างของคอลัมน์ แล้วจึงบรรจุเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในส่วนบนของคอลัมน์ ใช้สับสเตรทคือน้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3: 1 ทำการเดินระบบโดยให้สับสเตรทไหลผ่านคอลัมน์จากข้างล่างขึ้นข้างบน (upward flow) เพื่อป้องกันการอัดแน่นของเอนไซม์ในคอลัมน์ โดยการใช้ปั๊มลูกกลิ้งซึ่งควบคุมอัตราการไหลของสับสเตรทที่ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งทำให้มีเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์ (retension time) นาน 30 นาที โดยเดินระบบในตู้อบ (incubator) ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียส

5.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลในในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (Packed-bed reactor) ในระบบต่อเนื่อง

5.2.1 การศึกษาผลของการเพิ่มเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์ต่อการผลิตไบโอดีเซล

ผสมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในสัดส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.3 ปริมาณ 1 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 1 คอลัมน์ ผ่านสับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3:1 ติดตั้งระบบดังภาพที่ 18 โดยให้สับสเตรทไหลผ่านสายยางซิลิโคน (silicone tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องว่างภายในเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร ไปยังคอลัมน์เอนไซม์ โดยให้สับสเตรทไหลจากข้างล่างขึ้นข้างบนด้วยปั๊มลูกกลิ้ง และศึกษาผลของการเพิ่มเวลาที่สับสเตรตอยู่ในคอลัมน์จากเดิม 30 นาที (ผลจากข้อ 5.1) ให้เป็น 120 นาที โดยการปรับอัตราการไหลของสับสเตรทที่ 0.05 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมทั้งปรับอุณหภูมิของระบบให้เป็น 45 องศาเซลเซียส โดยการเดินระบบในตู้อบ

5.2.2 การศึกษาผลของการเพิ่มจำนวนคอลัมน์

ผสมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นอย่างละ 0.5 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ ผ่านสับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 จากคอลัมน์ 1 ไปยังคอลัมน์ 2 โดยให้สับสเตรทไหลผ่านคอลัมน์จากข้างล่างขึ้นข้างบนและมีจุดพักของผลิตภัณฑ์จากคอลัมน์ 1 ซึ่งมีการติดตั้งเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นเนื้อเดียวกันก่อนจะผ่านเข้าสู่คอลัมน์ 2 โดยติดตั้งระบบดังภาพที่ 19 และควบคุมอัตราการไหลของสับสเตรทให้มีระยะเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.2.1 ปรับอุณหภูมิของระบบให้เป็น 45 องศาเซลเซียส โดยเดินระบบในตู้อบ

5.2.3 การศึกษาผลของการแบ่งเติมเอทานอลต่อการผลิตไบโอดีเซล

นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นอย่างละ 0.5 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ ผสมสับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 2:1 และเติมเอทานอลเพิ่มในขวดรองรับผลิตภัณฑ์ที่ออกมาจากคอลัมน์ 1 ที่อัตราการไหล 0.01 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ปั๊มลูกกลิ้ง เพื่อให้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันมีค่าเท่ากับ 1:1 ควบคุมอัตราการไหลของสับสเตรทเพื่อให้มีเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.2.1 โดยใช้ปั๊มลูกกลิ้ง ติดตั้งระบบดังภาพที่ 19 ปรับอุณหภูมิของระบบให้เป็น 45 องศาเซลเซียส โดยการเดินระบบในตู้อบ

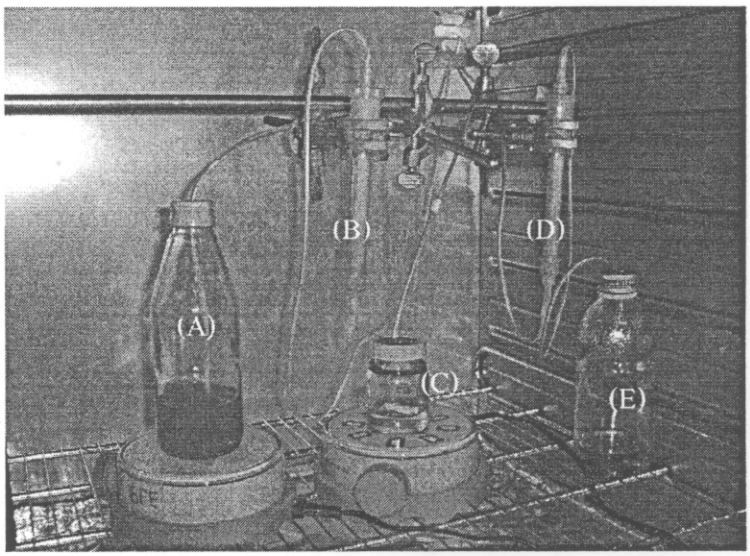


Figure 19. Continuous biodiesel productions in packed-bed column.

(A): substrate bottle, (B): enzyme column 1, (C): product bottle 1, (D): enzyme column 2, (E): product bottle 2

5.2.4 ผลของการแยกคอลัมน์เอนไซม์ต่อการผลิตไบโอดีเซล

ย่อยน้ำมันปาล์มใช้แล้วด้วยการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสปริมาณ 1 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร (คอลัมน์ที่ 1) โดยบรรจุตรงส่วนกลางของคอลัมน์และบรรจุตัวพยุงเอนไซม์ขนาดใหญ่ (Accurel MP1003) ตรงส่วนบนและส่วนล่างของคอลัมน์ โดยภายนอกของคอลัมน์มีปลอกหุ้มสำหรับการไหลเวียนของน้ำจากอ่างน้ำ (water bath) ที่มีการควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ดูดสับสเตรทที่เป็นส่วนผสมของน้ำมันปาล์มใช้แล้วกับน้ำ (ใช้ปริมาณน้ำเท่ากับร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมันเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1) ด้วยปั๊มลูกกลิ้งเพื่อควบคุมอัตราการไหลของสับสเตรทเป็น 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อทำให้มีเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นาน 60 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการย่อยจากคอลัมน์ที่ 1 มาผสมกับเอทานอลในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3: 1 เดินระบบต่อไปยังคอลัมน์ซึ่งบรรจุเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ปริมาณ 1 กรัม (คอลัมน์ที่ 2) ในอัตราการไหลของสับสเตรทเป็น 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยการควบคุมอุณหภูมิด้วยการไหลเวียนของน้ำจากอ่างน้ำ ติดตั้งระบบดังภาพที่ 20

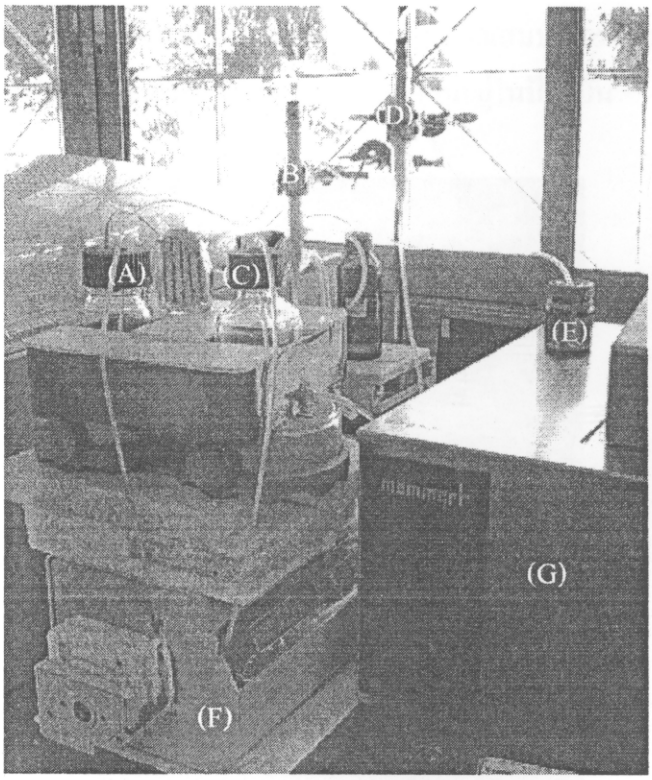


Figure 20. Continuous biodiesel production in packed-bed columns with separations column. The column was controled temperature by hot water from water bath. (A): substrate bottle, (B): enzyme column 1 (with hot water jacket), (C): product bottle 1, (D): enzyme column 2 (with hot water jacket), (E): product bottle 2, (F): substrate pump, (G): water bath.

6. การผลิตไบโอดีเซลเพื่อทดสอบคุณสมบัติบางประการในการเป็นพลังงานเชื้อเพลิง

นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ปริมาณ 0.4 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร โดยผสมกับตัวพยุงขนาดใหญ่เพื่อปรับปริมาตรของคอลัมน์ให้เต็ม ผ่านสับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับเอทานอล ในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3: 1 ด้วยระบบวน โดยดูดสับสเตรทจากขวดให้ไหลตามท่อไปยังคอลัมน์และต่อท่อของผลิตภัณฑ์ที่ออกจากคอลัมน์มายังขวดสับสเตรทอีกครั้งเพื่อให้เกิดการทำปฏิกิริยาซ้ำ โดยควบคุมอัตราการไหลที่ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที ในสภาวะอุณหภูมิห้องโดยติดตั้งระบบดังภาพที่ 21 ร่วมกับการแยกน้ำออกจากระบบและการเติมเอทานอลเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มผลผลิต เมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกกลีเซอรอลออก โดยการผ่านน้ำมันไปในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล 60 (Silica gel 60) ครั้งละ 5 กรัม ด้วยปั๊มลูกกลิ้งที่ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที ดังแสดงในภาพที่ 22 เมื่อได้เอทิลเอสเทอร์ที่มีความบริสุทธิ์สูงแล้วจึงนำไประเหยเอทานอลส่วนเกินออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของไบโอดีเซล ก่อนนำไปทดสอบคุณสมบัติด้านเชื้อเพลิงที่คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยทดสอบค่า

ความหนืด จุดวาบไฟ จุดขุ่นและจุดไหลเท เพื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของไบโอดีเซลตามมาตรฐานต่างๆ และไบโอดีเซลจากวัตถุดิบน้ำมันชนิดอื่นที่มีการศึกษากันอยู่ในปัจจุบัน

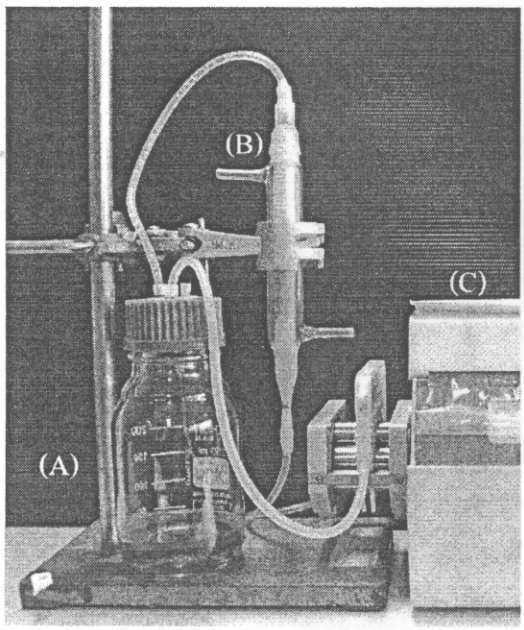


Figure 21. Recycle system for transesterificaton of used palm oil in packed-bed column.

(A): substrate bottle, (B): enzyme column, (C): substrate pump.

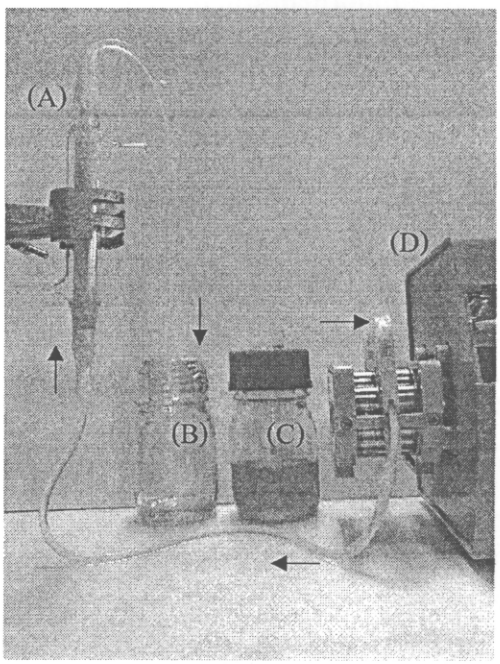


Figure 22. Purification of biodiesel by silica gel column.

(A): silica gel column, (B): final product bottle, (C): biodiesel bottle, (D): peristaltic pump.

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มใช้แล้ว

องค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลเป็นตัวแปรสำคัญในการนำไปใช้ออกแบบการผลิตไบโอดีเซลโดยเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทในการทำปฏิกิริยา จากผลการศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มใช้แล้วดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่ามีค่ากรด (acid value) ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันเท่ากับ 1.24±0.25 โดยมีค่าสูงกว่าค่ากรดของน้ำมันปาล์มรีไฟน์บริสุทธิ์สำหรับบริโภคตามมาตรฐานอุตสาหกรรมซึ่งมีค่าอยู่ที่ 0.6 เนื่องจากน้ำมันปาล์มใช้แล้วถูกใช้ในการทอดอาหารที่อุณหภูมิสูง ซึ่งในระหว่างการทอดจะมีน้ำที่ออกมาจากอาหารจึงอาจทำให้เกิดการย่อยสลายกรดไขมันออกจากไตรกลีเซอไรด์โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส จากข้อมูลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันด้วยเครื่อง TLC/FID พบว่าในน้ำมันปาล์มใช้แล้วมีร้อยละขององค์ประกอบเป็นไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ ในปริมาณร้อยละ 93.54, 0.59, 5.70 และ 0.60 ตามลำดับ โดยจะเห็นได้ว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วยังคงเป็นไตรกลีเซอไรด์และมีส่วนที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นองค์ประกอบอื่นเพียงร้อยละ 6.46 ซึ่งกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันปาล์มใช้แล้วสามารถเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของกรดไขมันอิสระและแอลกอฮอล์ โดยการทำงานของเอนไซม์ไลเปสและไม่ก่อให้เกิดปัญหาของการเกิดสบู่หรือมีผลกระทบต่อปฏิกิริยา

เมื่อพิจารณาค่าไอโอดีนของน้ำมันปาล์มใช้แล้วพบว่ามีค่าเท่ากับ 52.91±0.18 ซึ่งอยู่ในช่วงค่าไอโอดีนของน้ำมันปาล์มโดยทั่วไป โดยค่าดังกล่าวบ่งบอกถึงปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมัน ซึ่งหากค่าไอโอดีนสูงแสดงว่ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในปริมาณมากและมีโอกาสเกิดการหืนจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation rancidity) ในสภาวะที่มีน้ำและอากาศได้ง่ายและเกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารเปอร์ออกไซด์ โดยค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำมันปาล์มใช้แล้วมีค่าเท่ากับ 0.5 ซึ่งมากกว่าในน้ำมันปาล์มที่ใช้บริโภคโดยทั่วไปเล็กน้อย แสดงว่าการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของน้ำมันยังมีน้อย เมื่อพิจารณาค่าซาปอนนิฟิเคชั่น (saponification value) ของน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วพบว่ามีค่าเท่ากับ 184.84±0.25 ซึ่งน้อยกว่าค่าซาปอนนิฟิเคชั่นของน้ำมันปาล์มทั่วไป ซึ่งค่าดังกล่าวจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงขนาดของโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในไขมันหรือน้ำมันชนิดนั้นๆ กล่าวคือน้ำมันที่มีค่าซาปอนนิฟิเคชั่นต่ำแสดงว่ามีกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเป็นองค์ประกอบ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2541)

เมื่อนำค่าซาปอนนิฟิเคชั่นมาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมัน พบว่าจะมีค่าเท่ากับ 910.53 กรัมต่อโมล และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kaewthong (2004) ซึ่งศึกษาการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในระบบต่อเนื่อง และพบว่าน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ใช้ในการทดลองมีค่าน้ำหนักโมเลกุลซึ่งคำนวณได้จากปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชั่นเท่ากับ 838.22 ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องมาจากเป็นการคำนวณจากค่าซาปอนนิฟิเคชั่น โดยค่าน้ำหนักโมเลกุลสามารถใช้เป็นข้อมูลในการคำนวณหาปริมาณน้ำมันที่ต้องใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำในน้ำมัน (water content) พบว่ามีปริมาณ 0.86 กรัมต่อน้ำหนักน้ำมัน 100 กรัม ซึ่ง Foresti และคณะ (2007) รายงานว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ไลเปสจะอยู่ในช่วงร้อยละ 0.2-3 จึงถือได้ว่าปริมาณน้ำที่มีอยู่ในน้ำมันปาล์มใช้แล้วอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา โดยภาพรวมแล้วจะเห็นได้ว่าน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่นำมาศึกษายังมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำมันปาล์มที่ใช้ในการบริโภคทั่วไป ทั้งนี้เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารซึ่งมีการควบคุมมาตรฐานของน้ำมันที่ใช้ในกระบวนการผลิตเป็นอย่างดี ทั้งนี้น้ำมันตัวอย่างที่ได้มาเป็นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทอดผลิตภัณฑ์อาหารชุบแป้งทอด เช่น กุ้ง และปลา เป็นต้น ซึ่งในระหว่างกระบวนการผลิตจะมีการควบคุมคุณภาพของน้ำมัน โดยวัดค่ากรดไขมันอิสระ (FFA) ซึ่งต้องมีค่าน้อยกว่า 1 และค่า TPM (% of Total Polar Materials) ที่ไม่เกินร้อยละ 25 ซึ่งค่า TPM จะแสดงถึงร้อยละขององค์ประกอบที่มีขั้วทั้งหมดในน้ำมันที่เกิดจากการทอด ประกอบกับการสังเกตสีของผลิตภัณฑ์หลังการทอดและการเกิดตะกอนในน้ำมันเพื่อใช้พิจารณาอายุการใช้งานของน้ำมันที่สามารถคงไว้ซึ่งประสิทธิภาพของกระบวนผลิตและไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค

จากการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่าองค์ประกอบหลักของน้ำมันปาล์มจะเป็นกรดไขมันสายกลาง (C-16 และ C-18) เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ กรดโอเลอิก กรดปาล์มมิติก และกรดลิโนเลอิก ในปริมาณร้อยละ 43.85, 37.66 และ 9.51 ตามลำดับ ส่งผลให้น้ำมันปาล์มใช้แล้วมีลักษณะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เนื่องจากคุณสมบัติของกรดโอเลอิกที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวและมีปริมาณมากในน้ำมันปาล์มจะแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ ในขณะที่คุณสมบัติของกรดปาล์มมิติกจะแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากจุดหลอมเหลวของกรดโอเลอิกและกรดปาล์มมิติกมีค่าเท่ากับ 16.2 และ 62.9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Scrimgeour and Harwood, 2005) นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันสายกลางชนิดอื่นได้แก่ กรดลอริกและกรดไมริสติก รวมทั้งกรดไขมันสายยาวคือกรดอะราคิดิก แต่พบในปริมาณต่ำคือร้อยละ 0.57, 1.08 และ 0.37 ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าน้ำมันปาล์มใช้แล้วจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากเป็นน้ำมันที่ยังมีคุณภาพดีและด้วยการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงมีปริมาณน้ำมันที่มากพอสำหรับป้อนเข้าสู่กระบวนการผลิตขนาดใหญ่

Table 18. Properties and composition of used palm oil and palm olein.

Property	Used palm oil in this study	Palm olein from other references
Acid value	1.24±0.25	0.6[d]
Saponification value	184.84±0.25	190-209[e]
Peroxide value	0.58±0.09	0.2-0.3[f]
Iodine value	52.91±0.18	44-55[f]
Water content (%)	0.86±0.06	0.2[d]
Molecular weight (g/mol)[a]	910.53	838.22[g]
Composition (%)[b]		
TG	93.54	96.07[g]
FFA	0.59	could not detect
DG	5.70	2.84[g]
MG	0.60	1.09[g]
Fatty acid composition (%)[c]		
Lauric acid (C12:0)	0.57	0.1-1.1[h]
Myristic acid (C14:0)	1.08	0.9-1.4[h]
Palmitic acid (C16:0)	37.66	37.7-47.7[h]
Palmitoleic acid (C16:1)	0.21	0.1-0.4[h]
Heptadecanoic acid (C17:0)	0.11	-
Stearic acid (C18:0)	4.26	4.0-4.8[h]
Oleic acid (C18:1)	43.85	40.7-43.9[h]
Linoleic acid (C18:2)	9.51	10.4-13.4[h]
Linolenic acid (C18:3)	0.27	0.1-0.6[h]
Arachidic acid (C20:0)	0.37	0.2-0.5[h]

TG = Triglyceride, FFA = Free fatty acid, DG = Diglyceride, MG = Monoglyceride

[a] Calculated from saponification value

[b] Determined by TLC/FID

[c] Determined by GC/FID

[d] มอก. 288-2535 อ้างโดย วิภาวรรณ ศรีมุข (2546)

[e] Scrimgeour (2005)

[f] นิธิยา รัตนาปนนท์ (2541)

[g] Kaewthong (2004)

[h] Maclellan (1983) อ้างโดย Kaewthong (2004)

2. การตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) หรือมีขั้วน้อยเนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้เป็นสารที่มีขั้วน้อยคือน้ำมันและแอลกอฮอล์ การตรึงเอนไซม์บนแอคคูเรลซึ่งเป็นตัวพยุงที่ไม่มีขั้วจึงส่งผลดีต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากสารตั้งต้นสามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนของตัวพยุงได้ดี ทั้งยังมีรายงานว่าการตรึงเอนไซม์บนแอคคูเรลจะทำให้เอนไซม์อยู่ในลักษณะเปิด (open form) และพร้อมจะทำปฏิกิริยาเมื่อเจอสารตั้งต้นที่ไม่มีขั้วหรือบริเวณพื้นผิวระหว่างเฟส (interfacial activation) เนื่องจากในสภาวะปกติของเอนไซม์ไลเปสจะมีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็นลิด (lid) หรือฝาปิดที่อยู่ตรงบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ โดยฝาปิดนี้จะเปิดก็ต่อเมื่อเจอกับสภาวะพื้นผิวระหว่างเฟสและเอนไซม์ก็จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (Foresti *et al.*, 2005a and 2005b; Mateo *et al.*, 2007) ซึ่งการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับบนตัวพยุงจะต้องอาศัยการปรับคุณสมบัติด้านความมีขั้วของตัวพยุงเป็นหลัก เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารที่มีขั้วส่วนตัวพยุงเป็นสารไม่มีขั้ว จึงต้องใช้เอทานอลเป็นตัวเชื่อม (Blanco *et al.*, 2007) เนื่องจากในโมเลกุลของเอทานอลมีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว การตรึงเอนไซม์บนแอคคูเรลด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพจะเป็นไปตามกฎของ Langmuir isotherm กล่าวคือเอนไซม์จะเกาะบนพื้นผิวของตัวพยุงแบบชั้นเดียว (monolayer) แต่ก็มีบางส่วนที่เกาะแบบหลายชั้น (multilayer) (Gitlesen *et al*, 1997; Blanco *et al.*, 2007; Salis *et al.*, 2008) ในงานวิจัยนี้ได้ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสอิสระ 3 ชนิดคือ Lipase PS จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas cepacia*, Lipase AK จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens* และ Lipase AY จากเชื้อราสายพันธุ์ *Candida rugosa* ตามวิธีการของ Soumanou และ Bornscheuer (2003) เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า Lipozyme TL IM ที่ผ่านการตรึงรูปบนเม็ดซิลิกา (porous silica granulate) จากเชื้อราสายพันธุ์ *Thermomyces lanuginosa*

จากการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนของเอนไซม์ก่อนและหลังการตรึง ด้วยวิธี Cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986 อ้างโดย Lee and Rhee, 1993) พบว่ากิจกรรมของไลเปสอิสระทั้ง 3 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน โดย Lipase PS มีกิจกรรมการย่อยสลายสูงที่สุด รองลงมาคือ Lipase AK และ Lipase AY โดยมีค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเท่ากับ 5.74, 5.41 และ 5.18 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตามลำดับ (ตารางที่ 19) (1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที) ทั้งนี้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (ตารางที่ 8) ทำให้มีโอกาสที่จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันได้สูง และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ ญาใจ วิทยพงศ์ (2548) ที่ศึกษากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดต่าง ๆ พบว่า Lipase AY, Lipase PS และ Lipase AK มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเท่ากับ 4.39, 4.13 และ 3.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ ในขณะที่ Salis และคณะ(2008)

ได้เปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันไตรโอเลอีน (triolein assay) ของไลเปสอิสระ Lipase AK, Lipase PS และ Lipase AY และพบว่ามีค่าเท่ากับ 4, 1.8 และ 4.7 กิโลไลเปสยูนิตต่อกรัม (kLU/g) ซึ่งต่ำกว่าในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมและชนิดของสับสเตรทที่ต่างกัน

หลังการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิดบนแอคคูเรส EP100 ที่มีขนาดรูพรุนต่ำกว่า 400 ไมโครเมตร ซึ่งมีพื้นที่ผิวเท่ากับ 85 ตารางเมตรต่อกรัม และมีปริมาตรของรูพรุนทั้งหมด (total pore volume) เท่ากับ 2.95 มิลลิลิตรต่อกรัม หรือสามารถคำนวณเป็นค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเฉลี่ย (mean pore diameter) เท่ากับ 140 นาโนเมตร (Bosley and Peilow, 1997) พบว่าเอนไซม์ Lipase AK มีกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันสูงที่สุด รองลงมาคือ Lipase PS และ Lipase AY โดยมีค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเท่ากับ 4.21, 3.32 และ 1.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูปตามลำดับ และมีค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Immobilized yield) เท่ากับร้อยละ 97.90, 95.89 และ 97.90 ตามลำดับ แต่จะเห็นได้ว่าหลังการตรึงรูป Lipase AY มีค่ากิจกรรมที่ต่ำกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นทั้งที่มีค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการเตรียมตัวพยุงจะต้องใช้เอทานอลในการปรับสภาพ ดังนั้นเอทานอลที่ถูกดูดซับในตัวพยุงอาจทำให้ Lipase AY สูญเสียกิจกรรมไปบางส่วน นอกจากนี้การตรึงรูปอาจส่งผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง (Bosley and Peilow, 1997; Salis *et al.*, 2008)

เมื่อพิจารณากิจกรรมหลังการยึดเกาะ (Immobilized activity) พบว่า Lipase AK ให้ค่าสูงที่สุดที่ร้อยละ 86.83 รองลงมาคือ Lipase PS ร้อยละ 61.77 และ Lipase AY ร้อยละ 45.5 การมีค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะที่ใกล้เคียงกันแสดงว่าปริมาณเอนไซม์ที่เข้ายึดเกาะบนตัวพยุงมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะแสดงถึงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ที่ยึดเกาะอยู่บนตัวพยุง เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า Lipozyme TL IM ที่ตรึงรูปอยู่บนตัวพยุงซิลิกา พบว่ามีกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันอยู่ที่ 3.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Lipase PS และ Lipase AK

จากการศึกษาของ ญาใจ วิทยพงศ์ (2548) ที่ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ Lipase PS บนแอคคูเรส EP100 ขนาดรูพรุน 200 ไมโครเมตร เพื่อใช้ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่า 1392.6 ยูนิตต่อกรัมแอคคูเรส (1.3926 ยูนิตต่อมิลลิกรัมแอคคูเรส) จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงและสภาวะที่ใช้ในการตรึงมีความแตกต่างกัน โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 0.025 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถือว่าสูงมาก ซึ่งจากการศึกษาผลของความเข้มข้น (กิจกรรม) ของเอนไซม์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปจากงานวิจัยของ Kaewthong (2004) พบว่าหากเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงมีความเข้มข้นสูงเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ก็จะมีค่ากิจกรรมสูงตามไปด้วย

Table 19. Characteristic of lipases in palm olein hydrolysis.

Lipase	Activity [a] (U/mg commercial lipase)	Activity [a] (U/mg support)	Immobilized yield (%) [b]	Immobilized activity (%) [c]
PS (*Pseudomonas cepacia*)	5.74±0.07	3.32±0.41	95.89±4.36	61.77±5.41
AK (*Pseudomonas fluorescens*)	5.41±0.12	4.21±0.32	97.90±0.77	86.83±3.10
AY (*Candida rugosa*)	5.18±0.37	1.60±0.14	97.39±0.86	45.50±12.72
TL IM (*Thermomyces lanuginosa*)	ND	3.92±0.61	ND	ND

ND: not determined.

[a]Activity of lipase was determined by cupric acetate method.

[b] ประสิทธิภาพการยึดเกาะ(%) (Immobilized Yield) $= \frac{(\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ- กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}) \times 100}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}}$

[c] กิจกรรมหลังการยึดเกาะ (%) (Immobilized ratio) $= \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ที่ถูกตรึง} \times 100}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ- กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}$

ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลในการศึกษาขั้นต่อไปจึงนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทั้ง 4 ชนิดไปศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นและปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งล้วนเป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้ในระหว่างการผลิต

3. การศึกษาความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและการคัดเลือกเอนไซม์

3.1 การเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส

จากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 4 ชนิดคือ Lipase PS, Lipase AY, Lipase AK และ Lipozyme TL IM ในสภาวะที่มีการเติมเอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของน้ำมัน ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 0.168 กรัม และเติมน้ำจนมีน้ำรวมในปฏิกิริยาเป็นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของน้ำมัน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 23 และ 24 พบว่ารูปแบบของการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ Lipase PS, Lipase AY และ Lipase AK จะคล้ายคลึงกัน ดังแสดงในภาพที่ 23A, B และ C ตามลำดับ โดยการย่อยน้ำมันจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในครึ่งชั่วโมงแรกและคงที่ในเวลาต่อมา เกิดผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและมีองค์ประกอบที่เหลือส่วนใหญ่เป็นไดกลีเซอไรด์ ส่วนโมโนกลีเซอไรด์และไตรกลีเซอไรด์จะมี

ปริมาณแตกต่างกันไป ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (ตารางที่ 8) ดังนั้นการย่อยสลายน้ำมันจึงเป็นไปแบบสุ่มและเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะเอนไซม์ Lipase AY จากเชื้อ *Candida rugosa* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ในการย่อยสลายน้ำมันกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถทนต่อการยับยั้งการทำงานในสภาวะที่มีกรดสูง (Diks and Bosley, 2000) กล่าวคือในระหว่างการย่อยสลายน้ำมันจะเกิดกรดไขมันอิสระซึ่งโดยทั่วไปกรดไขมันอิสระจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (product inhibition) กรณีของเอนไซม์ Lipozyme TL IM การเร่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้น้อยในช่วงแรกแต่จะเพิ่มขึ้นในช่วงหลังและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีน้อยกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น (ภาพที่ 23D)

เมื่อพิจารณาการเกิดกรดไขมันอิสระจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสทั้ง 4 ชนิด ที่เวลาต่าง ๆ (ภาพที่ 24A) พบว่า Lipase AY สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดเป็นกรดไขมันอิสระร้อยละ 46 ในเวลา 30 นาที ในขณะที่ Lipase PS, Lipase AK และ Lipozyme TL IM ให้ร้อยละ 23, 29 และ 2 ตามลำดับ โดยหลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง Lipase AY ยังคงให้ร้อยละของกรดไขมันอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ Lipase AK, Lipase PS และ Lipozyme TL IM ที่ร้อยละ 53, 39, 37 และ 34 ตามลำดับ (ภาพที่ 24B) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Lipozyme TL IM เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการทำปฏิกิริยาของกรดไขมันในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ทำให้การย่อยเกิดขึ้นได้ช้ากว่า (Hayes, 2004) นอกจากนี้ปัจจัยในเรื่องการซึมผ่านของสารตั้งต้นในตัวพยุงที่ต่างชนิดกันก็ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ Lipozyme TL IM เป็นเอนไซม์ที่ตรึงรูปอยู่บนซิลิกาซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับสารที่มีขั้ว (Castillo *et al.*, 1997) เนื่องจากซิลิกาจะมีหมู่ฟังค์ชั่นตรงบริเวณพื้นผิวเป็นพวกที่มีขั้ว (มีหมู่ -OH) ในขณะที่แอคคูเรลมีหมู่ฟังค์ชั่นที่ไม่มีขั้ว (มีหมู่ $-CH_3$) จึงอาจทำให้เอนไซม์ที่ตรึงรูปบนแอคคูเรลมีความสามารถในการดูดซับสารไม่มีขั้วในปฏิกิริยาได้มากกว่า โดยในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสจะมีสารตั้งต้นที่ไม่มีขั้วคือน้ำมันมากกว่าสารมีขั้วคือน้ำ ซึ่งอาจส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิดที่ตรึงรูปบนแอคคูเรลเกิดขึ้นได้ดีกว่า โดย Al-Duri และคณะ (1995) กล่าวว่า คุณสมบัติสำคัญของตัวพยุงที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือความมีขั้วและองค์ประกอบของสารที่ใช้เป็นตัวพยุงมากกว่าพื้นที่ผิวสัมผัส เนื่องจากหากเอนไซม์ไม่สามารถเจอกับสารตั้งต้นได้อันเนื่องมาจากการมีขั้วที่ต่างกันการเร่งปฏิกิริยาก็ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ Sulaiman Al-Zuhair และคณะ (2003) ได้ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม รายงานว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสคือความเข้มข้นและการผสมเข้ากันของสับสเตรทเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาที่พื้นผิวระหว่างเฟส (interfacial area)

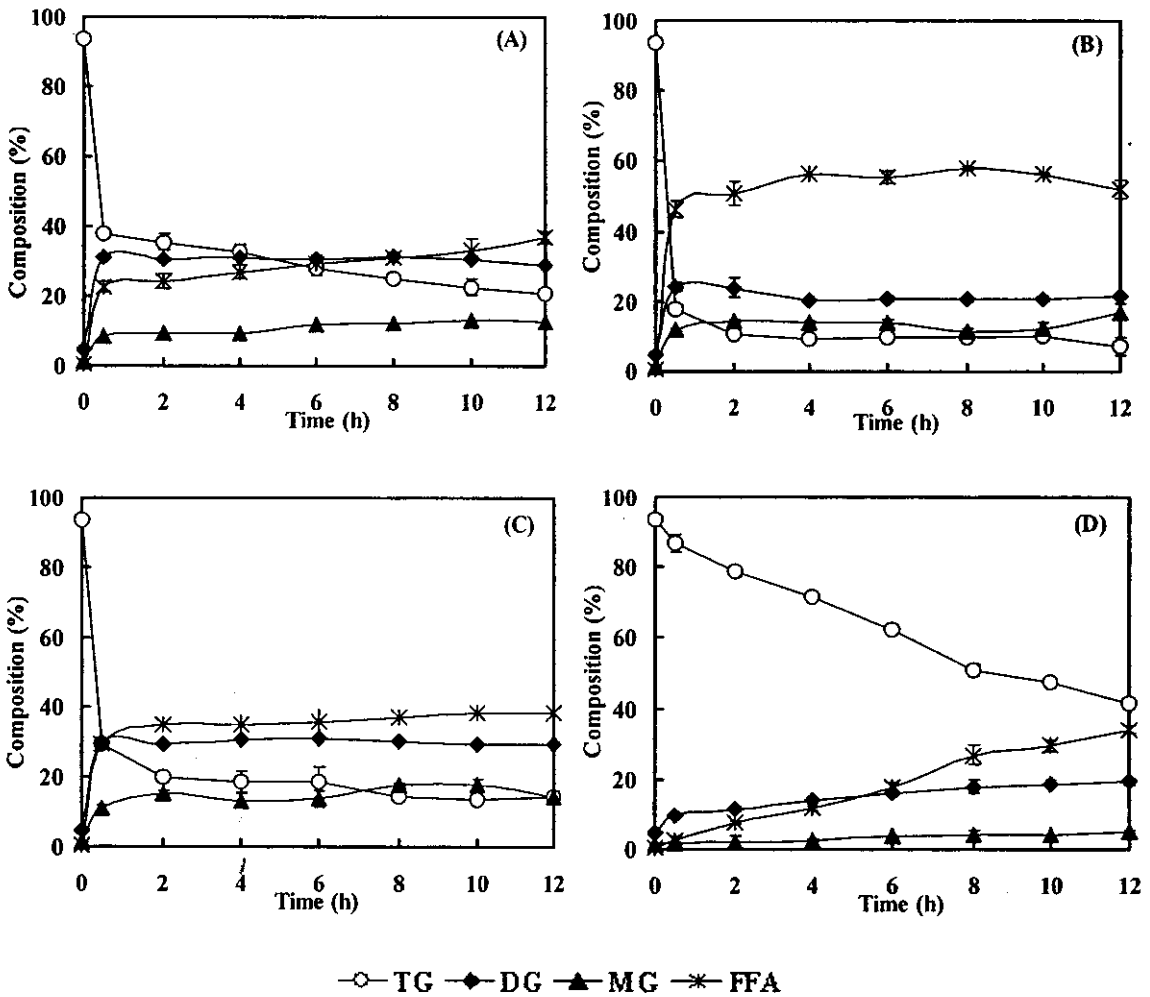


Figure 23. Time course of hydrolysis reaction of used palm oil by immobilized lipases. A reaction mixture consisted of 0.168 g used palm oil, 10% water, and 10 % immobilized lipase by oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Lipase PS, (B) Lipase AY, (C) Lipase AK, and (D) Lipozyme TL IM. TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid.

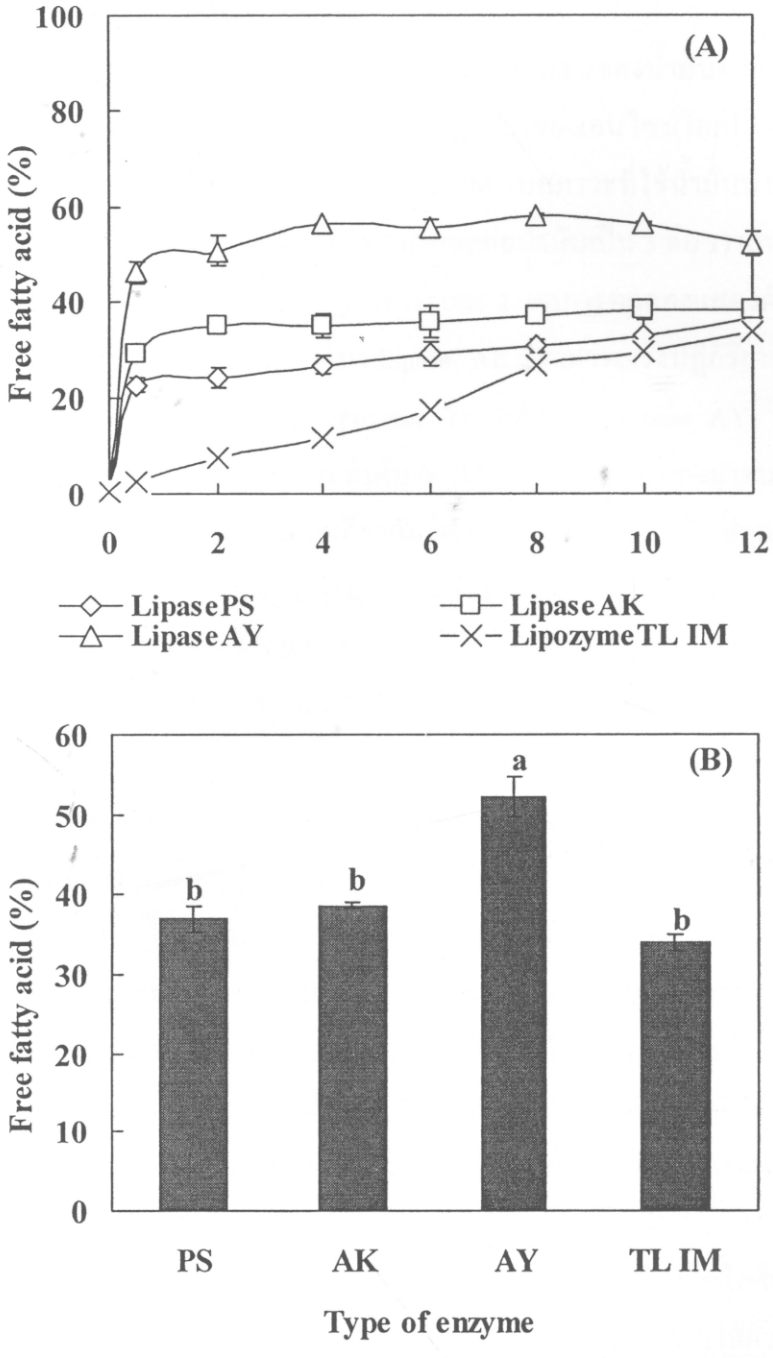


Figure 24. Comparision of hydrolysis activity of used palm oil by four immobilized lipases. A reaction mixture consisted of used palm oil 0.168 g, 10% water and 10% immobilized lipase by oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Time course of free fatty acid formulation by hydrolysis reaction of used palm oil; (B) Relative yield of free fatty acid content after 12 h. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

3.2 การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

จากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันปาล์มใช้แล้วกับเอทานอลเพื่อผลิตเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 4 ชนิดคือ Lipase PS, Lipase AY, Lipase AK และ Lipozyme TL IM ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมเอทานอล 0.0291 กรัม (สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1) เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปร้อยละ 10 โดยน้ำหนักน้ำมันและมีน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 2 ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 25 และภาพที่ 26 พบว่าหลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง Lipase AK สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้สูงสุด รองลงมาคือ Lipase PS, Lipozyme TL IM และ Lipase AY โดยสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 91, 64, 22 และ 5 ตามลำดับ (ภาพที่ 26) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Lipase PS และ Lipase AK เป็นเอนไซม์ที่มาจากจุลินทรีย์สกุลเดียวกันคือ *Pseudomonas* ซึ่งเป็นสกุลที่สามารถทนต่อแอลกอฮอล์และมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ดี (Soumanou and Bornscheuer, 2003a) สำหรับ Lipase AY และ Lipozyme TL IM ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้น้อยนั้นอาจเนื่องมาจากเกิดการยับยั้งเอนไซม์เนื่องจากแอลกอฮอล์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ในการทดลองก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 24) จะเห็นได้ชัดว่า Lipase AY และ Lipozyme TL IM ถูกยับยั้งการทำงานด้วยเอทานอล โดยเฉพาะ Lipase AY ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุดแต่เมื่อเปลี่ยนสภาวะในการทำปฏิกิริยาเป็นการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งมีการเติมเอทานอล กลับพบว่าเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ปัจจัยในเรื่องของปริมาณน้ำในระบบก็มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการที่ Lipase AY ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เนื่องจากมีน้ำในระบบน้อยเกินไปคือร้อยละ 2 ในขณะที่ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสมีน้ำอยู่ร้อยละ 10 การเร่งปฏิกิริยาของ Lipozyme TL IM แม้จะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในช่วงหลังแต่ก็ได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ที่น้อยกว่า Lipase AK และ Lipase PS และต้องใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่นานกว่า (ภาพที่ 25)

จากงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสก็พบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากแอลกอฮอล์ เช่น Xu และคณะ (2004) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของ Lipozyme TL IM ในระบบที่ไม่ใช้ตัวทำละลาย พบว่าสัดส่วนโมลของเมทานอลที่มากกว่า 1.5 เท่าของน้ำมันจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และจากการศึกษาของ Shah และคณะ (2004) ที่พบว่าการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำและแอลกอฮอล์ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* เกิดขึ้นได้น้อยเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยแอลกอฮอล์ หรือจากรายงานของ Yamada และคณะ (2007) ที่ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ 2 ชนิดคือ Lipase QLC จากเชื้อ *Alcaligenes* sp. และ Lipase OF จากเชื้อ *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*) พบว่าเอทานอลมีผลยับยั้งการทำงานของ Lipase OF อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับ Lipase QLC โดย Lipase QLC และ Lipase OF สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันมะกอกกับเอทานอลได้ร้อยละ 50 และ 5 ตามลำดับ ทั้งนี้มีรายงานวิจัยจากหลายสถาบันที่พบความสามารถในการทนต่อการ

ยับยั้งการทำงานเนื่องจากแอลกอฮอล์ของ Lipase AK และ Lipase PS เช่นงานวิจัยของ Soumanou และ Bornscheuer (2003a) ที่ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันและเมทานอลของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปชนิดต่าง ๆ โดยเมื่อเปรียบเทียบการผลิตในระบบที่ไม่ใช้ตัวทำละลายและใช้สัดส่วนโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1 พบว่า Lipase AK ที่ตรึงรูปบนแอคคูเรล สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตได้มากกว่าร้อยละ 50 ในเวลา 24 ชั่วโมง อีกทั้งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 4.5 โมล เอนไซม์ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาและผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งมากกว่าการใช้เอนไซม์ Lipozyme TL IM และ Lipozyme RM IM ที่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยเมทานอล นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Salis และคณะ (2008) ได้เปรียบเทียบการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลด้วยการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ไลเปสชนิดต่างๆ ที่ตรึงรูปบนแอคคูเรลในสภาวะที่ใช้สัดส่วนโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 8 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า Lipase AK จะสามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุดที่ร้อยละ 58 รองลงมาคือ Lipase PS เท่ากับร้อยละ 37 หลังการทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 22 และ 51.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ไลเปสชนิดอื่นได้แก่ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa* (Lipase AY), *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* และ *Penicillium camembertii* ไม่เกิดการเร่งปฏิกิริยา

แม้ว่าจากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ วิภาวดี ปริพัฒนไพโรจน์ (2546) จะพบว่า Lipase PS จะสามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลได้ดีกว่า Lipase AK แต่ก็เป็นการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระ จึงอาจเป็นไปได้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์มีส่วนช่วยให้ Lipase AK สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ดีกว่า Lipase PS นอกจากนี้งานวิจัยของ Moreira และคณะ (2007) ที่ศึกษาการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นน้ำมันปาล์มกับเอทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปของ Lipase AK และ Lipase PS ยังพบว่าการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ไม่ใช้ตัวทำละลายและใช้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 18 ต่อ 1 Lipase AK และ Lipase PS ที่ตรึงรูปด้วย hybrid support polysiloxane–poly-(vinyl alcohol) ให้ผลผลิตหลังการทำปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง ในรูปเอทิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 91 และ 75.1 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้จะใช้สัดส่วนโมลของเอทานอลที่สูงมากเอนไซม์ก็ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ทั้งนี้เนื่องจาก Lipase AK มีความคงตัวและสามารถเร่งปฏิกิริยาในระบบที่มีสับสเตรทที่มีขั้วได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่นๆ นอกจากสภาวะในการทำปฏิกิริยาจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เกิดความแตกต่างในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แล้ว ยังมีอีกปัจจัยที่สำคัญคือลักษณะและโครงสร้างของบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่แตกต่างกันดังในภาพที่ 8

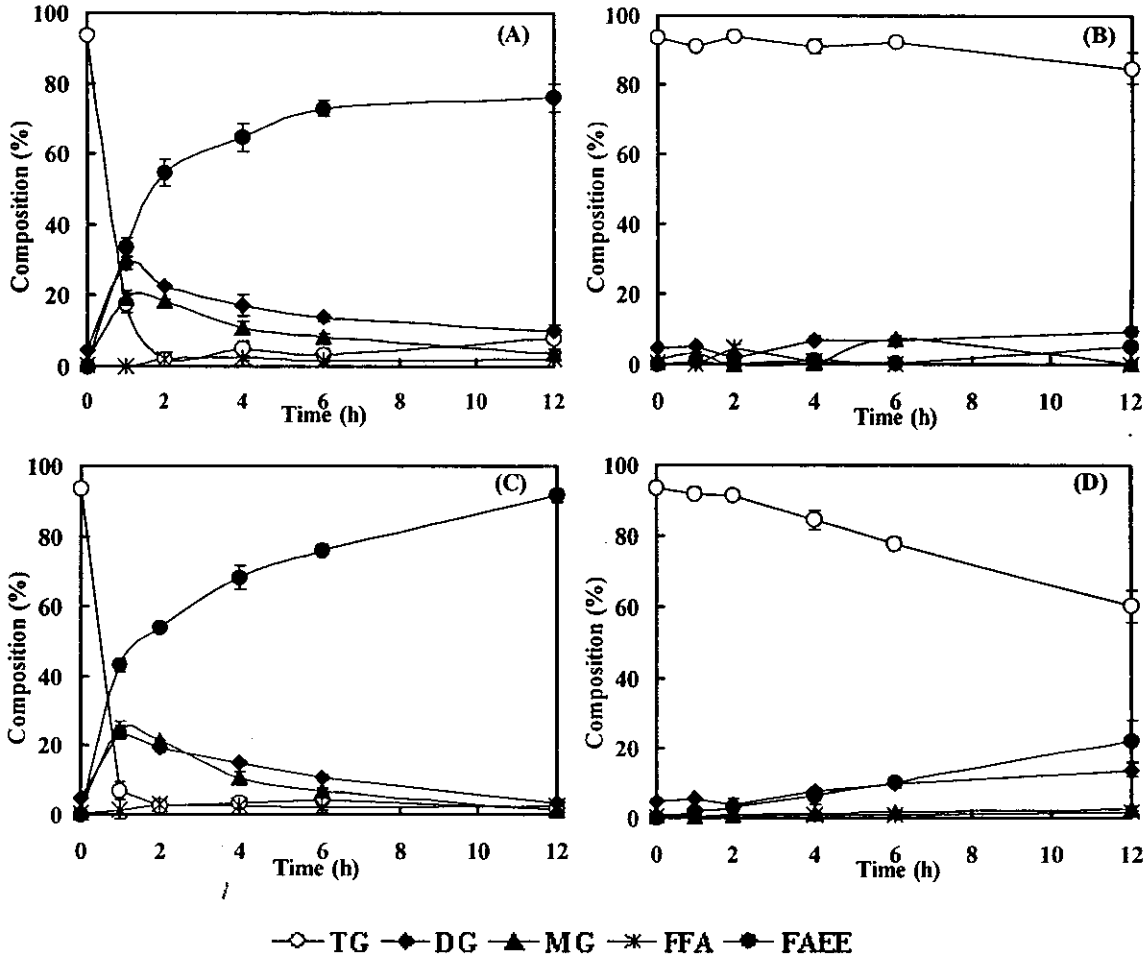


Figure 25. Time course of transesterification of used palm oil by immobilized lipases. A reaction mixture consisted of 0.168 g used palm oil, ethanol was added in the mole ratio of 1:3 (oil: ethanol), 2 % water, and 10 % immobilized lipase by oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Lipase PS, (B) Lipase AY, (C) Lipase AK, and (D) Lipozyme TL IM. TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester. TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

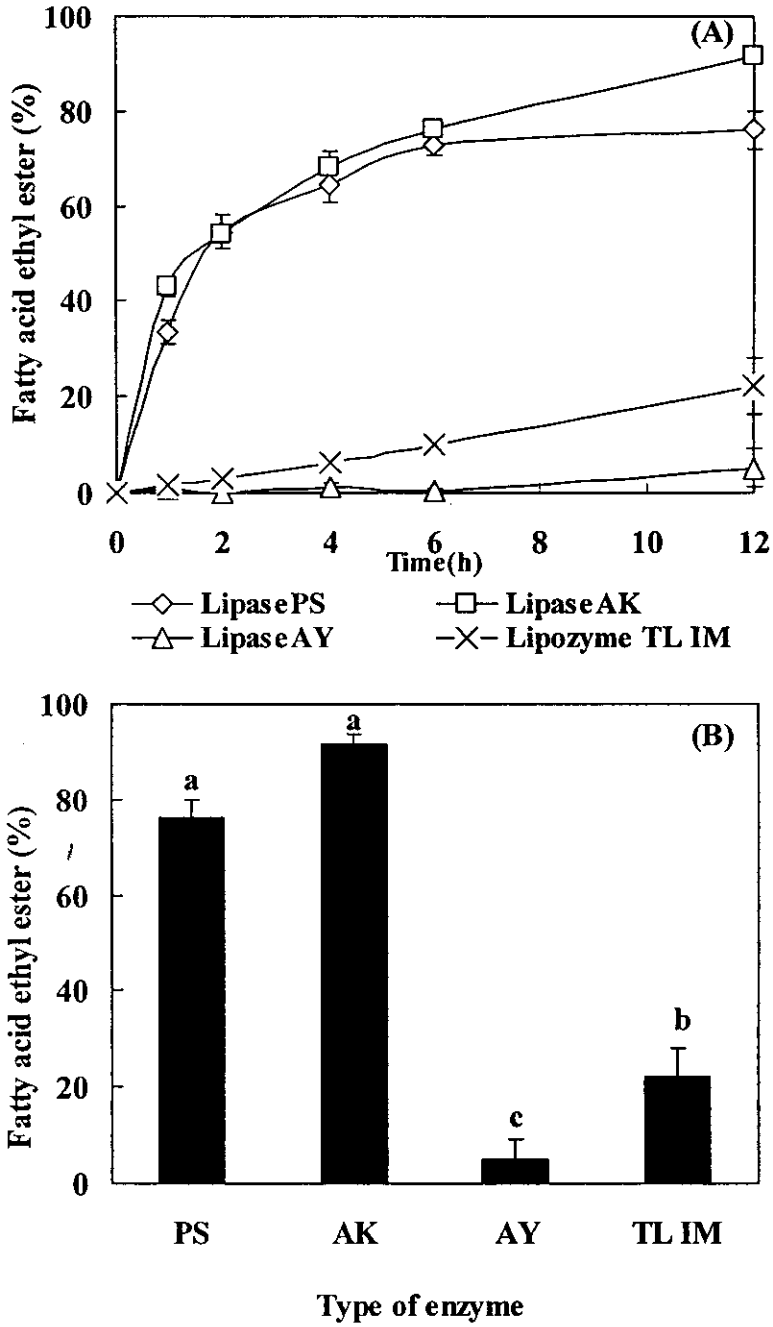


Figure 26. Comparison of transesterification activity of used palm oil by four immobilized lipases. A reaction mixture consisted used palm oil 0.168 g, ethanol was added in the mole ratio of 1:3 (oil: ethanol), 2% water, and 10% immobilized lipase by oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Time course of fatty acid ethyl ester formulation by transesterification reaction; (B) Relative yield of fatty acid ethyl ester content after 12 h. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

จากรายงานวิจัยที่ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ไลเปสพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์คือ *Pseudomonas cepacia, Candida rugosa* และ *Thermomyces lauginosa* จะมีบริเวณจับ (binding site) ที่มีฝาปิดไฮโดรโฟบิค (hydrophobic lid) โดยเอนไซม์ไลเปสที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Pseudomonas cepacia* จะมีบริเวณจับเป็นรูปกรวย (funnel) (Pleiss *et al.*, 1998) ในขณะที่ไลเปสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosa* มีบริเวณจับที่มีลักษณะเป็นรอยแยก (crevice) (Wang *et al.*, 2007) แต่เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Candida rugosa* จะมีบริเวณจับเป็นรูปอุโมงค์ (tunnel) และมีบริเวณจับกับแอลกอฮอล์ที่ไม่มีการปิดกั้นเหมือนเอนไซม์ชนิดอื่น (Pleiss *et al.*, 1998) ซึ่งอาจเป็นผลทำให้เอทานอลสามารถเข้าไปในบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้อย่างง่ายและเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในที่สุด

3.3 การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น

จากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างกรดปาล์มิติกกับเอทานอลของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทั้ง 4 ชนิด ในสภาวะที่ใช้กรดปาล์มิติก 0.168 กรัม เติมเอทานอลในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อกรดปาล์มิติกเป็น 1 ต่อ 1 มีน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 1 (จากเอทานอล) ใช้เอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 10 ต่อน้ำหนักน้ำมันและเติมตัวทำละลายเฮกเซน 1 มิลลิลิตรเพื่อทำละลายกรดปามล์มิติก ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 27 และภาพที่ 28 พบว่าเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นได้สูงสุดคือ Lipase PS รองลงมาคือ Lipozyme TL IM, Lipase AK และ Lipase AY โดยสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์เมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาได้ร้อยละ 80, 75, 61 และ 3 ตามลำดับ (ภาพที่ 28B) สาเหตุที่การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ Lipase AY เกิดขึ้นได้น้อยอาจเนื่องมาจากมีน้ำในระบบน้อยหรือเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเอทานอลที่เติมในระบบ

จากภาพที่ 27B จะเห็นได้ว่า Lipase AY แทบจะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้เลยเมื่อเทียบกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Foresti และคณะ (2005a) ที่ศึกษากิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ Lipase AY ที่ตรึงรูปบนแอคคูเรลในการผลิตเอทิลโอเลเอตจากกรดโอเลอิกและเอทานอล และพบว่าเอทานอลมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากเกิดการดึงน้ำออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ นอกจากนี้เอทานอลรวมทั้งกรดโอเลอิกยังส่งผลข้างเคียง (side reaction) ต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ในขณะที่การเร่งปฏิกิริยาโดย Lipase AK และ Lipase PS จะเกิดการยับยั้งโดยเอทานอลน้อยกว่า เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์ได้ดีกว่า สำหรับกิจกรรมการทำงานของ Lipozyme TL IM พบว่าเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นได้มากกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสและ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นโดยให้ผลิตภัณฑ์เอทิลเอสเทอร์ที่สูงใกล้เคียงกับ Lipase PS จากผลการทดลองข้างต้นอาจกล่าวได้ว่าไลเปสชนิดนี้สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เป็นกรดไขมันอิสระได้ดีกว่าสับสเตรทที่เป็นน้ำมัน หรือมีความสามารถในการสร้างพันธะเอสเทอร์มากกว่าการย่อยพันธะเอสเทอร์ และอาจเนื่องมาจากในปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นมีการเติมเฮกเซนเป็น

ตัวทำละลายทำให้เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันและแอลกอฮอล์ ซึ่งจากงานวิจัยของ Soumanou และ Bornscheuer (2003b) ที่ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันพืชโดยเอนไซม์ไลเปสชนิดต่าง ๆ พบว่า ไลเปสจากเชื้อ *Thermomyces lanuginosa* สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นและผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ถึงร้อยละ 97 ในระบบที่มีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ในขณะที่การเร่งปฏิกิริยาแทบจะไม่เกิดขึ้นเลยในระบบที่ไม่ใช้ตัวทำละลาย

ในการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นที่ใช้กรดปาล์มิติกเป็นสารตั้งต้นจะมีผลทำให้ในระบบมีความเป็นกรดสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งใช้น้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีตัวทำละลายเพื่อช่วยเจือจางความเป็นกรดให้ลดลงอีกทั้งยังใช้เพื่อการทำละลายกรดปาล์มิติกซึ่งมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลเนื่องจากสามารถละลายน้ำมันได้ดีและส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ โดยเฮกเซนมีค่า log P เป็น 3.98 ซึ่งจากการศึกษาของ Manjon และคณะ (1991 อ้างโดย Foresti และคณะ 2005b) พบว่าตัวทำละลายที่มีค่า log P มากกว่า 3.5 จะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากความไม่มีขั้วของตัวทำละลายสามารถป้องกันการถูกดึงน้ำที่อยู่รอบโมเลกุลของเอนไซม์ออกโดยแอลกอฮอล์ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์มีความคงตัวและสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี Colombie และคณะ (1998) รายงานว่าน้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นในสภาวะที่มีตัวทำละลายของเอนไซม์ไลเปสโดยในระบบต้องมีน้ำในปริมาณที่สามารถให้ความคงตัวแก่เอนไซม์ แต่ไม่มากเกินไปจนมีผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากในระหว่างการทำปฏิกิริยาจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำร่วมกับเอสเทอร์ ดังนั้นการเพิ่มน้ำในระบบที่มากเกินไปจึงทำให้แนวโน้มในการเร่งปฏิกิริยาลดลง

3.4 การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยา

เมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นและเอสเทอริฟิเคชั่นดังแสดงในภาพที่ 24, 26 และ 28 สามารถสรุปเป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ได้ดังตารางที่ 20 โดยเอนไซม์ตรึงรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันปาล์มใช้แล้วได้ดีที่สุดคือ Lipase AY ในขณะที่เอนไซม์ชนิดอื่น (Lipase PS, Lipase AK and Lipozyme TL IM) มีความสามารถในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่น้อยกว่า คือมีกิจกรรมร้อยละ 65-74 ของกิจกรรม Lipase AY อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไลเปสชนิดนี้ไม่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์เนื่องจากเมื่อมีการเติมเอทานอลในระบบ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 4 และ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ให้กิจกรรมสูงสุดในปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นและทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ Lipase AY มีโครงสร้างของบริเวณเร่งที่เกิดการสัมผัสและถูกยับยั้งโดยแอลกอฮอล์ได้ง่าย ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

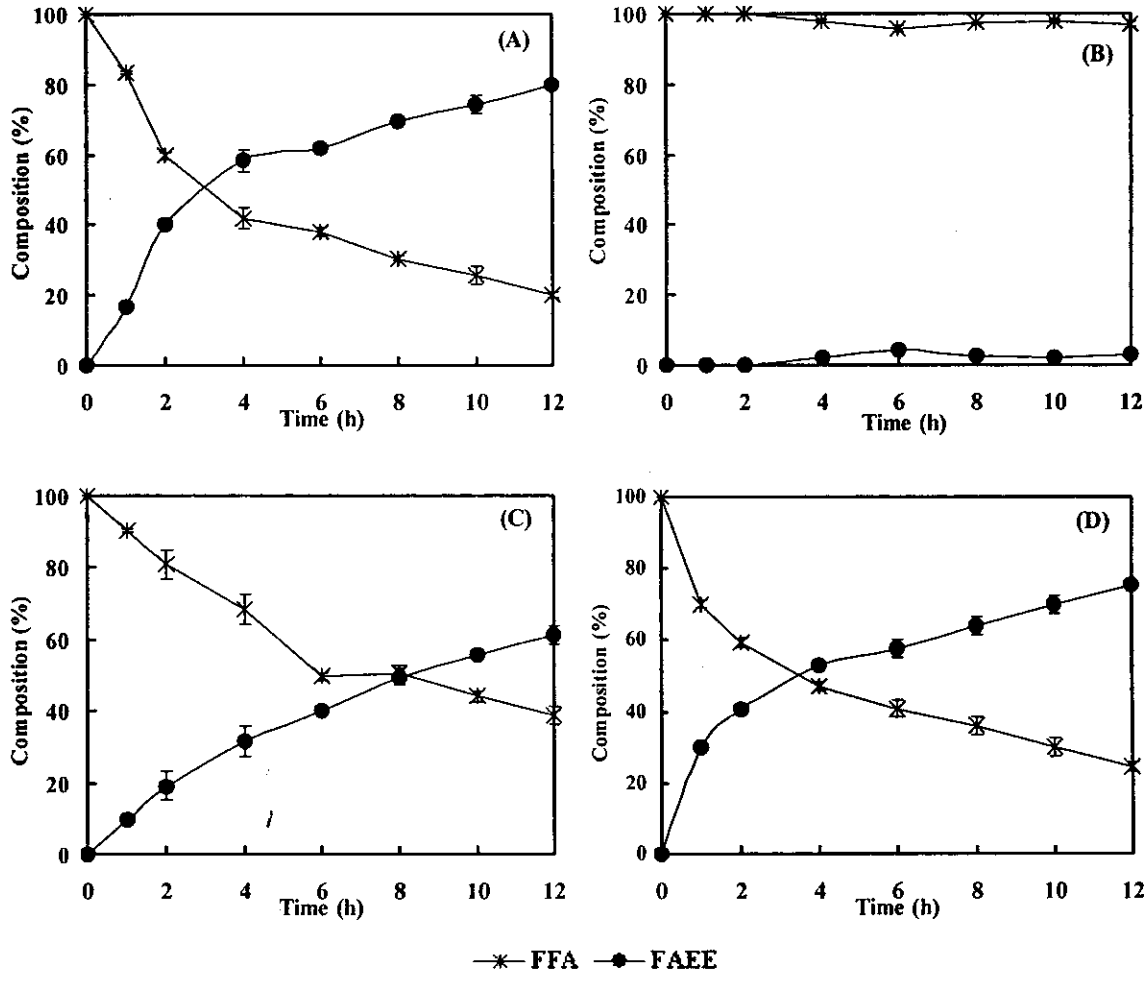


Figure 27. Time course of the direct esterification of palmitic acid using immobilized lipases. A reaction mixture consisted of 0.168 g palmitic acid dissolved in 1 ml of hexane, ethanol was added in the molar ratio of 1:1 (palmitic acid: ethanol), 0.9 % water, and 10 % immobilized lipase by oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Lipase PS, (B) Lipase AY, (C) Lipase AK, and (D) Lipozyme TL IM. FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

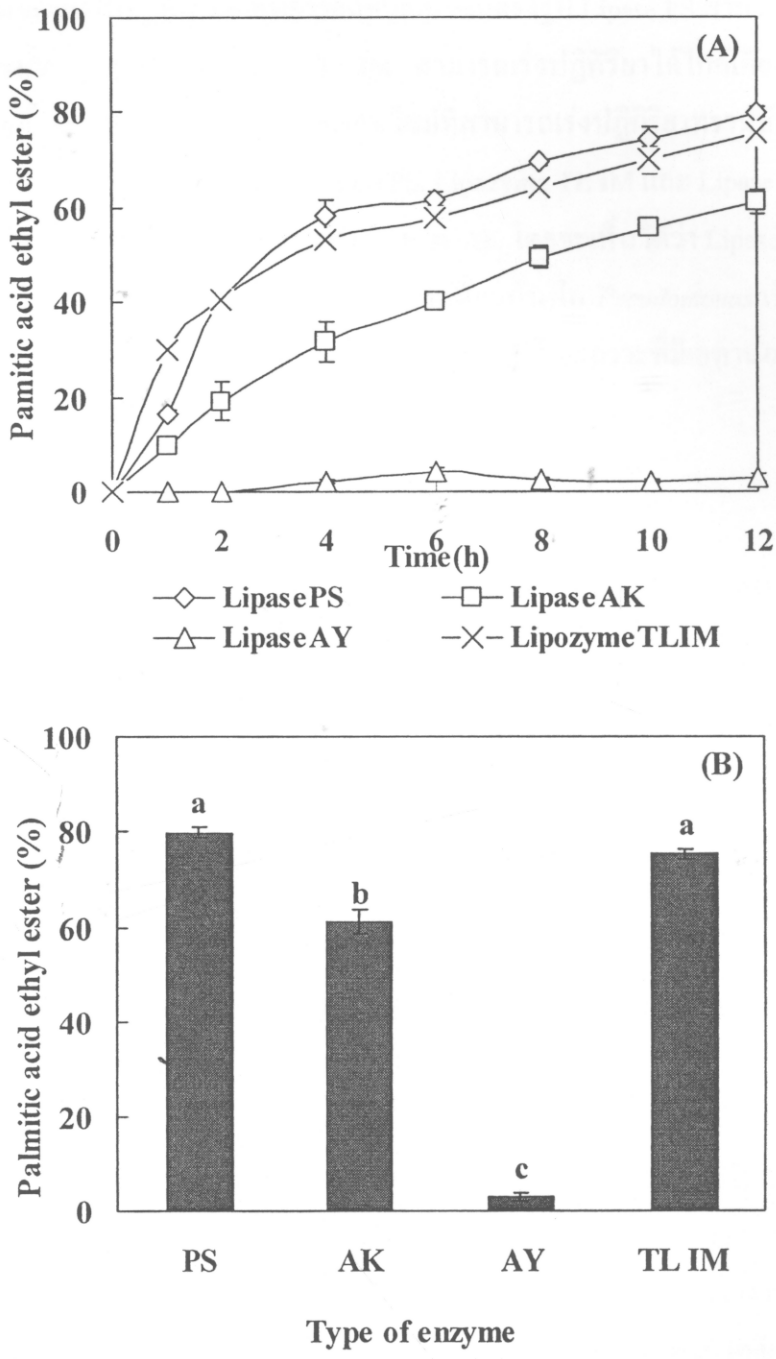


Figure 28. Comparison of esterification activity of four immobilized lipases. A reaction mixture consisted of 0.168 g palmitic acid dissolved in 1 ml of hexane, ethanol was added in the molar ratio of 1:1 (palmitic acid: ethanol), 0.9 % water, and 10 % immobilized lipase by oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Time course of palmitic acid ethyl ester formulation by esterification reaction; (B) Relative yield of palmitic acid ethyl ester content after 12 h. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

ในขณะที่ในปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเอนไซม์ตรึงรูป Lipase PS สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดและเอนไซม์ทางการค้า Lipozyme TL IM สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ใกล้เคียงกับ Lipase PS รองลงมาคือ Lipase AK และ Lipase AY และเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ดีที่สุดคือ Lipase AK ในขณะที่เอนไซม์ Lipase PS, Lipozyme TL IM และ Lipase AY ให้กิจกรรมที่ร้อยละ 83, 24 และ 6 เมื่อเทียบกับกิจกรรมของ Lipase AK โดยจะเห็นได้ว่า Lipase PS และ Lipase AK ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์สกุลเดียวกันคือ *Pseudomonas* เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ดีทั้งยังสามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีเอทานอลเป็นสับสเตรทและมีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย

Table 20. Relative activity of immobilized lipases.

Immobilized lipase	Relative activity (%)		
	Hydrolysis	Esterification	Transesterification
Lipase PS	71	100	83
Lipase AK	74	76	100
Lipase AY	100	4	6
Lipozyme TL IM	65	94	24

Relative activity: The yield of the product from each enzyme compared to the maximum yields in the same reaction.

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ และคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเพื่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ซึ่งกลไกในการทำปฏิกิริยายังไม่มีการรายงานที่แน่ชัด แต่จากรายงานของ Al-Zuhair และคณะ (2007) กล่าวว่ากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลอาจเกิดได้ทั้งจากการไฮโดรไลซีสน้ำมันเป็นกรดไขมันอิสระก่อนแล้วจึงเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างกรดไขมันอิสระและแอลกอฮอล์ หรืออาจเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันกับแอลกอฮอล์โดยตรง จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบความจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น และเอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการผลิตไบโอดีเซล โดยสามารถสรุปความจำเพาะได้ดังนี้คือ Lipase AY มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้สูงที่สุด ในขณะที่ Lipase PS มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นได้สูงสุด และ Lipase AK มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ดีที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสมาศึกษาการทำงานร่วมกับ

เอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นและทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ดี เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มใช้แล้ว อย่างไรก็ตามเนื่องจากเอนไซม์ Lipase AY เป็นเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยเอทานอล ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงศึกษาเวลาที่จะเติมเอทานอลเพื่อลดปัญหาดังกล่าวลงพร้อมกับศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ผสม

4. การศึกษาการใช้เอนไซม์ผสมและเวลาในการเติมเอทานอลในการผลิตเอทิลเอสเทอร์

4.1 การใช้เอนไซม์ผสมในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มใช้แล้วและเอทานอลในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมน้ำจนมีน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 10 ต่อน้ำหนักน้ำมัน ผสมกับเอทานอลในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1 และประยุกต์ใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันได้สูงสุด คือ Lipase AY กับเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้สูงสุดคือ Lipase AK และเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นได้สูงสุด คือ Lipase PS โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปในสัดส่วนที่เท่ากันในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน เนื่องจาก Lipase AY ถูกยับยั้งการทำงานได้ง่ายโดยเอทานอล ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเติมเอทานอลหลังการทำปฏิกิริยาไป 30 นาที เพื่อให้ Lipase AY ย่อยสลายน้ำมันก่อน เนื่องจากผลการศึกษาความจำเพาะของ Lipase AY ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสพบว่าใน 30 นาทีแรก เอนไซม์สามารถย่อยน้ำมันได้เป็นกรดไขมันอิสระสูงถึงร้อยละ 46 จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการผลิตในระบบที่มีการใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง Lipase PS และ Lipase AY (ภาพที่ 29B) และเอนไซม์ผสมระหว่าง Lipase AK และ Lipase AY (ภาพที่ 29C) กับการใช้เอนไซม์เดี่ยวคือ Lipase AK (ภาพที่ 29A) พบว่าปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ผสมสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้ใกล้เคียงกันและให้ผลผลิตที่สูงกว่าการใช้เอนไซม์เดี่ยว โดยเกิดเป็นเอทิลเอสเทอร์ที่ร้อยละ 83 , 84 และ 79 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณากรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นพบว่าในระบบที่มีการเติมเอนไซม์ผสมของ Lipase AK และ Lipase AY จะทำให้มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงในครึ่งชั่วโมงแรกของการทำปฏิกิริยาที่ร้อยละ 45 (ภาพที่ 29C) ซึ่งมากกว่าในระบบอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Lipase AY สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้ดีร่วมกับการย่อยสลายน้ำมันของ Lipase AK เองจึงไปส่งเสริมการทำงานของ Lipase AK ทำให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้ Lipase AK เพียงชนิดเดียวหรือชุดการทดลองที่ใช้ Lipase PS ร่วมกับ Lipase AY โดยเมื่อมีการเติมเอทานอลลงในปฏิกิริยาปริมาณกรดไขมันอิสระก็ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างกรดไขมันอิสระและเอทานอลเกิดเป็นเอทิลเอสเทอร์ ซึ่งพบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสผสมที่ใช้ปริมาณของเอนไซม์ Lipase AK เพียงครึ่งของระบบเอนไซม์เดี่ยวแต่กลับสามารถให้ผลผลิตที่สูงกว่า

ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้เอนไซม์ผสมในการทำปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลโดยมีวัตถุประสงค์หลักในการลดต้นทุนของการผลิตเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่สามารถผลิตไบโอดีเซลได้สูงมีราคาแพง จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการนำเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเด่นในด้านต่างๆ มาช่วยในการปรับปรุงคุณลักษณะของน้ำมันเพื่อให้เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา ดังงานวิจัยของ Watanabe และคณะ (2007b) ที่ศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันกรด (acid oil) ซึ่งเป็นน้ำมันที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากการกลั่นน้ำมันบริสุทธ์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ในการย่อยน้ำมันให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระทั้งหมดก่อน แล้วจึงใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* ในการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ โดยศึกษาการแบ่งเติมเมทานอลเพื่อทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเป็น 2 ขั้นตอน พบว่าสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึงร้อยละ 91 และใช้เอนไซม์ทั้งหมดในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเพียงร้อยละ 2 ซึ่งน้อยกว่าการใช้ไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* ชนิดเดียวที่ต้องใช้เอนไซม์ถึงร้อยละ 6 (Watanabe *et al.*, 2007a) และในงานวิจัยของ Wang และคณะ (2006) ที่ศึกษาการนำ Lipozyme TL IM ซึ่งเป็นเอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่มีราคาต่ำมาผสมกับ Novozym 435 ซึ่งมีราคาแพงกว่าเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าการผสมเอนไซม์ร่วมกับการใช้ตัวทำละลายคือ *tert*-butanol และการเติมตัวดูดซับกลีเซอรอลคือ molecular sieve ขนาด 3 อังสตรอมในสภาวะที่ใช้สัดส่วนโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 3.9:1 สามารถให้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึงร้อยละ 97

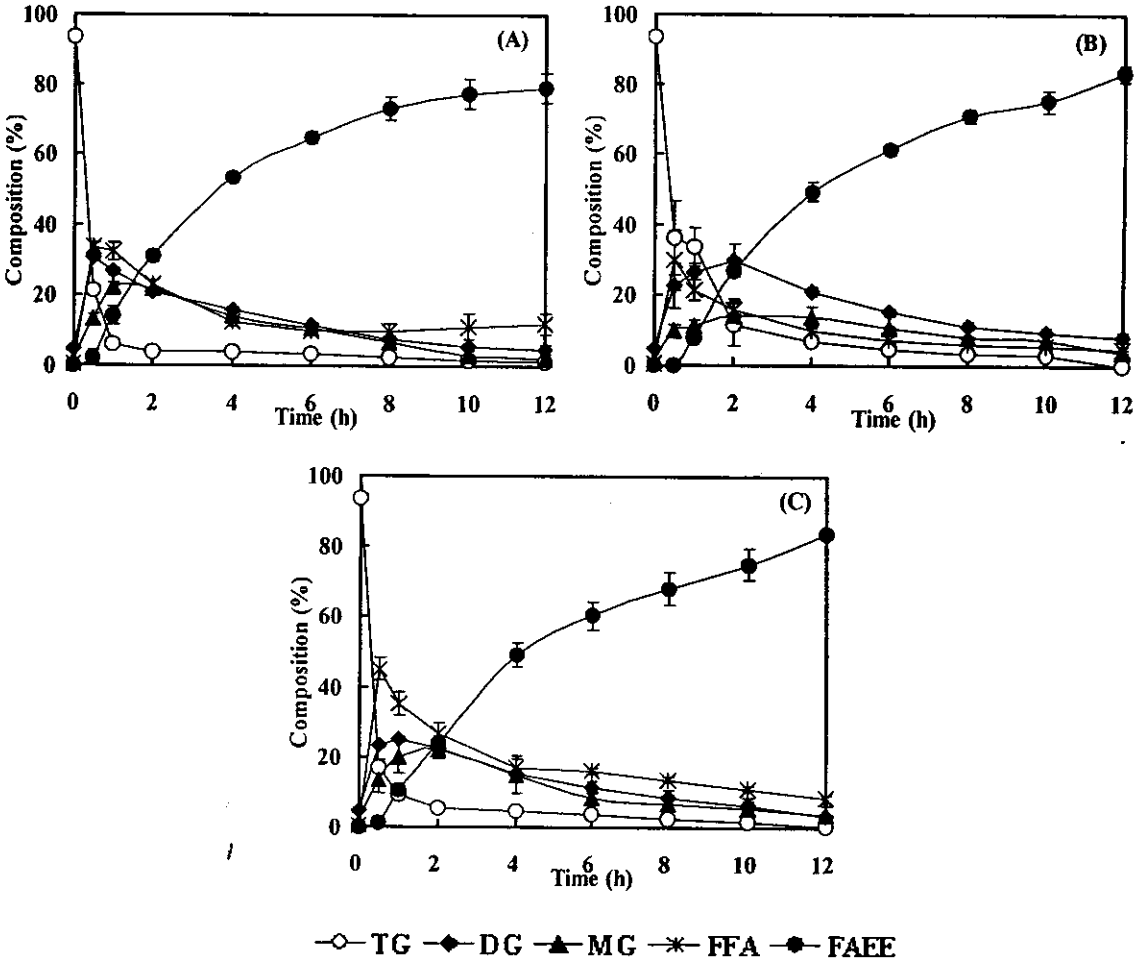


Figure 29. Comparision of ethyl ester production from used palm oil by single and mixed immobilized lipases. A reaction mixture consisted of 0.168 g used palm oil, 10% water, and 10 % immobilized lipases by oil weight, ethanol was added in the mole ratio of 1:3 (oil: ethanol) at 30 min, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A): Lipase AK (B): Lipase PS and AY (C): Lipase AK and AY. TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

4.2 การศึกษาผลของเวลาในการเติมเอทานอลต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

จากผลการทดลองที่พบว่ากิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟีเคชั่นและปฏิกิริยาเอสเทอริฟีเคชั่นของ Lipase AY ต่ำนั้นอาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยเอทานอล ดังนั้นในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ผสมจึงได้เติมเอทานอลหลังการเริ่มปฏิกิริยาแล้ว 30 นาที เพื่อให้ Lipase AY สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกรดไขมันอิสระก่อน อย่างไรก็ตามเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการเติมเอทานอลที่สามารถลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยแอลกอฮอล์และให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทิลเอสเทอร์สูงสุด ในการทดลองนี้จึงศึกษาผลของการเติมเอทานอลที่เวลา 0, 30 และ 60 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เอนไซม์เดี่ยว (Lipase AK) ในสภาวะที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปในสัดส่วนที่เท่ากันปริมาณรวมร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน น้ำมันปาล์มใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมน้ำจนมีน้ำในระบบปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมันผสมกับเอทานอลในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1 ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 30 พบว่าระยะเวลาในการเติมเอทานอลที่ช้าเกินไปจะส่งผลให้อัตราการผลิตและร้อยละของผลผลิตลดลง (ภาพที่ 31) โดยการเติมเอทานอลที่ 0 ชั่วโมง จะให้การผลิตเอทิลเอสเทอร์สูงที่สุด ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการเติมเอทานอลที่ 0 ชั่วโมงมีแนวโน้มของการผลิตที่เพิ่มขึ้นตามเวลาโดยเฉพาะช่วง 0 ถึง 6 ชั่วโมงแรกการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งการเติม เอทานอลหลังการเร่งปฏิกิริยาแล้วจะมีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันของ Lipase AY โดยส่งผลให้มีปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น สังเกตได้จากการเติมเอทานอลที่ 0 ชั่วโมงให้ปริมาณกรดไขมันอิสระหลังปฏิกิริยาผ่านไป 30 นาทีที่ร้อยละ17 ในขณะที่การเติมเอทานอลที่เวลา 30 และ 60 นาที ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 45 และ 42 ตามลำดับ (ภาพที่ 30B, C and D) อย่างไรก็ตามการเติมเอทานอลที่ช้าเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยาเอสเทอริฟีเคชั่นของกรดไขมันกับเอทานอลเกิดขึ้นช้าจนทำให้ผลผลิต เอทิลเอสเทอร์โดยรวมของระบบน้อยกว่าระบบที่เติมเอทานอลที่ชั่วโมงที่ 0 โดยจากภาพที่ 31A

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆ จะเห็นการเร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์จะเกิดขึ้นเมื่อมีการเติมเอทานอลโดยปริมาณผลผลิตจะแปรผกผันกับเวลาที่เติมเอทานอล ส่งผลให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สุดท้ายในชุดการทดลองที่เติมเอทานอลในตอนเริ่มต้นสูงที่สุด (Control และ 0 min) โดยปริมาณเอทิลเอสเทอร์หลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมงในชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ Lipase AK เพียงอย่างเดียวและเติมเอทานอลในตอนเริ่มต้นให้ผลิตเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 86 แต่ยังน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ผสมที่เติมเอทานอลตอนเริ่มต้น ซึ่งให้ผลผลิตร้อยละ 89 ส่วนชุดการทดลองที่เติมเอทานอลที่ 30 และ 60 นาที มีเอทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นร้อยละ 84 และ 78 ตามลำดับ (ภาพที่ 31B) จะเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์ผสมที่มีความจำเพาะต่างกันทำให้สามารถลดปริมาณของการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดลงได้ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่าสามารถลดปริมาณ Lipase AK ที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟีเคชั่นลงได้ครึ่งหนึ่ง

จากงานวิจัยของ Foresti และคณะ (2005a) ได้ศึกษาผลของเวลาในการเติมเอทานอลต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟีเคชั่นของกรดโอเลอิกกับเอทานอลโดย Lipase AY ที่ตรึงรูปบนแอคคูเรลในกรณีที่ใช้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อกรดโอเลอิกเป็น 1 ต่อ 1 พบว่าการแบ่งเติมเอทานอลเป็น 2

ขั้นตอนคือตอนเริ่มต้นและหลังจากการทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง จะช่วยลดการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเอทานอลลงได้ถึงร้อยละ 20 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมเอทานอลทั้งหมดในตอนเริ่มต้น และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 1.5 เท่าของโมลน้ำมัน พบว่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลง 3 เท่า จากงานวิจัยดังกล่าวบ่งบอกถึงความสามารถของ Lipase AY ในการทนต่อการยับยั้งของเอทานอลที่ความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นการยืดระยะเวลาในการเติมเอทานอลจะช่วยลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจาก เอทานอลทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้ในช่วงแรก

สาเหตุที่เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง เนื่องจากเกิดการดึงน้ำออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ส่งผลให้เอนไซม์เสียความคงตัวและไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ แต่จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการเติมเอทานอลที่ 0 ชั่วโมง ไม่ทำให้ Lipase AY สูญเสียกิจกรรมโดยยังให้ปริมาณกรดไขมันอิสระและโมโนกลีเซอไรด์ที่สูง ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีปริมาณน้ำในระบบเป็นร้อยละ 10 ทำให้เอนไซม์มีความคงตัวมากขึ้นและอาจเป็นผลมาจากการนำเอทานอลไปผลิตเอทิลเอสเทอร์ของ Lipase AK ทำให้สามารถลดการยับยั้งการทำงานของ Lipase AY ได้บางส่วน เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตเอทิลเอสเทอร์ที่สูงและใช้ปริมาณเอนไซม์ Lipase AK น้อยกว่าเป็นครึ่งหนึ่ง จึงเลือกชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง Lipase AK และ Lipase AY ที่มีการเติมเอทานอลในตอนเริ่มต้นเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

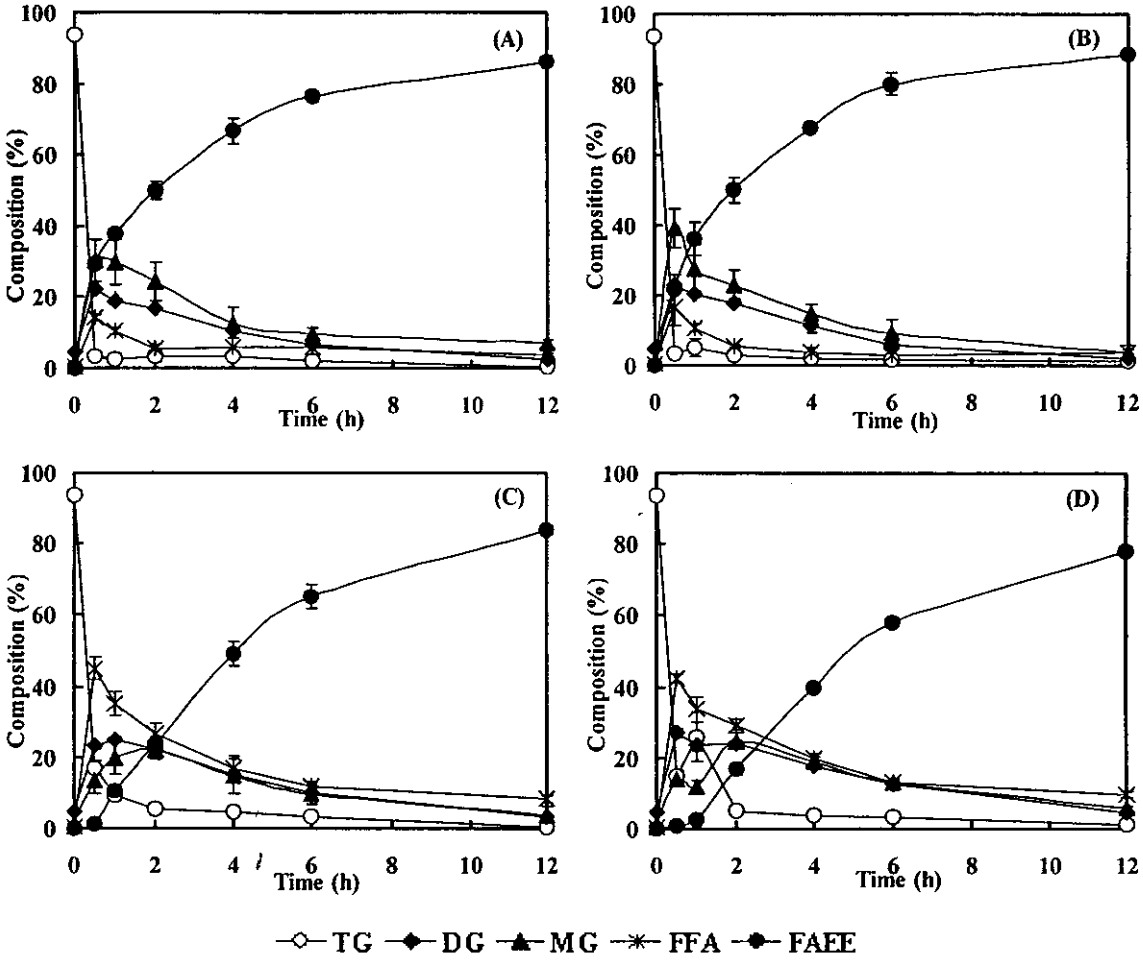


Figure 30. Effect of ethanol addition time on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil using mixed immobilized Lipases AK and Lipase AY. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 3:1 molar ratio of ethanol: oil was added at 30 min, 10% of water, and 10 % of immobilized lipases based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A): Control (0 min, Lipase AK), (B): 0 min, (C): 30 min, (D): 60 min. TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

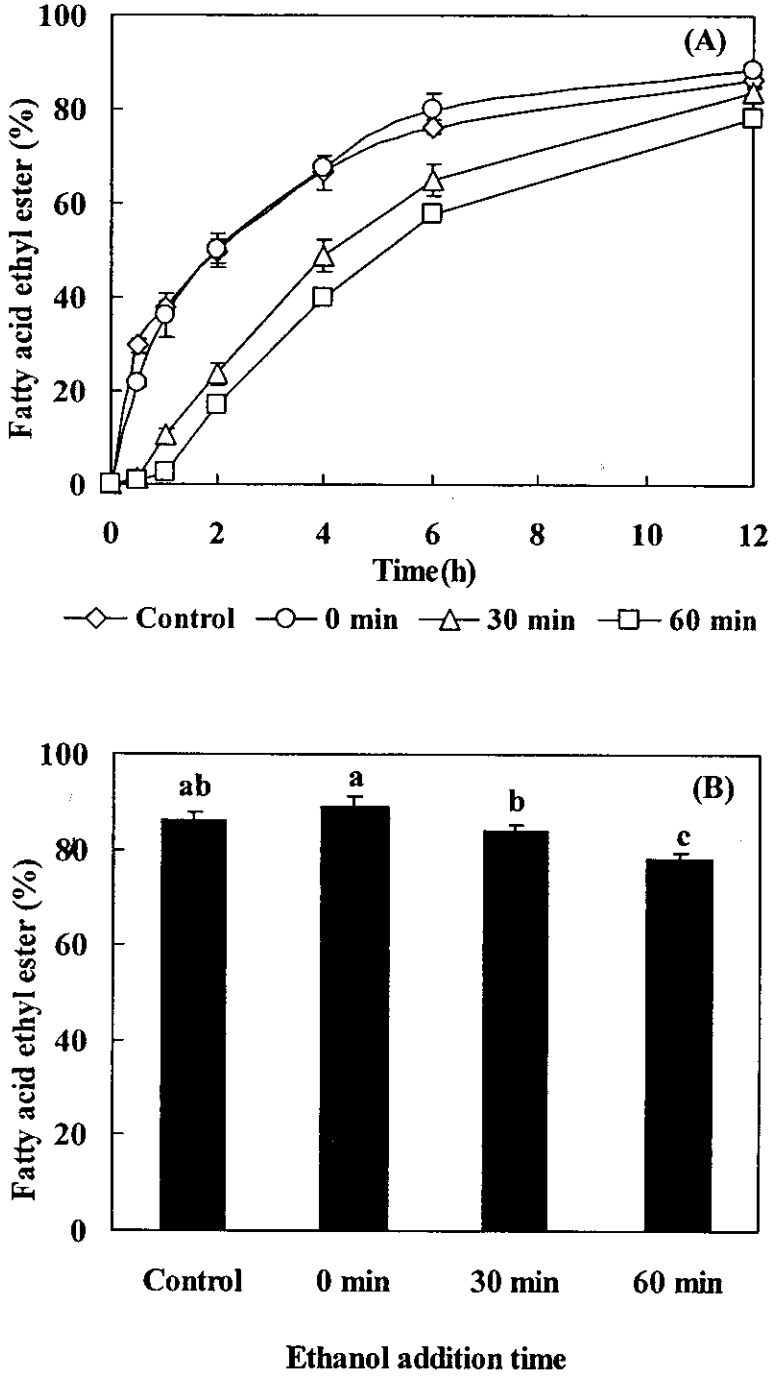


Figure 31. Comparison of ethanol addition time on tranesterification activity of mixed immobilized Lipase AK and Lipase AY. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 3:1 molar ratio of ethanol: oil, 10% of water, and 10 % of immobilized lipases based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Time course of fatty acid ethyl ester formulate by transesterification reaction; (B) Relative yield of fatty acid ethyl ester content after 12 hour. Control: Lipase AK (0 min). Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

4.3 การศึกษาผลของสัดส่วนเอนไซม์ต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

การผสมเอนไซม์มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อให้เกิดการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเด่นในการเร่งปฏิกิริยาที่ต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติของการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์พบว่า Lipase AK มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นได้สูงกว่า Lipase AY ในขณะที่ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกลับต่ำกว่า ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ การทดลองนี้จึงเป็นการหาสัดส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้งสองในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ในสภาวะที่ใช้น้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัม เติมน้ำจนมีปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ผสมกับเอทานอลในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1 ใช้เอนไซม์ในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน และศึกษาผลของการลดสัดส่วนของ Lipase AK ลงเหลือร้อยละ 25 เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้สัดส่วน Lipase AK เท่ากับร้อยละ 50 และ 100 ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 32 และ 33 พบว่าการเพิ่มสัดส่วนของ Lipase AK ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามในชุดการทดลองที่มีสัดส่วนของ Lipase AK ที่ร้อยละ 50 และ 100 จะให้ร้อยละของเอทิลเอสเทอร์ที่เท่ากัน โดยเมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาพบว่า ชุดการทดลองที่มีสัดส่วนของเอนไซม์ Lipase AK และ Lipase AY เท่ากับ 25:75, 50:50 และ 100:0 จะสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 67, 86 และ 86 ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.58, 0.76 และ 0.90 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 33B)

การที่อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในชุดการทดลองที่มีสัดส่วนของ Lipase AK ร้อยละ 50 และ 100 มีความแตกต่างกันทั้งที่ร้อยละของผลผลิตสูงสุดมีค่าเท่ากัน เนื่องจากการมี Lipase AK เพิ่มมากขึ้น โอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นจะมีมากขึ้น ขณะเดียวกันการมี Lipase AY เข้ามาเสริมในการช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายองค์ประกอบในน้ำมันส่งผลให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีปริมาณใกล้เคียงกับระบบที่ใช้ Lipase AK ในสัดส่วนที่สูง ซึ่งการนำ Lipase AY มาผสมมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อให้เกิดการย่อยสลายน้ำมันและช่วยลดปริมาณ Lipase AK ที่ต้องใช้ในการทำปฏิกิริยา ทั้งนี้จากรายงานการวิจัยของ Foresti และคณะ (2005a) กล่าวว่า Lipase AY เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีราคาถูก ดังนั้นหากสามารถศึกษากลไกของทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 และนำเอนไซม์มาผสมกันจึงอาจเป็นการลดต้นทุนของการผลิตได้อีกทางหนึ่ง ปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ไลเปสผสมในการผลิตไบโอดีเซลแล้วในหลายประเทศเช่น จากการศึกษาของ Li และคณะ (2006) พบว่าการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นน้ำมันจากเมล็ดเรปและเมทานอลของเอนไซม์ไลเปสผสมระหว่าง Lipozyme TL IM ร้อยละ 3 และ Novozym 435 ร้อยละ 1 ในระบบที่ใช้ *tert*-butanol เป็นสารละลายจะให้ผลผลิตที่สูงถึงร้อยละ 95 โดยการผสมเอนไซม์มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อลดต้นทุนของเอนไซม์เนื่องจาก Novozym 435 ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการผลิตได้สูงนั้นมีราคาแพงจึงมีความพยายามที่จะนำเอนไซม์ที่มีราคาถูกกว่ามาผสมเพื่อช่วยเสริมการทำงานและลดปริมาณการใช้เอนไซม์ลง หรือจากงานวิจัยของ Watanabe และคณะ (2007b) ซึ่งศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันกรดซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจาก

การสกัดน้ำมันด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ไลเปส 2 ชนิดคือไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ในการย่อยสลายน้ำมันก่อนที่จะนำมาผลิตไบโอดีเซลโดยการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นด้วยไลเปสจาก *Candida antarctica* ซึ่งเป็นการเตรียมน้ำมันให้เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์และลดต้นทุนในการผลิตโดยพบว่าระบบดังกล่าวช่วยลดปริมาณเอนไซม์ที่ต้องใช้ลง 1 ใน 3 ของการผลิตแบบเดิมที่ใช้ไลเปสจาก *Candida antarctica* เพียงอย่างเดียว เมื่อพิจารณาถึงร้อยละของผลผลิตสูงสุดที่ได้และเพื่อเป็นการศึกษาถึงการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ซึ่งอาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ จึงเลือกชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ผสมในสัดส่วนร้อยละ 50 และใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 10 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

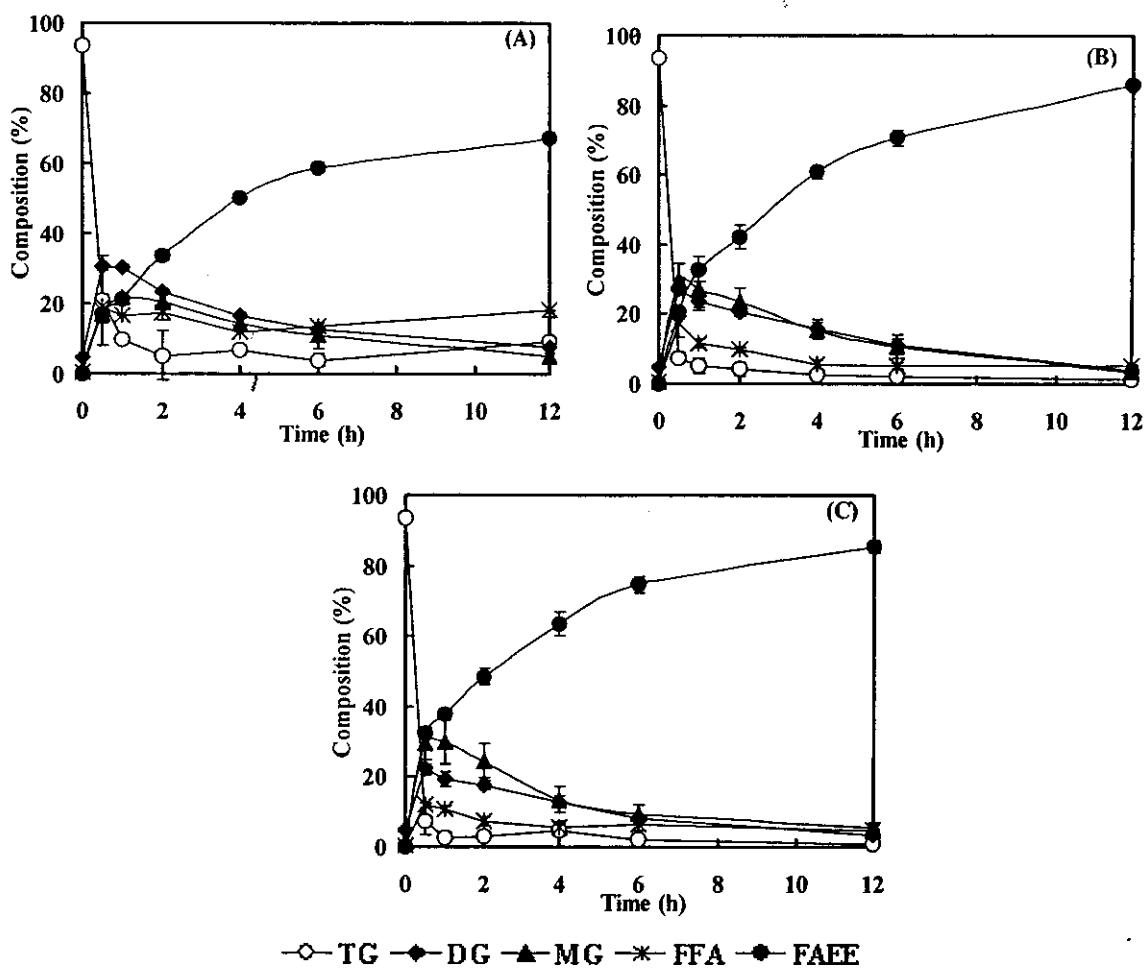


Figure 32. Effect of enzyme ratio on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil using mixed immobilized lipases. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 3:1 molar ratio of ethanol: oil, 10% of water, and 10 % of immobilized lipases based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A):25:75 (B):50:50 and (C):100:0 of immobilized lipase AK:AY. TG:Triglyceride; DG:Diglyceride; MG:Monoglyceride; FFA:Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

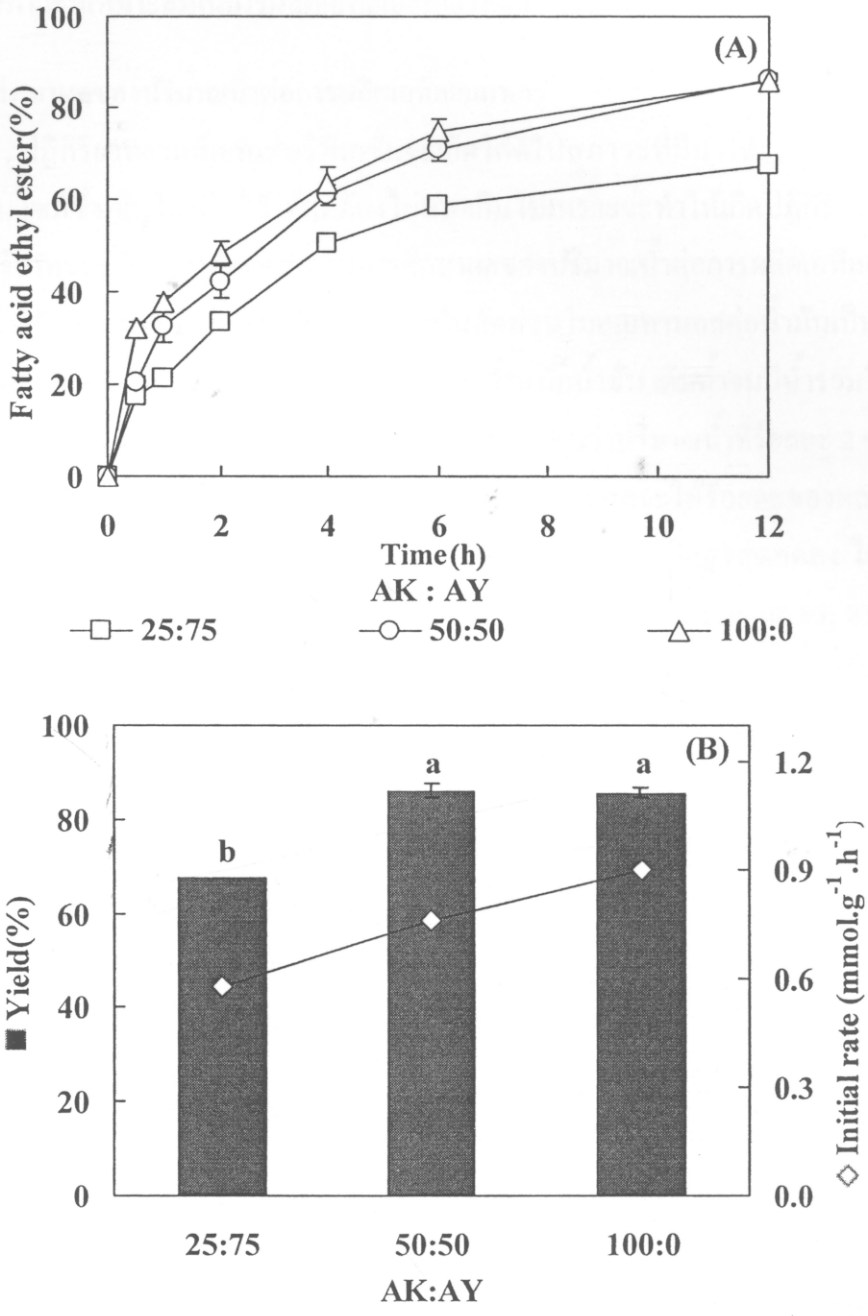


Figure 33. Comparison of immobilized lipases ratio on tranesterification reaction. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 3:1 molar ratio of ethanol: oil, 10% of water, and 10 % of immobilized lipases based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Time course of fatty acid ethyl ester formulation by transesterification reaction; (B) Initial rateand relative yield of fatty acid ethyl ester content after 12 h. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยเอนไซม์ไลเปสผสม

5. 1 การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นจะเกิดได้ดีในสภาวะที่มีน้ำในระบบเพียงพอที่จะคงสภาพของเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนไว้ได้แต่ต้องไม่มากเกินไปเพราะจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสมากกว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ในการศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้ว 0.168 กรัม ผสมกับเอทานอลในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1 เติมเอนไซม์ตรึงรูป Lipase AK: AY (1:1) ร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน เติมน้ำจนมีน้ำรวมในปฏิกิริยาที่ระดับต่างๆ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 34 และภาพที่ 35 พบว่าปริมาณน้ำที่ร้อยละ 2 ของน้ำมันในชุดควบคุม ซึ่งเป็นปริมาณน้ำที่มีอยู่ในน้ำมันรวมกับน้ำในเอทานอลจะให้ร้อยละของผลผลิตสูงสุดที่ร้อยละ 88.64 และเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมากขึ้นจะทำให้ร้อยละของผลผลิตสูงสุดลดลง โดยในชุดการทดลองที่มีน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 จะเกิดเอทิลเอสเทอร์ขึ้นร้อยละ 83, 83, 80 และ 77 ตามลำดับ (ภาพที่ 35) และเมื่อพิจารณาอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นพบว่าปริมาณน้ำที่ร้อยละ 2 จะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดที่ 0.78 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจะเกิดระหว่างเฟสของน้ำและน้ำมันดังนั้นการเติมน้ำเพิ่มไปในระบบจะทำให้พื้นผิวระหว่างเฟสเพิ่มมากขึ้น (Noureddini *et al.*, 2005) ส่งผลให้เอนไซม์ทำงานได้มากขึ้น แต่การมีน้ำมากเกินไปก็ไม่เหมาะต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นโดยที่ปริมาณน้ำในระบบร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 จะให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาเป็น 0.65, 0.64, 0.61 และ 0.54 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง เนื่องจากเอนไซม์มีแนวโน้มที่จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสมากกว่า โดยสังเกตได้จากปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นหลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 5, 6, 10 และ 13 ในชุดการทดลองที่มีน้ำ 5, 10, 15 และ 20 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งมีน้ำอยู่ร้อยละ 2 จะเกิดกรดไขมันอิสระเพียงร้อยละ 3 (ภาพที่ 34)

จากงานวิจัยของ Zhao และคณะ (2007) ที่ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองและ เอทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ Lipase AK อิสระ พบว่าเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีน้ำอยู่ร้อยละ 10 ในระบบที่ไม่มีตัวทำละลาย โดยให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 57 และจากงานวิจัยของ Chen และคณะ (2008) ที่ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากกรดโอเลอิกและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ NS81020 ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspegilus oryzae* ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าปริมาณน้ำเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำในระบบ เนื่องจากน้ำจะเป็นตัวเจือจางเมทานอลทำให้ความเป็นพิษของเมทานอลต่อเอนไซม์ลดลง โดยระดับน้ำที่ร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมันจะให้ร้อยละของผลผลิตสูงสุด แต่เมื่อปริมาณน้ำมากเกินไปจะทำปฏิกิริยาดำเนินไปในทางไฮโดรไลซีสทำให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ลดลง ในขณะที่ Liko และคณะ (1995) พบว่าการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นกรดโอเลอิกกับบิวทานอลของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และ *Pseudomonas fluorescens* จะเกิดได้ดีในสภาวะที่มีน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 3.2 โดยให้ผลผลิตร้อยละ 90

ในการทำปฏิกิริยา 30 ชั่วโมง และจากงานวิจัยของ Qin และคณะ (2008) ซึ่งศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจากตัวเซลล์ของเชื้อ *Rhizopus chinensis* พบว่าปริมาณน้ำในระบบที่มากขึ้นทำให้การผลิตไบโอดีเซลลดลง โดยในระบบที่มีน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 2 สามารถผลิตไบโอดีเซลได้สูงที่สุดที่ร้อยละ 86 หลังการทำปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง และพบว่าปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้ผลผลิตลดลงเนื่องจากทำให้เอนไซม์รวมตัวกันไม่เกิดการกระจายตัวในระบบทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อีกทั้งยังมีผลทำให้สมดุลของระบบดำเนินไปสู่ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันแทน และจากงานวิจัยของ Yesiloglu (2004) ได้ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาเอทาโนไลซีสของน้ำมันดอกทานตะวันโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป พบว่าการเติมน้ำในปริมาณมากขึ้นในระบบจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นเอทิลเอสเทอร์ลดลง โดยระบบที่ไม่มีการเติมน้ำจะให้ร้อยละของเอทิลเอสเทอร์ทสูงที่สุดที่ประมาณร้อยละ 75 หลังการทำปฏิกิริยา 7 ชั่วโมง

ดังนั้นเพื่อให้ได้ร้อยละของผลผลิตและอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่สูงอีกทั้งลดปัญหาที่อาจเกิดจากการที่มีน้ำมากเกินไป เนื่องจากในระหว่างการทำปฏิกิริยาน้ำจะเป็นทั้งสารตั้งต้นของปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสและผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งจะเกิดการหมุนเวียนของน้ำในระบบอยู่แล้ว จึงไม่จำเป็นต้องเติมน้ำเข้าไปอีก จึงเลือกปริมาณน้ำที่ร้อยละ 2 ซึ่งมีอยู่แล้วในสารตั้งต้นเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

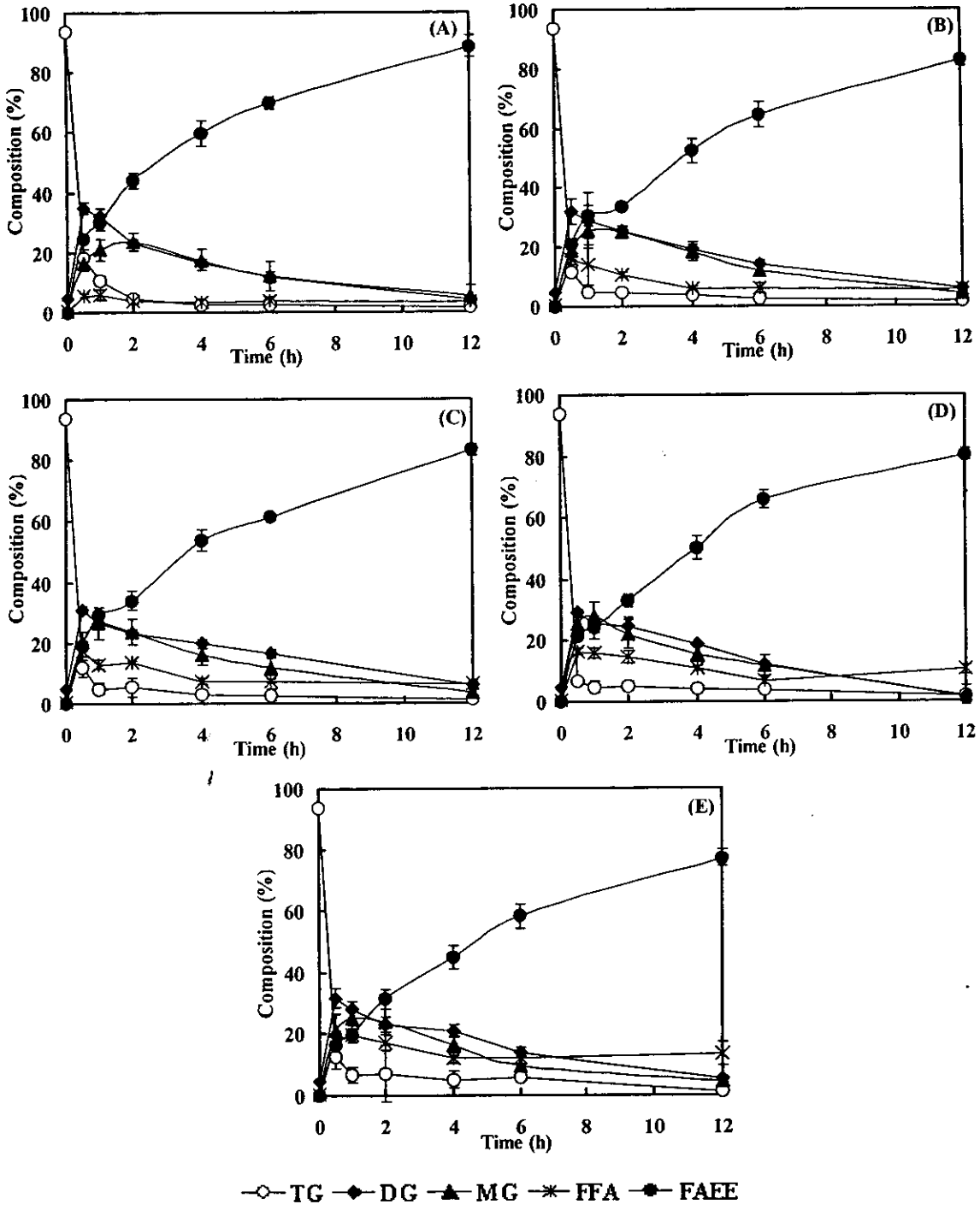


Figure 34. Effect of water content on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil using mixed immobilized lipases. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 3:1 molar ratio of ethanol: oil, and 10 % of mixed immobilized lipases AK and AY based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A): Control (2%), (B): 5%, (C): 10%, (D): 15%, (E): 20% of water content. TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

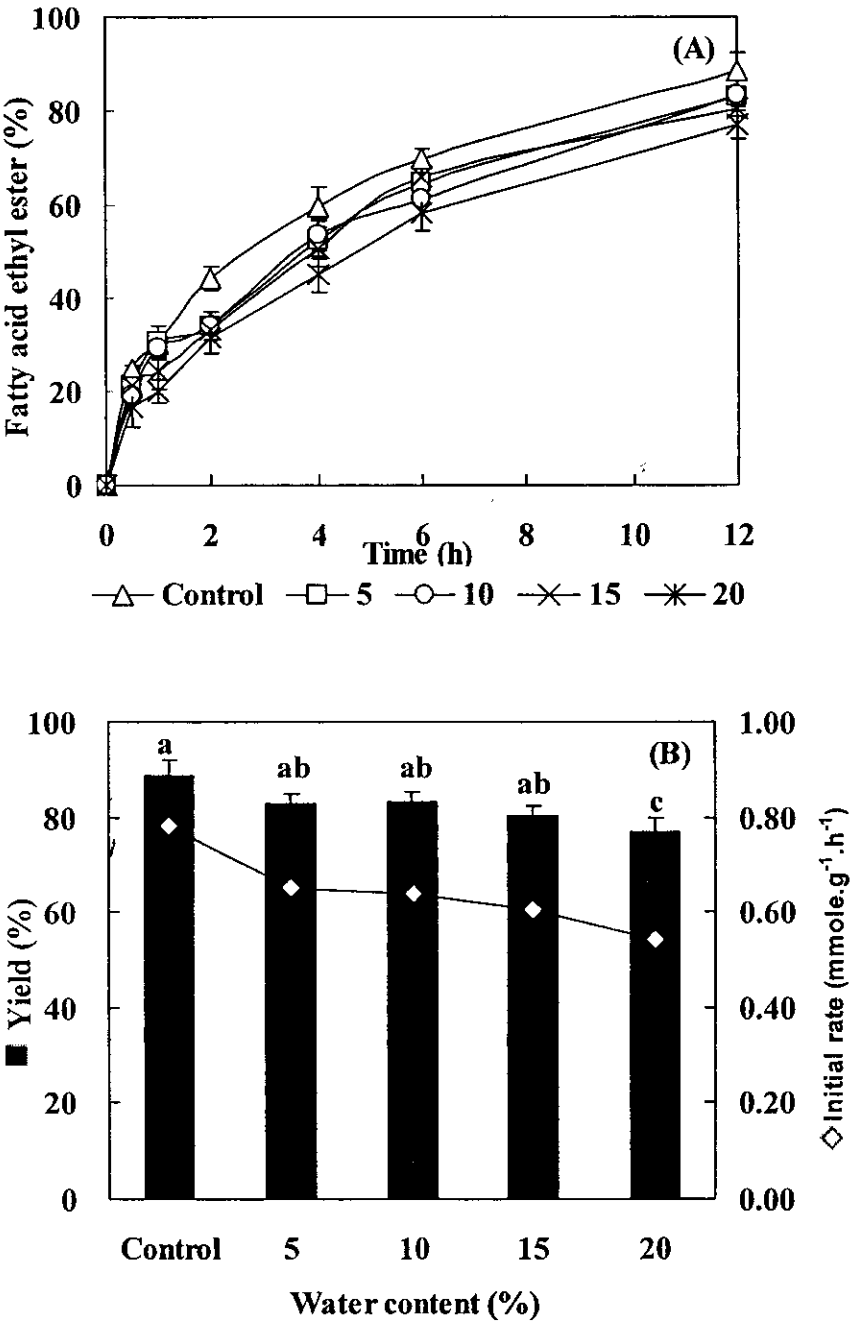


Figure 35. Comparison of water content on tranesterification reaction. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 3:1 molar ratio of ethanol: oil, and 10 % of mixed immobilized lipases AK and AY (50:50) based on oil weight, was incubated at 45°C at 500 rpm. Control is 2% of water content. (A) Time course of fatty acid ethyl ester formulate by transesterification reaction; (B) Initial rateand relative yield of fatty acid ethyl ester content after 12 h. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

5.2 การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ผสมต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีผลอย่างยิ่งต่อการพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาและต้นทุนของการผลิต จากการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ผสมต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์ โดยใช้น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 0.168 กรัม ผสมกับเอทานอลในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1 เติมเอนไซม์ตรึงรูป Lipase AK: AY ที่สัดส่วน 50: 50 ในปริมาณต่างๆ โดยมีน้ำรวมในปฏิกิริยาเป็นร้อยละ 2 พบว่าปริมาณเอนไซม์ผสมที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ร้อยละของผลผลิตเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังแสดงในภาพที่ 36 และสามารถนำมาสรุปรวมดังภาพที่ 37 ซึ่งพบว่าปริมาณเอนไซม์ผสมร้อยละ 15 จะให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 91 ในขณะที่ปริมาณเอนไซม์ผสมร้อยละ 10 ให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 89 แต่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 10 มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นที่น้อยกว่าคือ 0.87 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาเฉลี่ยเป็น 0.99 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง และชุดการทดลองที่มีปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 1 และ 5 เร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 18 และ 64 ตามลำดับและมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นเป็น 0.12 และ 0.32 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้นทำให้เอนไซม์มีโอกาสที่จะเจอกับสารตั้งต้นมากและทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงขึ้น ซึ่งในช่วงแรกการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วแต่เมื่อปฏิกิริยาดำเนินต่อไปจนเอนไซม์ทั้งหมดจับกับสับสเตรทอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ และเมื่อสับสเตรทเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ทำให้ปริมาณสับสเตรทลดลง ประกอบกับการมีผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก ส่งผลให้สมดุลของการทำปฏิกิริยามีแนวโน้มที่จะเกิดผลิตภัณฑ์ลดลง อีกทั้งการเกิดผลพลอยได้ที่เป็นกลีเซอรอลอาจมีผลยับยั้งการผลิตได้อีกทางหนึ่ง ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและร้อยละของผลผลิตเริ่มคงที่ดังจะเห็นได้ว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกรณีที่มีเอนไซม์ร้อยละ 15 จะเริ่มคงที่จนมีร้อยละของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ใกล้เคียงกับระบบที่มีเอนไซม์ร้อยละ 10 (ภาพที่ 36C และ 36D) เมื่อพิจารณาการผลิตในระบบที่มีเอนไซม์ในปริมาณน้อย คือที่ร้อยละ 1 (ภาพที่ 36A) จะเห็นได้ว่าไตรกลีเซอไรด์ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทิลเอสเทอร์หลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมงเพียงร้อยละ 18 และส่วนใหญ่กลายเป็นไดกลีเซอไรด์ที่ร้อยละ 27 เหลือโมโนกลีเซอไรด์และกรดไขมันอิสระเพียงร้อยละ 4 และ 2 ตามลำดับ และยังมีไตรกลีเซอไรด์อยู่ในปริมาณมากคือร้อยละ 49 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิล (acyl group) กันโดยตรงระหว่างไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์โดยไม่จำเป็นต้องเกิดการย่อยสลายกรดไขมันทั้งหมดบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ก่อน

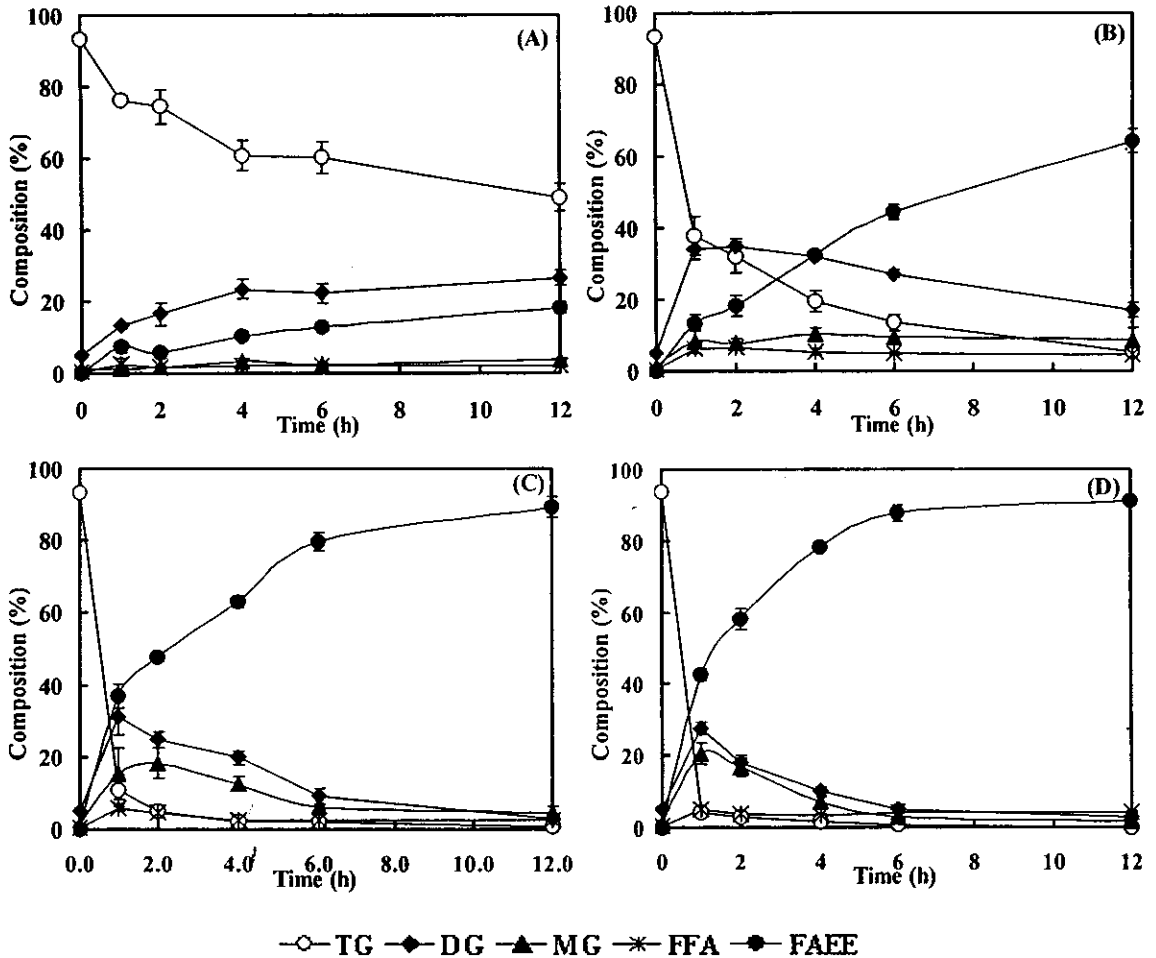


Figure 36. Effect of mixed immobilized lipase AK and AY (50: 50) content on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 3:1 molar ratio of ethanol: oil, and 2% of water was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A): 1% (B): 5%, (C): 10%, (D): 15% of enzyme content. TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

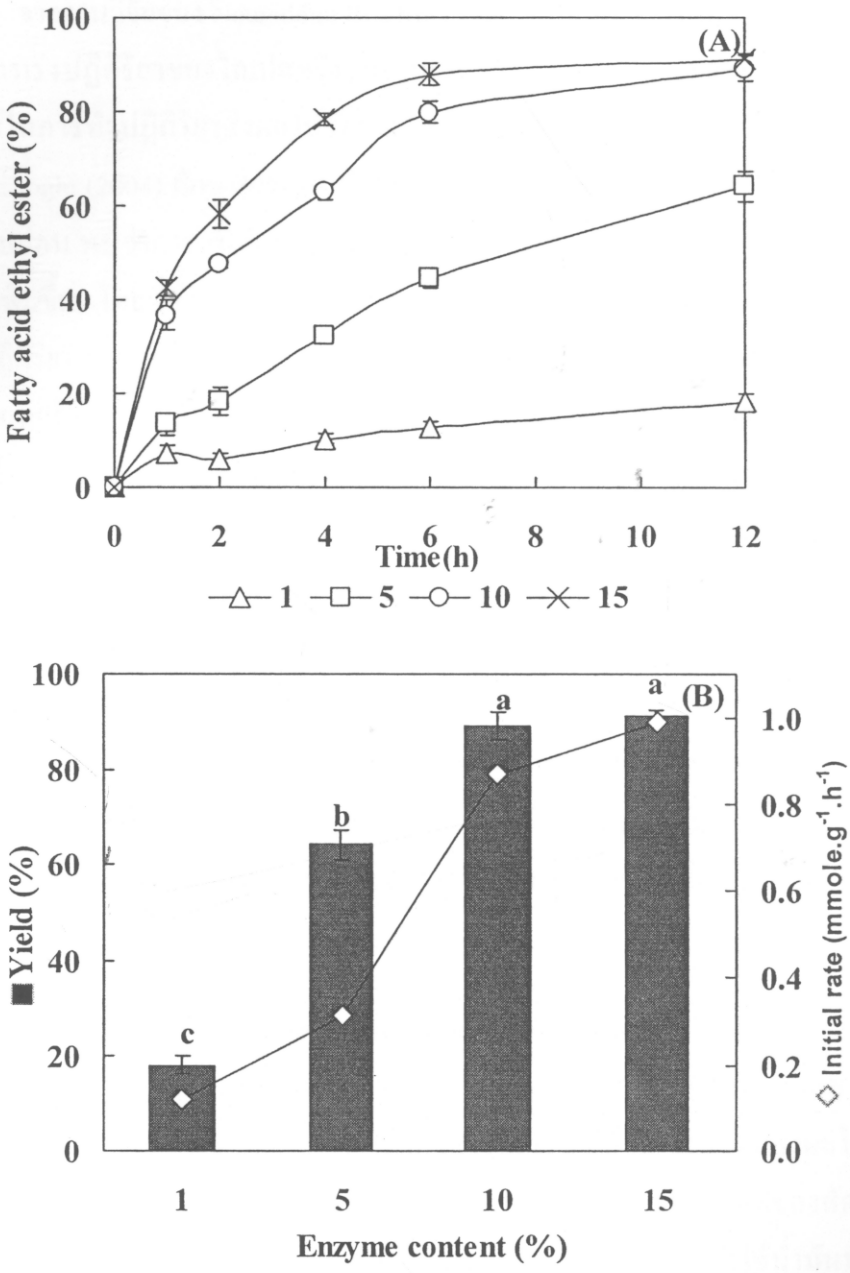


Figure 37. Comparison of amount of mixed immobilized lipase AK and AY (50: 50) on tranesterification reaction. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 3:1 molar ratio of ethanol: oil, and 2% of water was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Time course of fatty acid ethyl ester formulation by transesterification reaction; (B) Initial rate and relative yield of fatty acid ethyl ester content after 12 h. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

จากงานวิจัยของ Noureddini และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองโดยการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาส่งผลให้ร้อยละของเอทิลเอสเทอร์สูงขึ้น แต่มีอัตราการผลิตที่ลดลง ในขณะที่ Yesiloglu (2004) ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาเอทาโนไลซีสของน้ำมันดอกทานตะวันด้วยเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน พบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ไลเปสมีผลทำให้ร้อยละของผลผลิตและอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณเอนไซม์ 200 มิลลิกรัมจะสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 11 หลังการทำปฏิกิริยา 30 นาที แต่เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 300, 400 และ 500 มิลลิกรัม จะสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้สูงขึ้นเป็นร้อยละ 19, 30 และ 50 ตามลำดับ นอกจากนี้ Shah (2004) ยังได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำและเอทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และพบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณเอนไซม์ 10 มิลลิกรัม จะสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ประมาณร้อยละ 50 และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 50 และ 70 มิลลิกรัม จะสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้นเป็นประมาณร้อยละ 60 และ70 ตามลำดับ แต่ปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไป คือที่ 100 มิลลิกรัม ระบบจะมีความหนืดสูงทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงส่งผลให้ผลผลิตลดลงตามไปด้วย เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตและการนำไปใช้ การเติมเอนไซม์ร้อยละ 10 ต่อน้ำหนักน้ำมัน จึงเป็นปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากให้ร้อยละของผลผลิตที่สูงและใกล้เคียงกับปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 15 แต่ใช้เอนไซม์ในปริมาณที่น้อยกว่า

5.3 การศึกษาผลของสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์

แอลกอฮอล์มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเฉพาะแอลกอฮอล์สายสั้นโดยมีผลทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่เอไมด์ซึ่งเชื่อมโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ส่งผลให้เอนไซม์ขาดความคงตัว (Ophardt, 2003) และไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จากการศึกษาผลของสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว 0.168 กรัมผสมกับเอทานอลในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1 เติมเอนไซม์ตรึงรูป Lipase AK: AY (50:50) ร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน โดยมีน้ำรวมในปฏิกิริยาร้อยละ 2 ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 38 และภาพที่ 39 พบว่าสัดส่วนโมลของแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ร้อยละของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเพิ่มขึ้น โดยกรณีที่มีเอทานอลเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาคือในสัดส่วนเอทานอลต่อน้ำมันที่ 3:1 แนวโน้มของการผลิตจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่นานขึ้น (ภาพที่ 38C) ซึ่งแตกต่างจากกรณีสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันที่ 1:1 และ 2:1 ซึ่งการเร่งปฏิกิริยาเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 2 และ 4 ตามลำดับ (ภาพที่ 38A และภาพที่ 38B) เนื่องจากสับสเตรทเอทานอลหมดลง จากภาพที่ 39B แสดงร้อยละของเอทิลเอสเทอร์หลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง พบว่าสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันที่ 1:1, 2:1 และ 3:1 จะให้ผลผลิตเป็นร้อยละ 37, 72 และ 89 และมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นเท่ากับ 0.71, 1.00 และ 0.87 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่สัดส่วนของเอทา

นอลต่อน้ำมัน 2:1 จะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงแต่ผลผลิตสุดท้ายมีค่าน้อยกว่าเนื่องจากปริมาณเอทานอลที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยามีน้อยกว่า ซึ่งการที่อัตราการเร่งปฏิกิริยาในกรณีของสัดส่วนเอทานอลต่อน้ำมันที่ 3:1 มีค่าน้อยกว่าที่ 2:1 น่าจะมีสาเหตุมาจากการเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยแอลกอฮอล์ จากการศึกษาของ Shimada และคณะ (2002) ที่ผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปจาก *Candida antarctica* พบว่าร้อยละของผลผลิตจะลดลงเมื่อจำนวนโมลของเมทานอลและเอทานอลมีมากเกินกว่าระดับที่สามารถละลายได้ในน้ำมันคือ 1/2 และ 2/3 ตามลำดับ เนื่องจากแอลกอฮอล์ที่มีมากเกินไปจะรวมตัวเป็นเม็ดในน้ำมันและมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Yesiloglu (2004) ที่พบว่าการเติมเอทานอลที่มากกว่า 3 เท่าของโมลน้ำมันมีผลทำให้การเร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ของไลเปสจากตับอ่อนลดลง และยังมีเอทานอลส่วนเกินหรือบางครั้งมีไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เหลืออยู่ในปริมาณมาก โดยการลดลงของผลผลิตเนื่องจากเอทานอลที่เพิ่มขึ้นบ่งบอกว่าเกิดการดึงน้ำจากเอนไซม์ไปสู่เอทานอลทำให้เอนไซม์สูญเสียน้ำส่งผลให้เอนไซม์ขาดความคงตัวไม่สามารถจะเร่งปฏิกิริยาได้

จากการศึกษาของ Soumanou และ Bornscheuer (2003a) ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันและเมทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ได้กล่าวว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อสายพันธุ์ *Pseudomonas* สามารถทนต่อการยับยั้งการทำงานเนื่องจากเมทานอลได้ โดยพบว่าไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* สามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 90 ในสภาวะที่ใช้เมทานอลความเข้มข้น 4.5 เท่าของโมลน้ำมัน ในขณะที่การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizomucor miehei* และ *Thermomyces lanuginose* จะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของเมทานอลเกิน 3 เท่าของโมลน้ำมัน การลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากแอลกอฮอล์สามารถทำได้หลายแนวทางทั้งการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่นอกจากจะสามารถละลายแอลกอฮอล์ได้แล้วก็ควรจะสามารถละลายกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำปฏิกิริยาได้ด้วย หรือวิธีแบ่งเติมแอลกอฮอล์เพื่อลดความเข้มข้นทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

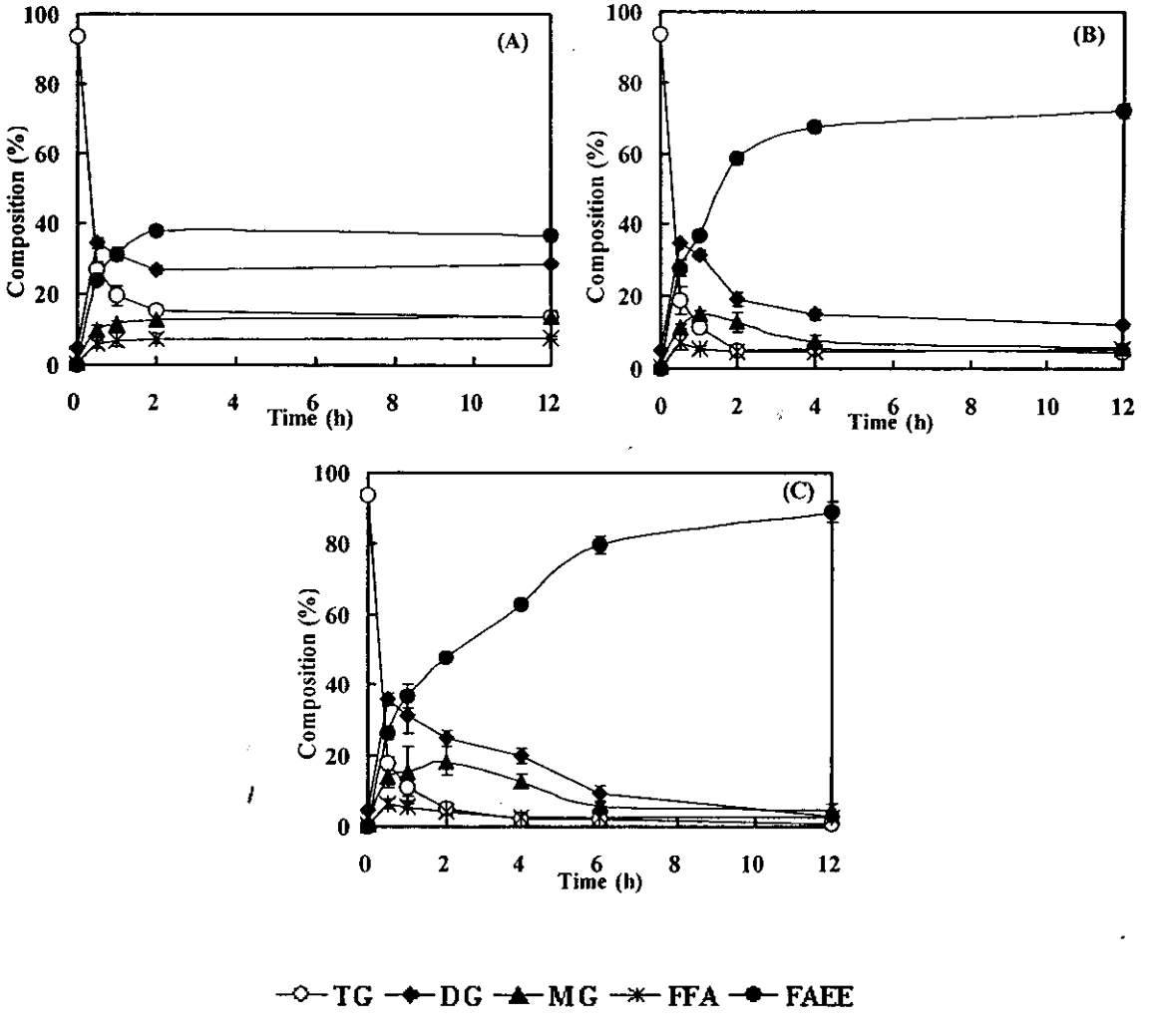


Figure 38. Effect of ethanol molar ratio on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 10% of mixed immobilized lipase AK and AY (50:50), and 2% of water based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A): 1:1 (B): 2:1, (C): 3:1 of ethanol: oil molar ratio. TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

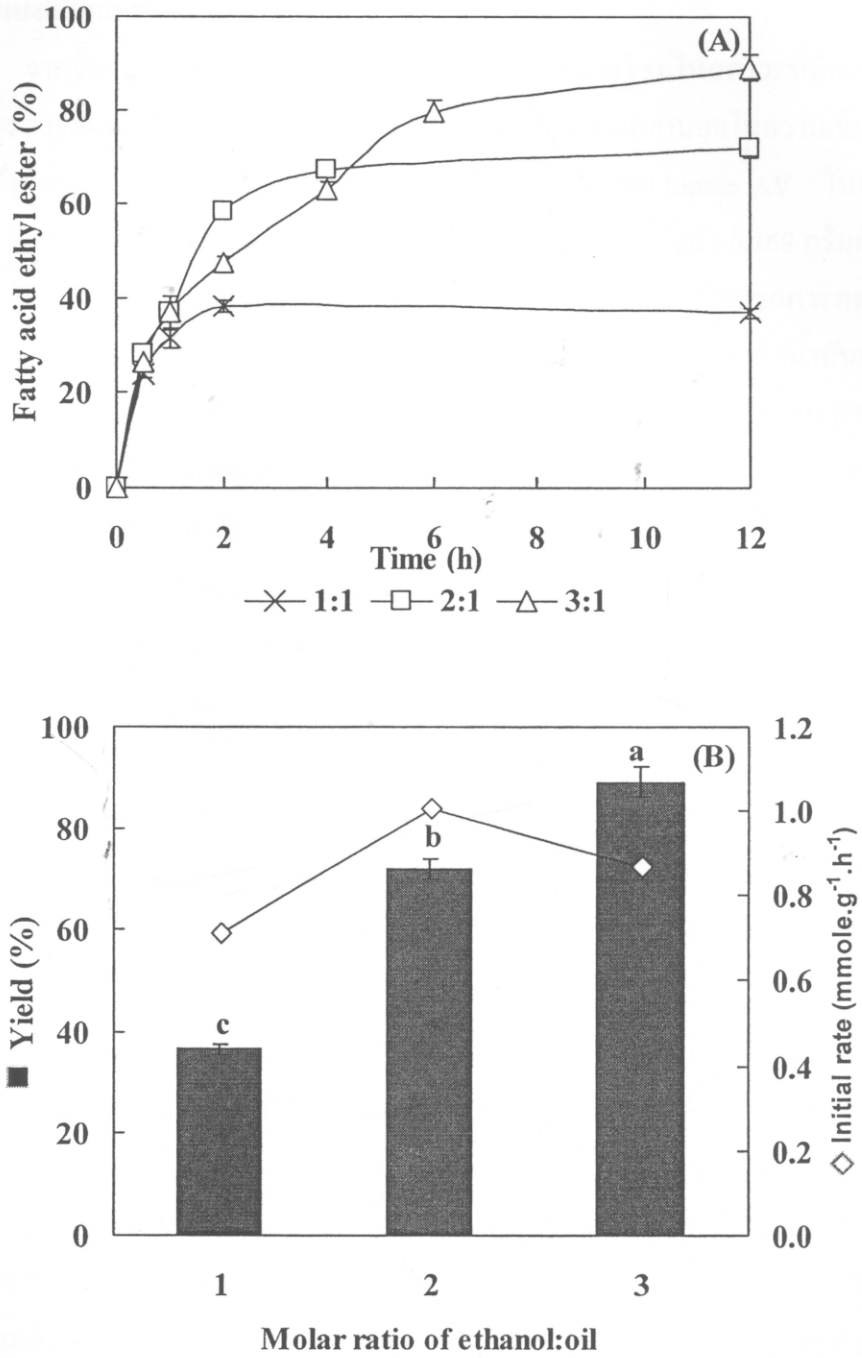


Figure 39. Comparison of ethanol: oil molar ratio on tranesterification reaction. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 10% of mixed immobilized lipase AK and AY (50:50), and 2% of water based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Time course of fatty acid ethyl ester formulation by transesterification reaction; (B) Initial rateand relative yield of fatty acid ethyl ester content after 12 h. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

5.4 การแบ่งเติมเอทานอล

จากข้อจำกัดในเรื่องของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลที่สูง การทดลองนี้จึงเป็นการหาเวลาที่เหมาะสมในการเติมเอทานอลในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว โดยเติมเอนไซม์ตรึงรูปผสมของ Lipase AK และ Lipase AY ในสัดส่วน 50:50 ปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทน้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัมกับเอทานอลมีน้ำรวมในปฏิกิริยาร้อยละ 2 แบ่งการเติมเอทานอลออกเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ 1 (การเติมแบบ 3 ขั้นตอน) เป็นการแบ่งเติมเอทานอลโดยใช้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 1 ต่อ 1 ที่เวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ส่วนชุดการทดลองที่ 2 เติมเอทานอลที่สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 2 ต่อ 1 ที่ 0 ชั่วโมงและเติมเพิ่มอีกครั้งหลังการทำปฏิกิริยาไป 2 ชั่วโมง โดยเติมที่สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 1 ต่อ 1 (การเติมแบบ 2 ขั้นตอน) ผลการทดลองพบว่าการแบ่งเติมเอทานอลจะช่วยลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้บางส่วน เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เติมเอทานอลทั้งหมดในขั้นตอนเดียวในการทดลองก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 38C) จะเห็นว่าแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเอทิลเอสเทอร์ในชุดการทดลองที่เติมเอทานอล 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 40A) และชุดการทดลองที่เติมเอทานอล 2 ขั้นตอน (ภาพที่ 40B) จะเกิดขึ้นเร็วกว่า โดยพบว่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของชุดการทดลองที่เติมเอทานอล 3 ขั้นตอนและ 2 ขั้นตอนมีค่าเท่ากับ 1.03 และ 1.02 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 40B) ซึ่งสูงกว่าการเติมเอทานอลในขั้นตอนเดียว ซึ่งมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นเท่ากับ 0.87 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง (ภาพที่ 41B) และเมื่อพิจารณาร้อยละของ เอทิลเอสเทอร์หลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง พบว่าการแบ่งเติมเอทานอล 3 ขั้นตอนและ 2 ขั้นตอนให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกันโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 91 และ 88 ตามลำดับ (ภาพที่ 41A) จากการศึกษาของ Shimada และคณะ (2002) ที่ศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันพืชและเมทานอลโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปจาก *Candida antarctica* พบว่าการแบ่งเติมเมทานอลเป็น 2 ขั้นตอน คือ เติมเมทานอล 1/3 เท่าของโมลน้ำมันที่ 0 ชั่วโมงและ 2/3 เท่าของโมลน้ำมันที่ 10 ชั่วโมง จะให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการเติม 3 ขั้นตอน คือเติมเมทานอล 1/3 เท่าของโมลน้ำมันที่ 0, 10 และ 24 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 97.3 และ 96.8 ตามลำดับ แต่การเติมเอทานอลแบบ 2 ขั้นตอนใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาทั้งหมดน้อยกว่าคือ 34 ชั่วโมง ในขณะที่การเติมเมทานอล 3 ขั้นตอนต้องใช้เวลาถึง 48 ชั่วโมง

ดังนั้นเพื่อให้เกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์ในระยะเวลาอันสั้นและเพื่อลดขั้นตอนของการผลิต จึงควรเลือกชุดการทดลองที่มีการเติมเอทานอล 2 ขั้นตอนคือ เติมเอทานอลในความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของโมลน้ำมันในตอนเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และ ความเข้มข้นเป็น 1 เท่าของโมลน้ำมันในชั่วโมงที่ 2 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

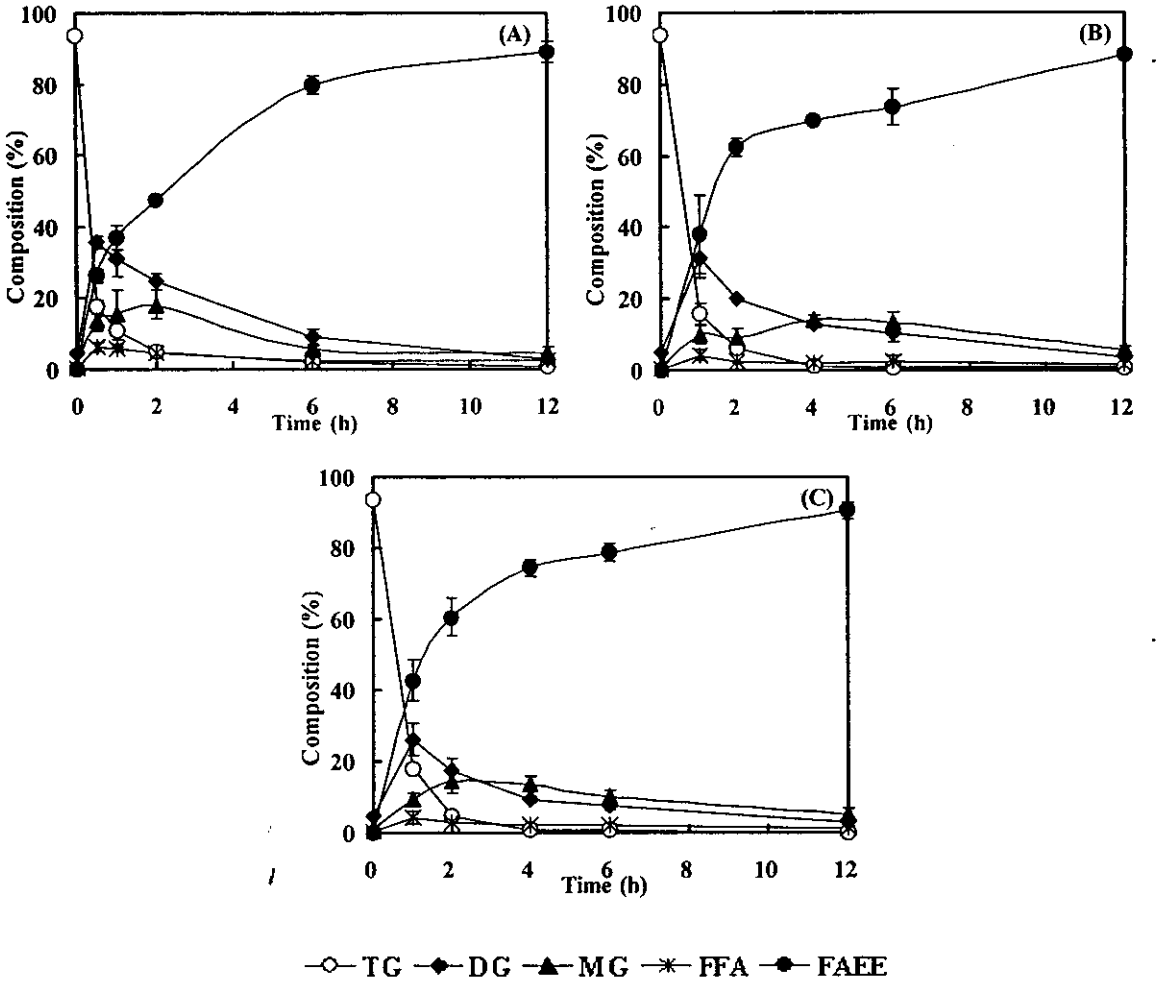


Figure 40. Effect of stepwise ethanol addition on fatty acid ethyl ester production by tranesterification of used palm oil. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 10% of mixed immobilized lipase AK and AY (50:50), and 2% of water based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A): 1 molar ratio of ethanol was add at 0, 1, and 2 h, (3 step) (B): 2 and 1 molar ratio of ethanol was add at 0 h and 2 h, (2 step) (C): 3 molar ratio of ethanol was add at 0 h, (1 step). TG: Triglyceride; DG: Diglyceride; MG: Monoglyceride; FFA: Free fatty acid; FAEE: Fatty acid ethyl ester.

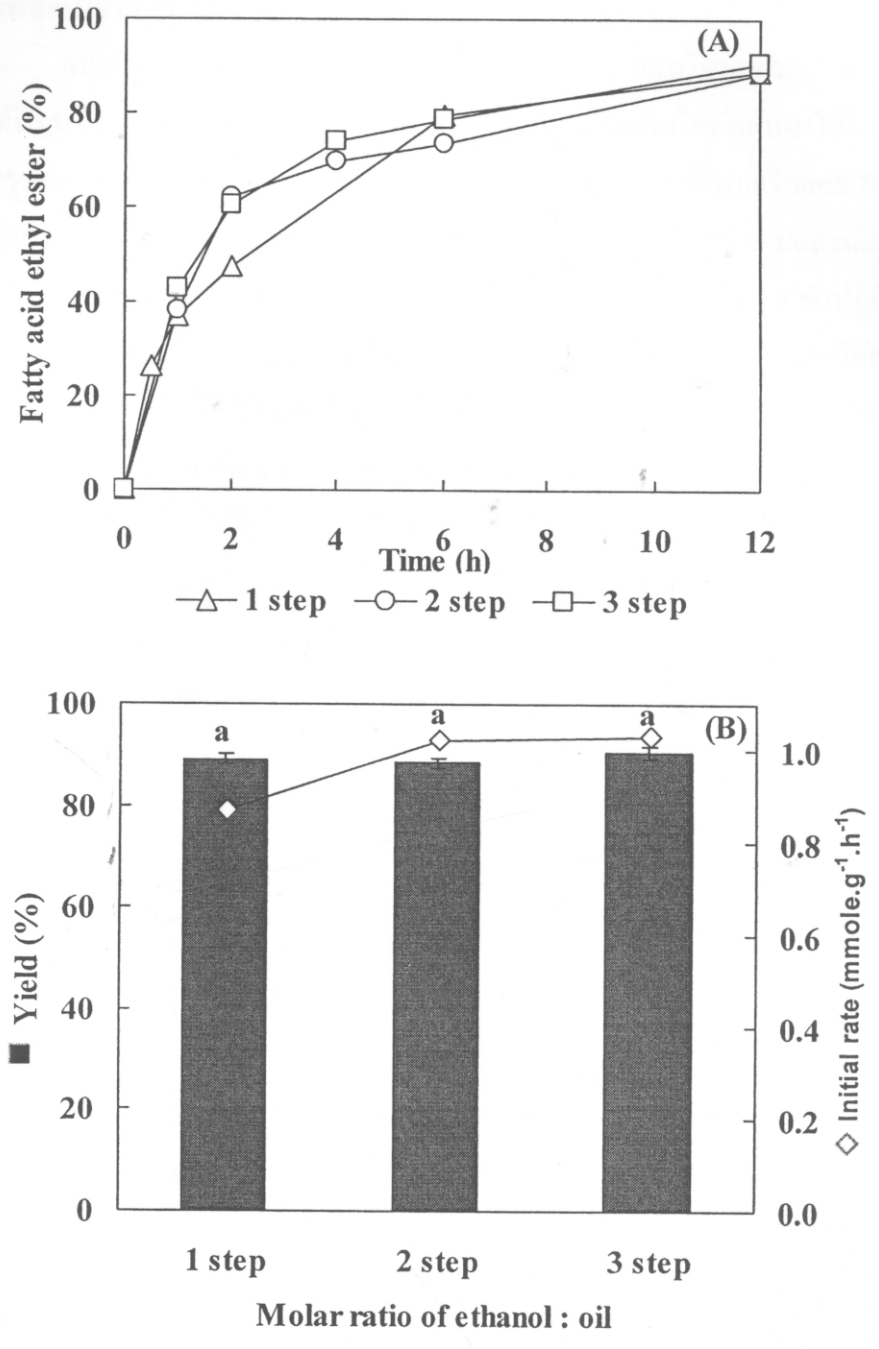


Figure 41. Comparison of stepwise ethanol addition on tranesterification reaction. A reaction mixture consisted of 0.168 g of used palm oil, 10% of mixed immobilized lipase AK and AY (50:50), and 2% of water based on oil weight, was incubated at 45 °C at 500 rpm. (A) Time course of fatty acid ethyl ester formulation by transesterification reaction; (B) Initial rate and relative yield of fatty acid ethyl ester content after 12 h. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < .05$).

5.6 การนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่

การตรึงเอนไซม์มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง ทั้งนี้เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ในการทดลองครั้งนี้จึงได้ศึกษาการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่โดยการเติมเอนไซม์ตรึงรูปผสมของ Lipase AK และ Lipase AY ในสัดส่วน 50:50 ปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำมันใช้แล้ว 0.168 กรัมและเติมเอทานอลในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 โดยมีน้ำรวมในปฏิกิริยาร้อยละ 2 ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และแยกผลิตภัณฑ์ออก จากนั้นจึงเติมสับสเตรทใหม่ลงไป พบว่าสามารถใช้เอนไซม์ซ้ำได้ 12 ครั้งโดยเอนไซม์ยังคงเร่งปฏิกิริยาและให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทิลเอสเทอร์ที่ร้อยละ 52 แต่หากใช้มากกว่านี้ผลิตภัณฑ์จะลดลงจนต่ำกว่าร้อยละ 50 ดังแสดงในภาพที่ 42 ทั้งนี้แนวโน้มในการเร่งปฏิกิริยาจะค่อยๆ ลดลงตามจำนวนครั้งที่ใช้ซ้ำ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีกลีเซอรอลที่เหลือจากการใช้ครั้งก่อนที่ยังค้างอยู่บนตัวพยุงและส่งผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ รวมทั้งปริมาณน้ำที่สะสมอยู่ในเอนไซม์ในแต่ละครั้งของการทำปฏิกิริยาที่เกิดจากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นรวมทั้งน้ำที่ผสมอยู่ในเอทานอลร้อยละ 5 ที่ใช้เป็นสับสเตรท อาจส่งผลให้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไป

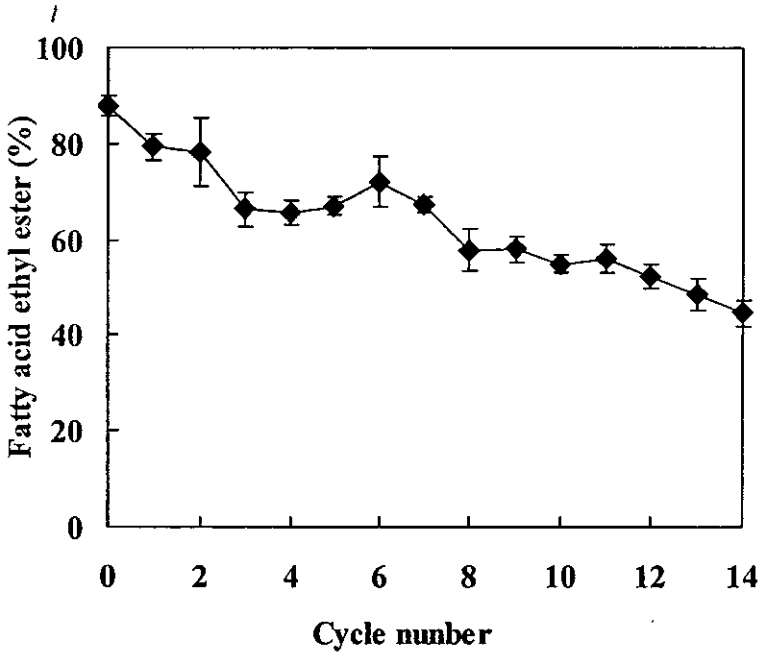


Figure 42. Effect of repeated used of immobilized lipases on FAEE yield. A reaction mixture consisted of used palm oil 0.168 g, 3:1 molar ratio of ethanol : oil, 10% immobilized lipases AK and AY (50:50) and 2% of water by oil weight.

Noureddini และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองโดยการเร่งปฏิกิริยาของ Lipase PS ที่ตรึงรูปบน hydrophobic sol–gel พบว่าสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 11 ครั้งโดยเอนไซม์ยังคงเร่งปฏิกิริยาและให้ผลผลิตมากกว่าร้อยละ 50 ทั้งในระบบที่มีสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 7.6, 9.5, 11.4 และ 13.3 โดยระบบที่มีสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 9.5 จะเกิดการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุดเนื่องจากมีเอทานอลในปริมาณที่สมดุลพอที่จะใช้ในการทำปฏิกิริยาและไม่มากเกินไปจนเกิดการยับยั้งเอนไซม์ Chen และ Wu (2003) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองโดยนำเอนไซม์ *Candida antarctica* ที่สูญเสียกิจกรรมเนื่องจากการถูกยับยั้งจากแอลกอฮอล์สายสั้นคือเมทานอลและเอทานอลนำกลับมาใช้ใหม่ โดยศึกษาการแช่เอนไซม์ในสารต่างๆ ก่อนนำมาใช้ใหม่ พบว่าการใช้แอลกอฮอล์สายยาวคือ 2-butanol และ *tert*-butanol มาล้างเอนไซม์สามารถทำให้เอนไซม์กลับมามีกิจกรรมได้เพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 56 และ 75 ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น ตามลำดับ นอกจากนี้ Xu และคณะ (2004) ได้ศึกษาการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลในระบบที่ไม่ใช้ตัวทำละลาย พบว่ากลีเซอรอลที่เกิดขึ้นหลังการทำปฏิกิริยาจะส่งผลเสียต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการใช้ iso- propanal ในการล้างเอนไซม์ซึ่งทำให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 15 ครั้ง

จากการศึกษาการผลิตในระบบกะพบว่าน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการทำปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปผสมระหว่าง Lipase AK และ AY ในสัดส่วน 50:50 และการเติมน้ำในปฏิกิริยาจะมีผลทำให้ร้อยละของผลผลิตลดลง จึงใช้ปริมาณน้ำที่มีอยู่แล้วในระบบคือร้อยละ 2 ของน้ำหนักน้ำมัน ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือร้อยละ 10 และสัดส่วนโมลของเอทานอลและน้ำมันที่ 2:1 ให้อัตราการผลิตเริ่มต้นสูงสุดที่ 1.00 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง และสัดส่วนโมลที่ 3:1 จะให้ร้อยละของผลผลิตสูงสุดที่ร้อยละ 91 หลังการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง โดยการทดลองในระบบกะโดยการแยกผลิตภัณฑ์และการเติมสับสเตรทใหม่ทำให้สามารถนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำได้ 12 ครั้งโดยยังคงมีกิจกรรมเหลือให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 50 ขององค์ประกอบหลังการทำปฏิกิริยา ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำไปใช้ในการออกแบบการทดลองการผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องต่อไป

6. การศึกษาการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันใช้แล้วโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (Packed-bed reactor) ในระบบต่อเนื่อง

6.1 การเปรียบเทียบวิธีการบรรจุเอนไซม์ผสม

จากการทดลองผลิตไบโอดีเซลแบบกะพบว่าการใช้เอนไซม์ผสมมีความเหมาะสมต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์ เนื่องจากเอนไซม์สามารถทำงานร่วมกันและทำให้ได้ผลผลิตสูง ในการผลิตแบบต่อเนื่องจึงได้เปรียบเทียบการบรรจุเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipase AK และ Lipase AY ในสัดส่วนร้อยละ 50:50 ในคอลัมน์แบบแพคเบด โดยบรรจุใน 2 ลักษณะ คือการผสมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวก่อนจะบรรจุลงในคอลัมน์ และการบรรจุแบบแยกคือบรรจุ Lipase AY ก่อนในส่วนด้านล่างของคอลัมน์แล้วจึงบรรจุ Lipase AK ในส่วนบนของคอลัมน์ สภาวะที่ใช้ในการผลิตคือใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3: 1 ทำปฏิกิริยาที่ 45 องศาเซลเซียส เดินระบบด้วยการให้สับสเตรทไหลผ่านคอลัมน์จากข้างล่างขึ้นข้างบน โดยควบคุมอัตราการไหลที่ทำให้มีเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นาน 30 นาที พบว่าการบรรจุแบบผสมเอนไซม์เป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 43A) จะทำให้ได้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์เฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 20 ซึ่งสูงกว่าและมีความสม่ำเสมอมากกว่าการแยกบรรจุ (ภาพที่ 43B) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการกระจายตัวของ Lipase AK และ Lipase AY โดยการผสมเอนไซม์ก่อนบรรจุจะทำให้ Lipase AK ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นกระจายตัวได้ทั่วคอลัมน์และทำงานร่วมกับ Lipase AY ได้ดีกว่าการบรรจุแบบแยก ทำให้สับสเตรทที่ถูกย่อยแล้วโดย Lipase AY มีโอกาสที่จะเจอกับ Lipase AK ได้เร็วขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้มากกว่าการบรรจุแบบแยก นอกจากนี้การบรรจุแบบแยกที่บรรจุเอนไซม์ Lipase AY ก่อนเมื่อผ่านสับสเตรทที่มีน้ำมันผสมกับเอทานอลทำให้ Lipase AY ต้องเจอกับเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงทำให้สูญเสียกิจกรรมไปก่อนที่จะย่อยน้ำมันให้เป็นกรดไขมันอิสระได้ ในขณะที่การบรรจุแบบผสม Lipase AK จะเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นเอทิลเอสเทอร์ ทำให้ลดการยับยั้งโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นสูงได้ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบอื่นๆ ที่เกิดขึ้น พบว่าไตรกลีเซอไรด์ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ ส่วนกรดไขมันอิสระจะพบในปริมาณน้อยในคอลัมน์ที่บรรจุแบบผสม ซึ่งอาจเนื่องมาจากกรดไขมันอิสระได้ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทิลเอสเทอร์ แต่ในการบรรจุแบบแยกจะเกิดการแข็งตัวของกรดไขมันอิสระบริเวณส่วนล่างของคอลัมน์จนเป็นสาเหตุให้คอลัมน์เกิดการอุดตันในที่สุด ซึ่งกรดไขมันอิสระที่เป็นสาเหตุดังกล่าวน่าจะเป็นกรดปาล์มิติกซึ่งมีอยู่ร้อยละ 38 ในองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มใช้แล้ว (ตารางที่ 18) เนื่องจากจุดหลอมเหลวของกรดปาล์มิติกมีค่าเท่ากับ 62.9 องศาเซลเซียส อีกทั้งการที่น้ำมันที่เหลืออยู่ในระบบส่วนใหญ่อยู่ในรูปไดกลีเซอไรด์ก็อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุทำให้ความหนืดของระบบสูงขึ้น เนื่องจากจุดหลอมเหลวของไดกลีเซอไรด์ที่มีกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในน้ำมันปาล์มจะมีค่าสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 14) การทดลองในสภาวะอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ร่วมกับการผสมกับเอทานอลซึ่งใช้เป็นสับสเตรทก็อาจไม่เพียงพอที่จะทำให้สับสเตรทอยู่ใน

รูปของสารละลายได้ หลังจากเดินระบบเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ในคอลัมน์ที่บรรจุเอนไซม์แบบผสมเป็นเนื้อเดียวกันและการบรรจุแบบแยกได้ร้อยละ 21 และ 12 ตามลำดับ ดังนั้น เมื่อพิจารณาผลผลิตที่ได้และความสม่ำเสมอของการผลิต จึงเลือกการบรรจุเอนไซม์แบบผสมเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

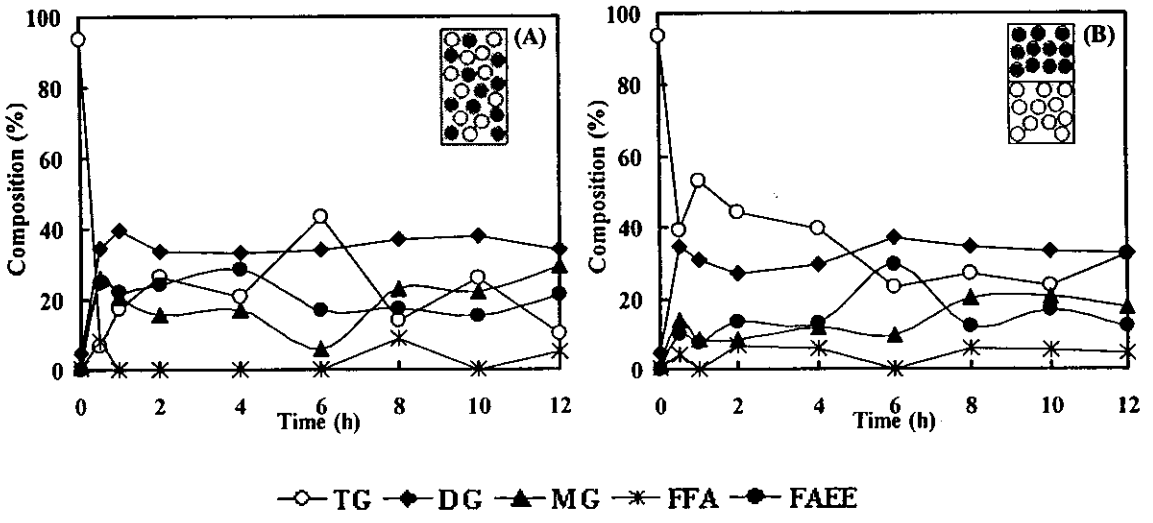


Figure 43. Effect of immobilized enzymes distribution on continuous biodiesel production in packed-bed column. A reaction mixture consisted of ethanol and used palm oil at molar ratio of 3:1, immobilized lipases AK and AY (50:50) 1 g. (A): Column 1 using mixed enzymes, (B):Column 2 using separately enzymes (packed Lipase AY on the bottom and Lipase AK on the top). Close circle and open circle in packed column represent Lipase AK and Lipase AY, respectively.

6.2 ผลของการเพิ่มเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์ต่อการผลิตไบโอดีเซล

การควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องต้องพิจารณาในหลายปัจจัยและปัจจัยหนึ่งที่สำคัญโดยเฉพาะการผลิตในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบดคือการควบคุมอัตราการไหลของสับสเตรท เนื่องจากจะเป็นตัวกำหนดระยะเวลาที่เอนไซม์สามารถเจอกับสับสเตรทและเร่งปฏิกิริยาการผลิต จากผลการทดลองในข้อ 6.1 พบว่าปริมาณเอทิลเอสเทอร์ที่ได้มีปริมาณต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเวลาในการทำปฏิกิริยาที่สั้น การทดลองนี้จึงเป็นการทดสอบผลของการเพิ่มเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์โดยการลดอัตราการไหลของสับสเตรทต่อการผลิตเอทิลเอสเทอร์ โดยผสมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipase AK และ Lipase AY อย่างละ 0.5 กรัม ผ่านสับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 โดยให้สับสเตรทไหลผ่านคอลัมน์จากข้างล่างขึ้นข้างบนด้วยปั๊มลูกกลิ้งเพื่อควบคุมอัตราการ

ไหลเฉลี่ยให้อยู่ที่ 0.05 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งทำให้สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นาน 120 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิของระบบที่ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 44 พบว่าการผลิตเอทิลเอสเทอร์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและเกิดขึ้นสูงสุดที่ร้อยละ 53 ในชั่วโมงที่ 4 ซึ่งสูงกว่าการทดลองที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นาน 30 นาที (ภาพที่ 43A) จากนั้นเอทิลเอสเทอร์จะลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าเท่ากับร้อยละ 18 ในชั่วโมงที่ 12 และไม่แตกต่างกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ ทั้งนี้เนื่องจากการที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นานขึ้นเป็นการเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยา ทำให้เกิดผลผลิตมากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นการทำให้เอนไซม์สัมผัสกับเอทานอลนานขึ้น จึงทำให้เอนไซม์มีโอกาสสูญเสียกิจกรรมมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อสับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นานขึ้นทำให้การย่อยสลายน้ำมันเกิดเป็นกรดไขมันอิสระมีมากขึ้น ซึ่งกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นมีโอกาสจะไปจับกับตัวพยุงทำให้รูพรุนของตัวพยุงอุดตันส่งผลให้สับสเตรทใหม่ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ ทั้งยังทำให้เกิดความดันขึ้นในคอลัมน์และส่งผลให้คอลัมน์เกิดการอุดตันในที่สุด โดยการสะสมของกรดไขมันอิสระมีโอกาสเกิดขึ้นได้เนื่องจากในเอทานอลมีน้ำอยู่ร้อยละ 5 ซึ่งเพียงพอต่อการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปส โดยในช่วงชั่วโมงแรกจนถึงชั่วโมงที่ 4 เป็นช่วงที่เอนไซม์ยังมีกิจกรรมสูงและเกิดกรดไขมันอิสระในปริมาณที่น้อยจึงทำให้เกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์สูง แต่หลังจากนั้นสมดุลของการทำปฏิกิริยาจะเปลี่ยนไปเนื่องจากผลพลอยได้ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือกลีเซอรอลมีความมีขั้วสูงจึงส่งผลให้ระบบมีความมีขั้วเพิ่มขึ้นซึ่งไม่เหมาะต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ไลเปส

จากงานวิจัยของ Marty และคณะ (1997) ที่ได้ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส Lipozyme™ จากเชื้อ *Mucor miehei* ในระบบที่ใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วด้วยระบบต่อเนื่องแบบแพคเบด พบว่าการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์จะก่อให้เกิดน้ำซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาแบบไม่ย้อนกลับ (nonreversible deactivation) และจากการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างน้ำมันกับแอลกอฮอล์ของเอนไซม์ไลเปสจะทำให้เกิดกลีเซอรอลซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาแบบย้อนกลับได้ (reversible deactivation) กล่าวคือหากสามารถกำจัดกลีเซอรอลออกจากระบบได้เอนไซม์ก็สามารถกลับมาเร่งปฏิกิริยาได้อีกครั้งหนึ่ง นอกจากนี้จากการศึกษาของ Shaw และคณะ (2008) ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง *n*-hexane และ *tert*-butanol ในสัดส่วน 9:1 (v/v) ในระบบต่อเนื่องโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส Novozyme 435 ในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด และหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโดยอาศัยวิธี response surface methodology (RSM) พบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตได้แก่ อุณหภูมิและอัตราการไหลของสารในระบบ โดยที่สัดส่วนโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4.3:1 จะให้ร้อยละของผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 75.2 ที่อุณหภูมิและอัตราการไหลเท่ากับ 52 องศาเซลเซียส และ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลจะทำให้ผลผลิตลดลงเนื่องจากเวลาที่เอนไซม์สัมผัสกับสับสเตรทมีน้อยลง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Halim และคณะ (2008) ที่ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วกับเมทานอลในตัวทำละลาย *tert*-butanol โดยการเร่งปฏิกิริยาของ

เอนไซม์ไลเปส Novozyme 435 ในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด โดยศึกษาถึงผลของความสูงของเบด (packed-bed hight) และอัตราการไหลของสับสเตรทต่อการทำปฏิกิริยา พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของสับสเตรทจะทำให้ร้อยละของผลผลิตเพิ่มขึ้นเนื่องจากสามารถลดแรงต้านการถ่ายโอนมวล (mass transfer limitation) ในคอลัมน์ได้ แต่การเพิ่มอัตราการไหลที่มากเกินไปจะทำให้ร้อยละของผลผลิตลดลงเนื่องจากสับสเตรทไม่มีโอกาสสัมผัสกับเอนไซม์ได้นานเท่าที่ควรโดยสับสเตรทเพียงเคลื่อนที่ผ่านเอนไซม์จึงไม่เกิดการทำปฏิกิริยา โดยความสูงและอัตราการไหลของสับสเตรทที่เหมาะสมคือ 10.53 เซนติเมตรและ 0.57 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตในระบบที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นาน 120 นาที กับระบบการบรรจุเอนไซม์ผสมในการทดลองก่อนหน้านี้ซึ่งเป็นระบบที่มีการควบคุมอัตราการไหลให้สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นาน 30 นาที พบว่าไม่แตกต่างกันโดยให้ร้อยละของผลผลิตเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเพิ่มเวลาให้สับสเตรททำปฏิกิริยากับเอนไซม์โดยการลดอัตราการไหลไม่เหมาะสมกับการผลิตเอทิลเอสเทอร์ในระบบที่มีการใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง Lipase AY และ Lipase AK เพราะนอกจากเอทานอลในสับสเตรทจะทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมแล้ว การใช้อัตราการไหลที่ช้าเกินไปยังทำให้เกิดการแยกชั้นของเอทานอลและส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการลดเวลาที่ใช้ในการผลิตจึงเลือกปรับอัตราการไหลของสับสเตรทที่ 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งทำให้มีเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์นาน 30 นาที และศึกษาการเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาโดยการเพิ่มจำนวนคอลัมน์เอนไซม์ในการทดลองขั้นต่อไป

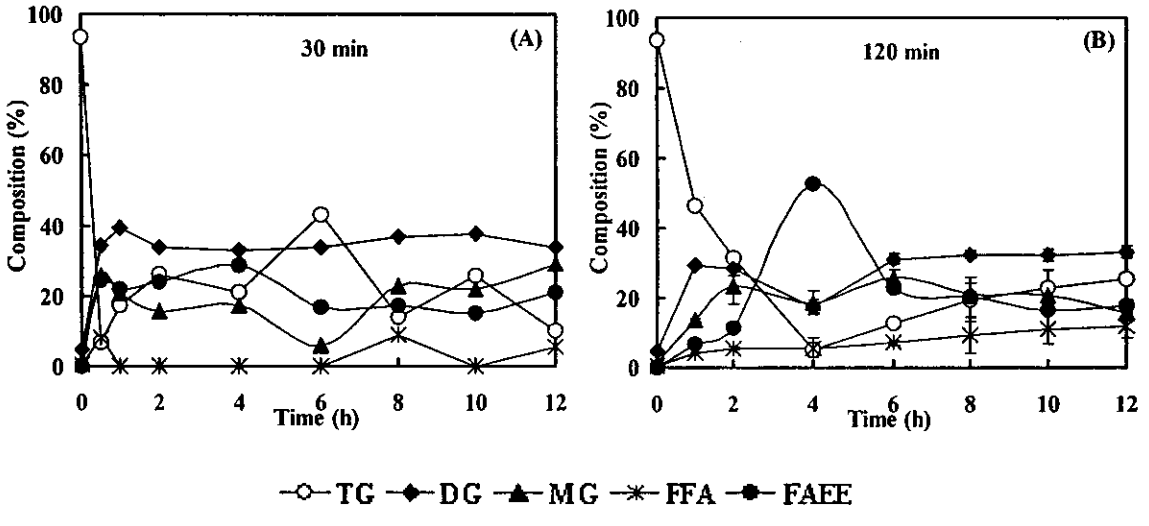


Figure 44. Effect of extended retention time on continuous biodiesel production in packed-bed column. A reaction mixture consisted of ethanol and used palm at molar ratio of 3:1, mixed immobilized lipases AK and AY (50:50) 1 g, substrate flow rate was 0.05 ml/min at 45 ^{o}C. Retention time of the subtrates in column were 30 and 120 min, in Figure A and B respectively.

6.3 ผลของการเพิ่มจำนวนคอลัมน์ต่อการผลิตไบโอดีเซล

จากข้อจำกัดของความเข้มข้นของเอทานอลรวมทั้งการเกิดกรดไขมันอิสระซึ่งจะส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จึงทดลองเดินระบบผ่านเอนไซม์ 2 คอลัมน์เพื่อเพิ่มความยาวของคอลัมน์และยืดระยะเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์ โดยผสมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipase AK และ Lipase AY ในสัดส่วนร้อยละ 50:50 ปริมาณ 1 กรัม จำนวน 2 คอลัมน์ ผ่านสับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับเอทานอลในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3: 1 จากคอลัมน์ 1 ไปยังคอลัมน์ 2 โดยให้สับสเตรทไหลผ่านคอลัมน์จากข้างล่างขึ้นข้างบนและควบคุมอัตราการไหลของสับสเตรตในคอลัมน์เป็น 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 45 พบว่าการเดินระบบผ่านเอนไซม์ 2 คอลัมน์จะช่วยให้ร้อยละของผลผลิตเพิ่มขึ้น โดยในคอลัมน์ที่ 1 (ภาพที่ 45A) เอนไซม์จะมีแนวโน้มของการผลิตเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา กล่าวคือเกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุดในช่วงหนึ่งคือชั่วโมงที่ 6 จากนั้นจะลดลงและคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 22 ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเกิดกรดไขมันอิสระและการเกิดกลีเซอรอลที่ไปยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ แต่เมื่อผ่านผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปสู่คอลัมน์ที่ 2 โดยก่อนหน้าที่จะดูดซับสเตรทไปยังคอลัมน์ที่ 2 จะมีการกวนผสมให้สารที่ออกมาจากคอลัมน์ 1 ผสมเป็นเนื้อเดียวกันก่อนเพื่อให้มีความสม่ำเสมอของสับสเตรทก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งพบว่าการผลิตเอทิลเอสเทอร์มีการเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากผลิตภัณฑ์ส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ 1 มีกรดไขมันอิสระอยู่น้อยและไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันก็ถูกเปลี่ยนไปเป็นไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ อีกทั้งเอทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ก็มีส่วนช่วยทำละลายสารในระบบ ทำให้การอุดตันของตัวพยุงเนื่องจากการสะสมของกรดไขมันอิสระน้อยลงตามไปด้วย อีกทั้งกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นก็อาจยังจับอยู่กับตัวพยุงเอนไซม์ในคอลัมน์ที่ 1 และการเดินระบบผ่าน 2 คอลัมน์ก็เป็นการเพิ่มเวลาที่เอนไซม์จะสัมผัสกับสับสเตรทจึงทำให้การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นมีโอกาสเกิดขึ้นได้สูง

การเพิ่มคอลัมน์ของเอนไซม์นอกจากจะทำให้การผลิตเอทิลเอสเทอร์เกิดมากขึ้นแล้วยังช่วยให้การควบคุมระบบสามารถทำได้ง่ายขึ้น เนื่องจากหากเกิดปัญหาขึ้นกับเอนไซม์ในคอลัมน์ใดก็สามารถเปลี่ยนคอลัมน์นั้นได้อย่างสะดวก โดยคอลัมน์แรกจะสูญเสียกิจกรรมเร็วกว่าเนื่องจากต้องสัมผัสกับเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า นอกจากนี้หากต้องการจะแยกกลีเซอรอลออกจากระบบก็สามารถทำได้ง่าย โดยการแยกออกในระหว่างคอลัมน์เพื่อลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในคอลัมน์ถัดไป

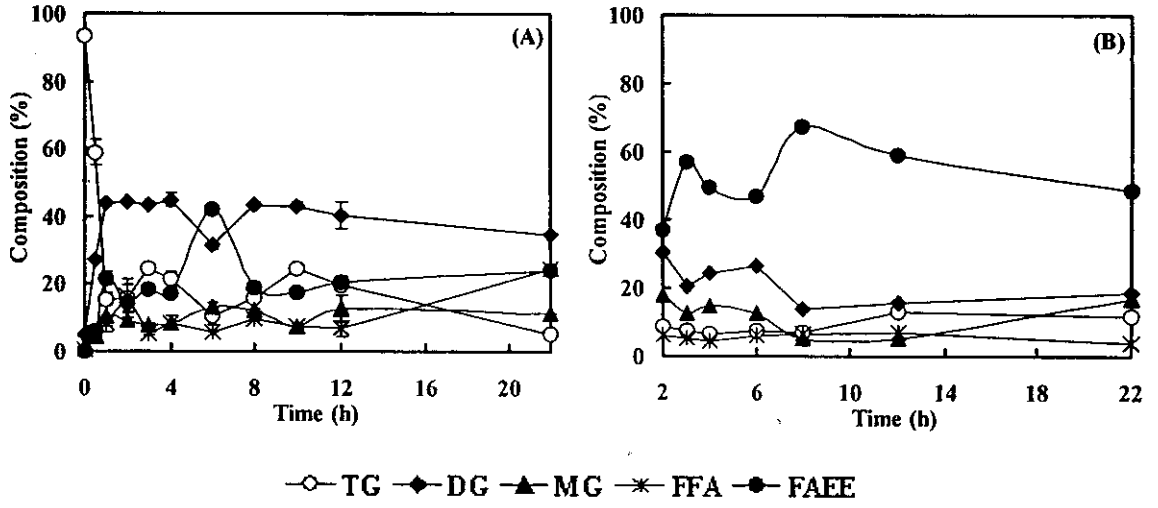


Figure 45. Continuous biodiesel production with dual packed-bed column. A reaction mixture consisted of ethanol and used palm oil at molar ratio of 3:1, mixed immobilized lipases AK and AY (50:50) 1 g, substrate flow rate was 0.25 ml/min at 45 ^{o}C. (A): column 1, (B): column 2.

6.4 ผลของการแบ่งเติมเอทานอลต่อการผลิตไบโอดีเซล

นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipase AK และ Lipase AY อย่างละ 0.5 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ ผ่านสับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วกับเอทานอลในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 2:1 และเติมเอทานอลเพิ่มในขวดรองรับผลิตภัณฑ์ที่ออกมาจากคอลัมน์ 1 ในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 1:1 เนื่องจากขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีขนาดเล็กทำให้ต้องใช้อัตราการไหลที่ช้ามาก เพื่อให้สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์ได้นานขึ้นคือที่ 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที ดังนั้นการเติมเอทานอลให้ได้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 1 ต่อ 1 จึงต้องเติมด้วยอัตราการไหลที่ช้ายิ่งกว่าคือที่อัตราการไหล 0.01 มิลลิลิตรต่อนาที โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 46 พบว่าในคอลัมน์ที่ 1 จะเกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์น้อยมากแม้จะมีการผลิตที่สูงในช่วงแรกแต่ก็กลับลดลงอย่างรวดเร็ว โดยน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ยังคงอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ (ภาพที่ 46A) ทั้งนี้เนื่องจากการที่ระบบมีเอทานอลน้อยเกินไป ส่วนในคอลัมน์ที่ 2 การผลิตเอทิลเอสเทอร์มีการเพิ่มขึ้นแต่ยังอยู่ในระดับที่ต่ำโดยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณร้อยละ 20 ตลอดการเดินระบบ (ภาพที่ 46B) เพราะแม้จะมีการเติมเอทานอลเพิ่มในคอลัมน์ที่ 2 แต่ก็เติมในปริมาณน้อย อีกทั้งผลิตภัณฑ์ที่ออกมาจากคอลัมน์ที่ 1 ก็ยังคงอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่ จึงเป็นการยากที่เอนไซม์จะสามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ในระบบที่มีสัดส่วนของน้ำมันต่อเอทานอลที่สูง

จากงานวิจัยของ Watanabe และคณะ (2000) ได้ศึกษาการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

ระหว่างน้ำมันพืชกับเมทานอลในระบบคอลัมน์แบบแพคเบด โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่บรรจุใน 3 คอลัมน์ ซึ่งออกแบบให้มีการแบ่งเติมเมทานอลครั้งละ 1/3 เท่าของโมลน้ำมันออกเป็น 3 ขั้นตอน ร่วมกับการแยกกลีเซอรอลออกในระหว่างแต่ละขั้นตอนโดยการตั้งทิ้งไว้ค้างคืนก่อนเพื่อแยกกลีเซอรอลออกและจึงเติมเมทานอลเพิ่ม ทั้งนี้เพื่อลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเมทานอลและกลีเซอรอล ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เฉลี่ยภายหลังการเติมเมทานอลในขั้นตอนที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับร้อยละ 32, 64 และ 93 ตามลำดับ แต่การผลิตเมทิลเอสเทอร์ในระบบแพคเบดแบบ 2 ขั้นตอน คือการเติมเมทานอลในสัดส่วน 1/3 เท่าของโมลน้ำมันก่อน แล้วจึงเติมอีก 2/3 เท่าของโมลน้ำมันในช่วงหลัง กลับพบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากการเกิดกลีเซอรอล เนื่องจากการที่ระบบมีกลีเซอรอลมากขึ้นจะทำให้การแพร่ของสับสเตรทคือน้ำมันสู่เอนไซม์เกิดได้ยากขึ้นทำให้ประสิทธิภาพของการทำปฏิกิริยามีน้อยลง และในขณะเดียวกันกลีเซอรอลก็เป็นตัวเข้าไปจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากกลีเซอรอลมีความมีขั้วสูงเช่นเดียวกันกับเมทานอล

เมื่อเปรียบเทียบเอทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากการศึกษาผลการแบ่งเติมเอทานอลในการทดลองครั้งนี้ (ภาพที่ 46) กับการผลิตในระบบที่ใช้สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1 จากการศึกษาผลของการเพิ่มจำนวนคอลัมน์ (ภาพที่ 45) พบว่าการใช้สัดส่วนของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1 ตั้งแต่เริ่มต้นจะให้ผลผลิตเอทิลเอทิลเอสเทอร์สูงกว่า ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ระบบที่มีการเติมเอทานอลในสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1 และจากคุณสมบัติเด่นในการย่อยสลายน้ำมันของ Lipase AY (ภาพที่ 24) และข้อจำกัดของการถูกยับยั้งการทำงานเนื่องจากเอทานอล การทดลองขั้นต่อไปจึงได้ศึกษาการแยกคอลัมน์ของเอนไซม์ตรึงรูป Lipase AY ออกจากคอลัมน์ Lipase AK และใช้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์เพื่อให้เอนไซม์แต่ละชนิดได้ทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ พร้อมทั้งศึกษาความเชื่อมโยงในการทำงานของเอนไซม์ต่อการผลิตไบโอดีเซล

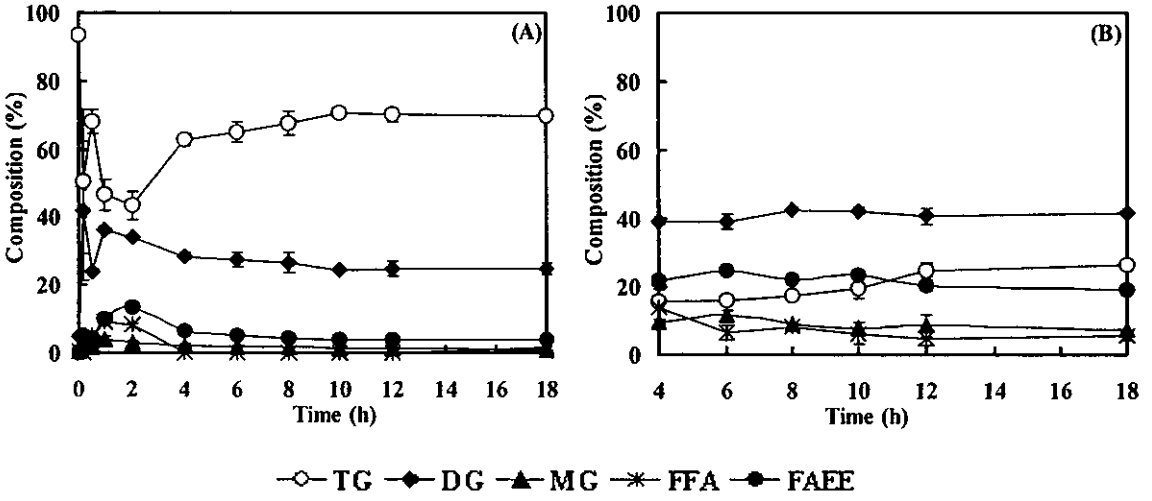


Figure 46. Continuous biodiesel production in packed-bed column with stepwise ethanol addition. A reaction mixture consisted of used palm oil and ethanol at 1:2 molar ratio in column 1 and 1:1 molar ratio in column 2, mixed immobilized lipases AK and AY (50:50) 1 g, substrate flow rate was 0.25 ml/min at 45 ^{o}C. (A): column 1, (B): column 2, ethanol was added before flow in column 2 by peristaltic pump.

6.5 การศึกษาผลของการแยกคอลัมน์เอนไซม์ต่อการผลิตไบโอดีเซล

จากข้อจำกัดในเรื่องของการยับยั้งการทำงานของ Lipase AY เนื่องจากเอทานอลจึงเป็นที่มาของการศึกษาการแยกเอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซล โดยศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipase AY ก่อนหลังจากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปผลิตเอทิลเอสเทอร์ด้วย Lipase AK เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยการย่อยสลายน้ำมันจะใช้สับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับน้ำในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ส่วนการผลิตเอทิลเอสเทอร์จะนำผลผลิตที่ได้จากการย่อยน้ำมันมาเติมเอทานอลในสัดส่วนโมลของเอทานอลและน้ำมันเป็น 3:1 ร่วมกับการศึกษาการใช้สับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่ยังไม่ผ่านการย่อยกับเอทานอลในสัดส่วน 3:1 ซึ่งการบรรจุเอนไซม์ลงในคอลัมน์จะมีการบรรจุตัวพยุงเอนไซม์ขนาดใหญ่ (accurel MP1003) ในส่วนบนและส่วนล่างของคอลัมน์แทนการใช้สำลีเพื่อเพิ่มช่องว่างในคอลัมน์ โดยควบคุมอัตราการไหลของสับสเตรทในคอลัมน์ที่ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อเพิ่มเวลาที่สับสเตรทอยู่ในคอลัมน์ให้นานขึ้นเป็น 60 นาที ทั้งนี้เพื่อให้เอนไซม์สามารถสัมผัสกับสับสเตรทได้มากขึ้น ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 47 พบว่าเอนไซม์ Lipase AY สามารถย่อยสลายน้ำมันได้เป็นอย่างดีส่งผลให้เกิดการผลิตกรดไขมันอิสระได้กว่าร้อยละ 60 ตลอดการทำปฏิกิริยา 8 ชั่วโมง (ภาพที่ 47A) โดยสามารถผลิตกรดไขมันอิสระได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ที่ร้อยละ 83 แต่ในระหว่างการทดลองกลับพบปัญหาของการอุดตันของคอลัมน์ ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากเกิดการดูดซับของกรดไขมันอิสระ

บนตัวพยุงเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถเดินระบบได้ต่อไป และจากการเก็บตัวอย่างน้ำมันที่ผ่านการย่อยจากคอลัมน์ของเอนไซม์ Lipase AY พบว่าจะมีน้ำปนออกมาด้วยเสมอและเมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกชั้นกับน้ำมันอย่างชัดเจน เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยที่ผ่านการแยกน้ำโดยการดูดน้ำออกด้วยปิเปต ไปผลิตเอทิลเอสเทอร์ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Lipase AK พบว่าจะเกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 70 เนื่องจากเป็นการใช้สับสเตรทที่เกิดจากการย่อยสลายในคอลัมน์ที่ 1 มาแล้ว

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ความสามารถในการทำงานที่ต่างกันของเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลแล้วดังเช่นงานวิจัยของ Watanabe และคณะ (2007b) ที่ศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันกรด (acid oil) ซึ่งเป็นน้ำมันที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากการกลั่นน้ำมันบริสุทธ์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ในการย่อยน้ำมันให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระทั้งหมดก่อน แล้วจึงใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* ในการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ โดยศึกษาการแบ่งเติมเมทานอลเพื่อทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเป็น 2 ขั้นตอน พบว่าสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึงร้อยละ 91 และสามารถลดการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ซึ่งมีราคาแพงลงได้ จากผลการทดลองสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบการทดลองเพื่อผลิตไบโอดีเซลในระบบต่อเนื่องในอนาคต โดยมีปัจจัยหลักที่ต้องคำนึงถึงคือ อัตราการไหลของสับสเตรทและการควบคุมสภาวะของระบบให้เกิดเหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์รวมทั้งการกำจัดหรือลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากกลีเซอรอล

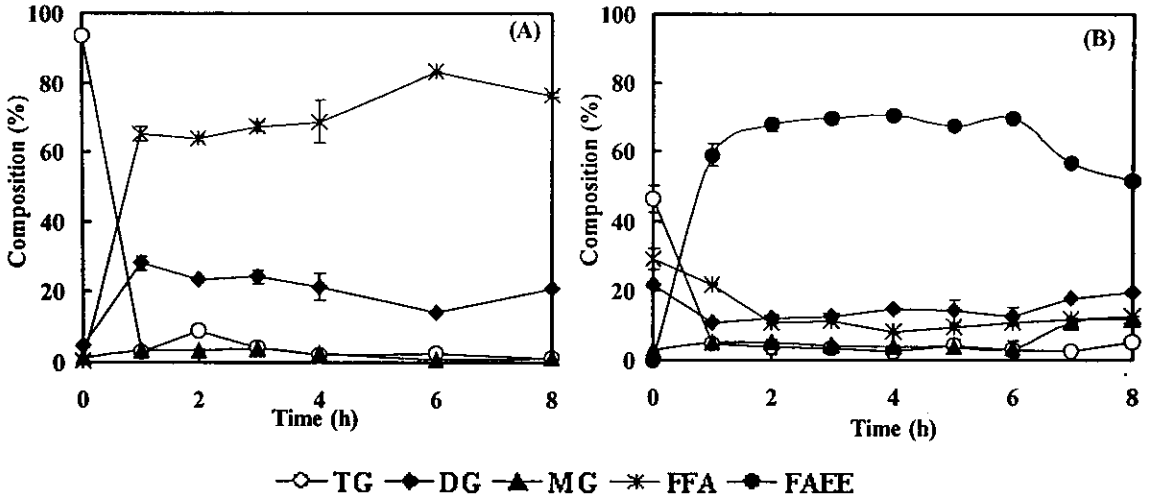


Figure 47. Continuous biodiesel production in packed-bed column by hydrolysis of used palm oil followed by transesterification. A reaction mixture consisted of used frying oil and water (10% of oil weight) in column 1 and 1: 3 molar ratio of oil: ethanol in column 2, substrate flow rate was 0.1 ml/min at 45 ^{o}C. (A): column 1 (immobilized Lipase AY 1 g), (B): column 2 (immobilized Lipase AK 1 g).

7. การผลิตไบโอดีเซลเพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการในการเป็นพลังงานเชื้อเพลิง

จากการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipase AK ปริมาณ 0.4 กรัม บรรจุในคอลัมน์และผ่านสับสเตรทที่เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้วผสมกับเอทานอล ในสัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 ด้วยระบบวน ที่อัตราการไหลของสับสเตรทเท่ากับ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที (การวน 1 รอบใช้เวลาประมาณ 90 นาที) ในสภาวะอุณหภูมิห้อง โดยในระหว่างการเดินระบบจะเกิดการรวมตัวกันของน้ำและกลีเซอรอลและตกลงสู่ก้นของขวดรองรับ ทำให้ง่ายต่อการแยกน้ำและกลีเซอรอลบางส่วนที่แยกตัวออกจากระบบโดยการดูดออกด้วยปิเปต โดยในระหว่างการผลิตจะมีการเติมเอทานอลเพิ่มเติมอีก 2 และ 1 โมล ในชั่วโมงที่ 48 และ 66 ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเอทิลเอสเทอร์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 48 พบว่าการแยกน้ำและกลีเซอรอลมีส่วนช่วยให้การผลิตเอทิลเอสเทอร์มีสูงขึ้น เนื่องจากเป็นการลดสภาพความมีขั้วในระบบ ประกอบกับการเติมเอทานอลที่นอกจากจะเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทแล้วยังเป็นการลดความหนืดในระบบและช่วยทำละลายกลีเซอรอลและองค์ประกอบอื่นๆ ที่เกาะอยู่บนตัวพยุงเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถสัมผัสกับสับสเตรทและเกิดการทำปฏิกิริยาต่อได้ แต่เมื่อถึงจุดหนึ่งที่มีกลีเซอรอลสะสมอยู่ในระบบในปริมาณมากทำให้ระบบเกิดความคงตัว กล่าวคือแม้จะเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาหรือมีการเติมเอทานอลเพิ่มไปในระบบก็ไม่สามารถจะเพิ่มปริมาณเอทิลเอสเทอร์ได้ จึงต้องอาศัยการแยกกลีเซอรอลและองค์ประกอบอื่นที่มีขั้วออก ซึ่งหลังการทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 78 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 89 จึงนำไบโอดีเซลที่ได้มาทำบริสุทธิ์โดยการดูดซับกับซิลิกาเจล 60 เพื่อแยกกลีเซอรอลและองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีขั้ว ด้วยวิธีการบรรจุซิลิกาลงในคอลัมน์ขนาดเดียวกับคอลัมน์เอนไซม์ และบรรจุแบบเดียวกันคือใช้สำลีรองรับตรงส่วนบนสุดและส่วนล่างสุดของคอลัมน์เพื่อไม่ให้ซิลิกาหลุดออกจากคอลัมน์ เนื่องจากซิลิกามีขนาดเล็กมาก โดยจะใช้ซิลิกาเจลในการดูดซับครั้งละ 5 กรัม พบว่าหลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล 60 เป็นจำนวนหลายรอบ (ใช้ซิลิกาเจลไปมากกว่า 20 กรัม) สามารถผลิตไบโอดีเซลที่มีความ บริสุทธิ์สูงสุดจากการวัดด้วยเครื่อง TLC/FID เท่ากับร้อยละ 96.9 และมีไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์และกรดไขมันอิสระเหลืออยู่เท่ากับร้อยละ 1.3, 0.8 และ 1.0 ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการผลิตในระบบต่อเนื่องด้วยวิธีการวนสับสเตรททำให้เกิดการทำปฏิกิริยาซ้ำๆ จะทำให้เกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและสามารถลดการใช้เอนไซม์ลงได้ ทั้งนี้การใช้เอนไซม์ Lipase AK เพียงอย่างเดียวก็สามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจาก 2 ประการ คือ ประการแรก Lipase AK น่าจะเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลโดยผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเอทานอลเกิดเป็นเอทิลเอสเทอร์โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการย่อยเป็นกรดไขมันอิสระก่อน จึงไม่เกิดกรดปาล์มิติกที่จะแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องและประการที่ 2 คือการที่ระบบมีเอทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลกับเอทานอลซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นตัวทำละลายจึงสามารถช่วยทำละลายสารในระบบร่วมกันจึงไม่เกิดการอุดตันของคอลัมน์

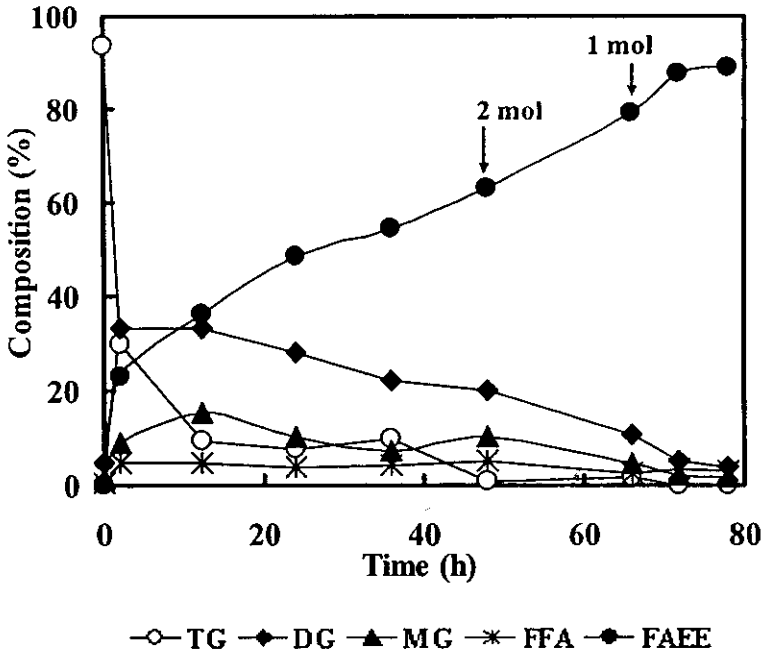


Figure 48. Continuous biodiesel production in packed-bed column with recycles system. A reaction mixture consisted of ethanol and used palm oil at molar ratio of 3:1, substrate flow rate was 0.1 ml/min at 45 ^{o}C. The arrow showed the addition of ethanol.

เมื่อได้ไบโอดีเซลที่มีความเข้มข้นของเอทิลเอสเทอร์มากกว่าร้อยละ 96.5 จึงนำมาระเหยเอทานอลส่วนเกินออกด้วยการกลั่นด้วยเครื่อง Rotary evaporator และวิเคราะห์คุณสมบัติของไบโอดีเซลในการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงตามมาตรฐานของกระทรวงพลังงาน โดยเปรียบเทียบกับไบโอดีเซลที่มาจากการทำปฏิกิริยาของน้ำมันชนิดอื่นกับเอทานอล (ตารางที่ 21) พบว่าไบโอดีเซลที่ผลิตได้ยังมีความหนืด (viscosity) ที่สูงเกินกว่าค่ามาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์ตามประกาศของกระทรวงพลังงานโดยมีค่าเท่ากับ 5.66 เซนติสโตก ในขณะที่ค่ามาตรฐานจะอยู่ในช่วง 3.5 ถึง 5.0 เซนติสโตก และมีค่าสูงกว่าเอทิลเอสเทอร์ที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มในงานวิจัยของ Moreira และคณะ (2007) ที่มีค่าเท่ากับ 4.97 เซนติสโตก เมื่อเปรียบเทียบค่าความหนืดของไบโอดีเซลที่ได้กับค่าความหนืดของเมทิลเอสเทอร์ตามมาตรฐานไบโอดีเซล ASTM D6751-08 ก็พบว่าผ่านเกณฑ์ที่กำหนดคืออยู่ในช่วง 1.9-6.0 ตารางมิลลิเมตรต่อวินาที ซึ่งค่าความหนืดเป็นคุณสมบัติสำคัญของไบโอดีเซลที่ต้องพิจารณาเนื่องจากส่งผลต่อการอัดฉีดของน้ำมันภายในเครื่องยนต์ โดยหากน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีความหนืดสูงก็จะส่งผลให้น้ำมันเกิดการแตกตัวได้ยาก ทำให้ระบบการจ่ายน้ำมันมีประสิทธิภาพต่ำ (Islam *et al.*, 2004 อ้างโดย Demirbas, 2008) เมื่อพิจารณาค่าจุดขุ่นและจุดไหลเทที่มีค่าเท่ากับ 8 และ 6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยจุดขุ่นคืออุณหภูมิที่ทำให้น้ำมันเริ่มเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง ส่วนจุดไหลเทคืออุณหภูมิต่ำสุดที่ไบโอดีเซลสามารถไหลได้ ก่อนจะกลายเป็นของแข็งจนหมดหากมีการลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดไหลเท (Encinar *et al.*, 2007) ซึ่งจุดขุ่นและจุดไหลเทของเอทิลเอสเทอร์ใน

งานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่าเอทิลเอสเทอร์ของน้ำมันใช้แล้วจากงานวิจัยของ Encinar และคณะ (2007) ซึ่งมีค่าจุดขุ่นและจุดไหลเทเท่ากับ -2.7 และ -7.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่มาของวัตถุดิบน้ำมันใช้แล้วที่ต่างกัน เพราะการที่ค่าความหนืด จุดขุ่นและจุดไหลเทของไบโอดีเซลจะมีค่าสูงหรือต่ำนั้นจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเอทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบในไบโอดีเซล กล่าวคือหากเป็นเอทิลเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเช่น กรดโอเลอิกหรือกรดลิโนเลอิก ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ต่ำก็จะทำให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีค่าความหนืด จุดขุ่นและจุดไหลเทต่ำตามไปด้วย ในทางตรงกันข้ามหากเป็นไบโอดีเซลที่เกิดจากกรดไขมันอิ่มตัวซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูงเช่น กรดปาล์มิติกหรือกรดสเตียริก ก็จะส่งผลให้ค่าความหนืด จุดขุ่นและจุดไหลเทของไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีค่าสูงเช่นกัน โดยในการทดลองนี้ใช้น้ำมันใช้แล้วที่มาจากน้ำมันปาล์มซึ่งมีองค์ประกอบที่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ Encinar และคณะ (2007) ใช้น้ำมันที่ใช้แล้วที่มาจากส่วนผสมของน้ำมันมะกอกและน้ำมันดอกทานตะวันซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งจุดขุ่นและจุดไหลเทจะส่งผลต่อการใช้งานไบโอดีเซลในสภาพภูมิอากาศต่างๆ กล่าวคือหากเป็นประเทศในเขตหนาวก็ควรใช้ไบโอดีเซลที่มีค่าจุดขุ่นและจุดไหลเทที่ต่ำ ส่วนประเทศในเขตร้อนก็สามารถใช้ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่นและจุดไหลเทที่สูงได้ ปัจจัยหนึ่งที่อาจมีผลต่อค่าความหนืดของไบโอดีเซลคือปริมาณกลีเซอรอล โดยจะส่งผลให้ค่าความหนืดมีค่าสูงตามปริมาณกลีเซอรอลที่อาจหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ เมื่อพิจารณาจุดวาบไฟของเอทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้พบว่าตรงตามมาตรฐานของไบโอดีเซลของประเทศไทยโดยมีค่าเท่ากับ 120 องศาเซลเซียส แต่มีค่าสูงกว่าไบโอดีเซลของน้ำมันปาล์มใช้แล้วจากงานวิจัยของ Al-Widyan และ Al-Shyoukh (2002) ที่มีจุดวาบไฟเท่ากับ 109 องศาเซลเซียส โดยการที่ไบโอดีเซลมีจุดวาบไฟที่ต่ำก็เป็นผลมาจากการมีเอทานอลที่ยังหลงเหลืออยู่ในไบโอดีเซลในปริมาณมาก ทั้งนี้จุดวาบไฟจะเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการติดไฟของไบโอดีเซลซึ่งสัมพันธ์กับความปลอดภัยในการใช้งาน เนื่องจากไบโอดีเซลที่มีจุดวาบไฟสูงจะมีความสะดวกและปลอดภัยในการเก็บรักษา

Table 21. Some physical and chemical properties of biodiesel.

Property	This study	Standard[b]	ASTM D6751-08	Palm oil ethyl ester[d]	Ethyl ester of grease[e]	Frying oil ethyl ester[f]	Used palm oil ethyl ester[g]	Palm kernel oil ethyl ester[h]
Methyl (ethyl) ester (%)	96.9[a]	≥ 96.5	100	96.5	98	94.5	94.5	No report
Viscosity at 40°C (cSt)	5.66	3.5-5.0	1.9 to 6.0	4.97	5.1	2.74	14.94 at 20 °C	9.33
Flash Point (°C)	120	≥120	≥130	-	-	188	109	-
Monoglyceride (%)	0.8[a]	≤ 0.80	-	-	-	-	-	-
Diglyceride (%)	1.3[a]	≤ 0.20	-	-	-	-	-	-
Triglyceride (%)	-	≤ 0.20	-	-	-	-	-	-
Cloud point (°C)	8	NS	Report[c]	-	2	-2.7	0	12
Pour point (°C)	6	NS	-	-	3	-7.3	0	8

[a] Determined by TLC/FID

[b] Standard specification for biodiesel fuel 2009 from Department of Energy Business, Ministry of Energy, Thailand

[c] unlimited but have to be reported.

[d] Moreira และคณะ (2007)

[e] Hsu และคณะ (2004)

[f] Encinar และคณะ 2007

[g] Al-Widyan และ Al-Shyoukh (2002)

[h] Abigor และคณะ (2000)

NS: No specification

cSt: centistokes (mm^2/s)

- : not specified

บทที่ 4

สรุป

จากการศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มใช้แล้วจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับน้ำมันปาล์มที่ใช้ในการบริโภคทั่วไปและองค์ประกอบร้อยละ 94 ยังคงเป็นไตรกลีเซอไรด์ โดยมีกรดโอเลอิกและกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณร้อยละ 44 และ 38 ตามลำดับ และจากการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 3 ชนิดคือ Lipase PS, Lipase AK และ Lipase AY บนตัวพยุงแอคคูเรล EP 100 ที่มีขนาดของรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 400 ไมโครเมตร และวัดกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนความเข้มข้นร้อยละ 10 ในไอโซออกเทนเติมน้ำร้อยละ 50 ของปริมาตรสับเสตรท ทำปฏิกิริยาที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าเอนไซม์ตรึงรูป Lipase PS, Lipase AK และ Lipase AY ที่ได้มีกิจกรรมเท่ากับ 3.3, 4.2 และ 1.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์ตรึงรูป ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพการยึดเกาะเท่ากับร้อยละ 96, 98 และ 97 ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะเท่ากับร้อยละ 62, 87 และ 46 ตามลำดับ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้าคือ Lipozyme TL IM ที่มีกิจกรรมเท่ากับ 3.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาศึกษาคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส เอสเทอริฟิเคชั่น และทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น พบว่า Lipase AY สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่มีน้ำในระบบร้อยละ 10 ได้ผลผลิตกรดไขมันอิสระสูงสุด ส่วนเอนไซม์ Lipase PS สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างกรดปาล์มิติกกับเอทานอลในสภาวะที่มีเฮกเซนเป็นตัวทำละลายได้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์สูงสุด ในขณะที่ Lipase AK สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างน้ำมันปาล์มใช้แล้วกับเอทานอลได้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์สูงสุด และเมื่อนำเอนไซม์ Lipase AK กับ Lipase AY มาผสมกันในสัดส่วนร้อยละ 50 ต่อ 50 เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นพบว่าสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้เท่ากับร้อยละ 84 และทำให้สามารถลดปริมาณการใช้ Lipase AK ได้ครึ่งหนึ่ง

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปผสมระหว่าง Lipase AK กับ Lipase AY พบว่าที่ปริมาณน้ำร้อยละ 2 และปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 10 สามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้เท่ากับร้อยละ 89 และเมื่อศึกษาผลของสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน พบว่าที่สัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 2 ต่อ 1 จะให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาสูงสุดเท่ากับ 1.00 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง แต่การใช้สัดส่วนโมลเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1 จะทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาลดลง ดังนั้นเพื่อลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเอทานอล จึงศึกษาผลของการแบ่งเติมเอทานอลออกเป็น 2 ขั้นตอนโดยเติมเอทานอล 2 โมล ก่อนที่จะเติมอีก 1 โมล เปรียบเทียบกับการเติม 3 ขั้นตอนโดยเติมเอทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 1 โมล

พบว่าการเติม 3 ขั้นตอนสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 97 ซึ่งไม่แตกต่างกับการเติม 2 ขั้นตอน แต่การเติม 3 ขั้นตอนมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นสูงกว่าคือเท่ากับ 1.03 มิลลิโมลต่อกรัมต่อชั่วโมง จากการทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำของเอนไซม์ผสมพบว่าสามารถนำมาใช้ซ้ำได้ 12 ครั้งโดยยังคงให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 50

เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปผสมมาผลิตเอทิลเอสเทอร์ในระบบต่อเนื่องโดยใช้คอลัมน์ชนิดแพคเบด พบว่าสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 20 แต่ในระหว่างการผลิตจะพบการอุดตันของคอลัมน์ การเพิ่มจำนวนของคอลัมน์ซึ่งหมายถึงเพิ่มปริมาณเอนไซม์และเวลาที่สับสเตรทสัมผัสกับเอนไซม์สามารถช่วยให้การทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นมีสูงมากขึ้น โดยสามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 50 แต่ไม่อาจแก้ไขการอุดตันของระบบได้ ในขณะที่การศึกษาการแยกคอลัมน์ Lipase AY กับ Lipase AK โดยทำการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วด้วย Lipase AY ก่อน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันได้เป็นอย่างดีส่งผลให้เกิดการผลิตกรดไขมันอิสระได้มากกว่าร้อยละ 60 และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแยกน้ำออกและนำไปเติมเอทานอลเพื่อผลิตเอทิลเอสเทอร์ด้วย Lipase AK พบว่าเกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 70 อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาวิธีการแยกกลีเซอรอลออกด้วย เพื่อเพิ่มการผลิตเอทิลเอสเทอร์ให้มากกว่าร้อยละ 90

จากการศึกษาคุณสมบัติของเอทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ในการเป็นเชื้อเพลิงดีเซลของเครื่องยนต์ โดยนำเอทิลเอสเทอร์มาแยกกลีเซอรอลออกโดยใช้ซิลิกาเจล พบว่ามีร้อยละของเอทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 96.9 และหลังจากการระเหยเอทานอลส่วนเกินออก พบว่าไบโอดีเซลที่ได้มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับน้ำมันไบโอดีเซลที่เป็นเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์อื่นๆ โดยมีค่าความหนืดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเท่ากับ 5.66 เซนติสโตก (ตารางมิลลิเมตรต่อวินาที) ค่าจุดวาบไฟเท่ากับ 120 องศาเซลเซียส ค่าจุดขุ่นและจุดไหลเทเท่ากับ 8 และ 6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอด, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, สมพร อิศวิลานนท์ และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. การศึกษาสภานภาพวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล. รายงานการวิจัย. 4 สิงหาคม 2546: 3-10.

กองบรรณาธิการ. 2544. ไบโอดีเซลจะเป็นพลังงานทางเลือกของคนไทยหรือไม่. เทคนิค. 200: 128-132.

กิตติศักดิ์ ทวีสินโสภา. 2549. การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มหีบรวม โดยใช้กระบวนการผลิตแบบ Esterification และ Transesterification. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเครื่องกล มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กัญจนา บุณยเกียรติ. 2544. ไบโอดีเซล : พลังงานทางเลือกใหม่สำหรับเครื่องยนต์ดีเซล. วารสารวิทยาศาสตร์. 148-152.

คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. กรุงเทพฯ.

ฉัตรชัย สังข์ผุด. 2542. การย่อยน้ำมันปาล์มโอเลอินในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เฉลิมพร ณ พัทลุง. 2549. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดยางพาราและการประยุกต์ใช้งาน. วิทยานิพนธ์ สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ญาใจ วิทยะพงศ์. 2548. การใช้ประโยชน์ของไขมันจากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยเอนไซม์ไลเปส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธราพงษ์ วิทิตศานต์, สุชญา นิติวัฒนานนท์, นุจรี เลาห์ประเสริฐและธนาทิพย์ อัศวผดุงสิทธิ์. 2546. การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันพืชที่ประกอบอาหารมาใช้ประโยชน์ทดแทนในด้านพลังงาน (ส่วนที่ 2). รายงานการวิจัย. กรกฎาคม 2546: 6.

นิธิยา รัตนาปนนท์, 2541. วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 3.

นิยม กำลังดี. 2539. เอนไซม์ไลเปส : อนาคตที่เปลี่ยนแปลงในเชิงอุตสาหกรรม. ว. วิทย มข. 24(3) : 158-163.

กรมธุรกิจพลังงาน. 2552. ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่อง กำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเตอร์ของกรดไขมัน. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนพิเศษ 98 ง: 43-45.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ป้วย อุ่นใจและสยาม ภพลือชัย. 2544. ไบโอดีเซลเชื้อเพลิงชีวภาพแห่งยุคสมัย. อัพเดท. 16(168): 50-56.

พนิดา ศิริบังเกิดผล. 2544. ไบโอดีเซลพลังงานทดแทนในฝันของประเทศเกษตรกรรม. จดหมายข่าว วท. มิถุนายน : 6-7.

มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด. 2535. คุณภาพของน้ำมันทอด. อาหาร. 22(2) : 8-12.

วิภาวดี ปริพัฒนไพโรจน์. 2546. การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิภาวรรณ ศรีมุข. 2546. การศึกษาคุณภาพของน้ำมันและไขมันสำหรับบริโภค. เอกสารผลงานที่เสนอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6 ว. กลุ่มงานคุณค่าทางโภชนาการ กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. เลขหมู่ วศ. กช. อว. 48 เลขทะเบียน 11255.

วุฒิชัย พิชัยกุล. 2540. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริพร ค่านคร. 2544. ไบโอดีเซลพลังงานเพื่อทางเลือกของชาติ. วิศวกรรมสาร. 54(9): 110-116.

สิริรัตน์ พึ่งชมพู. 2548. การศึกษาความเป็นไปได้เชิงเทคนิคและเชิงเศรษฐศาสตร์ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขน้ำมันในระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมอุตสาหการ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เสาวนีย์ พิสิฐานุสรณ์. 2548. หมดยุคน้ำมันครองโลก. ผู้จัดการ. 23(264) : 80-88.

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. Biochemical Society Transactions 28, part 6: 979-981.

Al-Duri, B., Robinson, E., McNerlan, S. and Bailie, P. 1995. Hydrolysis of edible oil by lipases immobilized on hydrophobic supports: effects of internal support structure. J. Am. Oil Chem. Soc. 72 (11): 1351-1359.

Al-Widyan M.I. and Al-Shyoukh, A. O. 2002. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. Bioresour. Technol. 85:253-256.

Al-Zuhair, S., Hasan, M. and Ramachandran, K. B. 2003. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. Process Biochem. 38: 1155-1163.

Al-Zuhair, S. 2005. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study. Biotechnol. Prog. 21: 1442-1448.

Al-Zuhair S, Ling, F! W. and Jun, L. S. 2007. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. Process Biochem. 42: 951-960.

Balat, M., Balat, H. and Oz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. Prog. Energ. Combust. 34: 551–573.

Blanco, R. M., Terreros, P., Munoz, N. and Serra, E. 2007. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. J. Mol. Catal. B-Enzym. 47: 13-20.

Bosley, J.A. and Peilow, A. D. 1997. Immobolization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. J. Am. Oil Chem. Soc. 74(2):107-111.

Bouaid, A., Martinez, M. and Aracil, J. 2007. A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. Chem. Eng. J. 134: 93–99.

Cao, L. 2005. Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects *In* Carrier-bound Immobilized Enzymes Principles, Applications and Design. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: pp.1-37.

Castillo, E., Dossat, V., Marty A., Condoret, J.S. and Combes, D. 1997. The role of silica gel in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. J. Am. Oil Chem. Soc. 74(2): 77-85.

Chen, J. W. and Wu, W. T. 2003. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. J. Biosci. Bioeng. 95: 466-469.

Chen, X., Du, W. and Liu, D. 2008. Effect of several factors on soluble lipase-mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. World J. Microb. Biotechnol. 24: 2097-2102.

Colombie S, Tweddell, R. J., Condoret, J.-S. and Marty, A. 1998. Water activity control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. Biotechnol. Bioeng. 63(3): 362-368.

Cvengros, J. and Cvengrosova, Z. 2004. Used frying oils and fats and their utilization in the productionof methyl esters of higher fatty acids. Biomass Bioenerg. 27: 173-181.

Demirbas, A. 2008. Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines. Springer-Verlag London Limited.

Demirbas, A. 2009. Production of biodiesel fuels from linseed oil using methanol and ethanol in non-catalytic SCF conditions. Biomass Bioenerg. 33: 113–118.

Diks, R. M. M. and Bosley, J.A. 2000. The exploitation of lipase selectivities for the production of acylglycerols *In* Enzyme in Lipid Modification (Uwe T. Bornscheuer ed.) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: p. 4.

Encinar, J.M., González, J.F. and Rodríguez-Reinares, A. 2007. Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization. Fuel Process Technol. 88: 513–522.

Foglia. Thomas A., Nelson. Lloyd A., Dunn. Robert O., and Marmer. William N. 1997. Low-temperature properties of alkyl ester of tallow and grease. J. Am. Oil Chem. Soc. 74 (8): 951-955.

Foresti ML, Errazu, A. and Ferreira, M. L. 2005a. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. Biochem. Eng. J. 25: 69-77.

Foresti, M. L., Alimenti, G. A. and Ferreira, M. L. 2005b. Interfacial activation and bioimprinting of *Candida rugosa* lipase immobilized on polypropylene: effect on the enzymatic activity in solvent - free ethyl oleate synthesis. Enzyme Microb. Technol. 36: 338-349.

Foresti ML, Pedernera, M., Bucala, V. and Ferreira, M. L. 2007. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. Enzyme Microb. Technol. 41:62-70.

Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. J. Biosci. Bioeng. 92: 405-416.

Gunstone F. D. 2000. Lipid glossary 2. http://www.uni-bonn.de/~tkolter/images/lipidglossary.pdf. (1/9/2009).

Gitlesen, T., Bauer, M. and Adlercreutz, P. 1997. Adsorption of lipase on polypropylene powder. Biochim. Biophys. Acta. 1345: 188-196.

Halim SFA, Kamaruddin, A. H. and Fernando, W.J.N. 2008. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. Bioresour. Technol. 100 (2): 710-716.

Hayes, D. G. 2004. Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. J. Am. Oil Chem. Soc. 81 (12): 1077-1103.

Hsu, A., Jones, K., Flogia, T.A. and Marmer, W.N. 2002. Immobilized lipase-catalyzed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. Biotechnol. Appl. Biochem. 36: 181–186.

Hsu A-F, Jones, K. C., Foglia, T. A. and Marmer, W. N. 2004. Continuous production of ethy esters of grease using an immobilized lipase. J. Am. Oil Chem. Soc. 81(8):749-752.

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.

Kaewthong, W. 2004. Continuous Production of Monoacylglycerols by Glycerolysis of Palm Olein with Immobilized Lipase. Doctor of Philosophy Thesis in Biotechnology, Prince of Songkla University.

Kazlauskas, R.J. and Borncheuer, U.T. 1997. Biotransformation with lipase. *In* Biotechnology (Rehm, H.J., Reed, G., Puhler, A., Standler, P.J.W. and Kelly, D.R. eds.) Vol. VII : Biotransformation, pp. 226. Weinheim : VCH Verlagagesellscaft mbH.

Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. 1987. Enzyme Immobilization. *In* Biotechnology (Kenedy, J.F. eds.) Vol. VIIa : Enzyme Technology. pp. 349-402. Weinheim : VCH Verlagagesellscaft mbH.

Kiwjaroun, C., Tubtimdee, C. and Piumsomboon, P. 2009. LCA studies comparing biodiesel synthesized by conventional and supercritical methanol methods. J. Clean. Prod. 17: 143-153.

Kwon, D.Y., Song, H.N. and Yeon, S.H. 1996. Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent. J. Am. Oil Chem. Soc. 73 : 1521-1525.

Lai, O.M., Ghazali, H.M., Cho, F. and Chong, C.L. 2000. Enzymatic transesterication of palm stearin: anhydrous milk fat mixtures using 1, 3-specic and non-specic lipases. Food. Chem. 70: 221-225.

Lee, S. Y. and Rhee, J.S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. Enzyme Microb. Technol. 15: 617-623.

Leung, D.Y.C., Koo, B.C.P. and Guo, Y. 2005. Degradation of biodiesel under differant storage conditions. J. Fuel 80 : 225-231.

Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L. and Li, Z. 2006. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. J. Mol. Catal. B-Enzym 43: 58-62.

Linko, Y. Y., Lamsa, M., Huhtala, A. and Rantanen, O. 1995. Lipase Biocatalysis in the production of esters. J. Am. Oil Chem. Soc. 72(11): 1293-1299.

Marangoni, A., G. 2002. Lipase: Structure, Function, and Properties. *In* Lipid biotechnology (Tsung Min Kuo, Gardner, H. W. ed.) Marcel Dekken, Inc. pp. 357-359.

Marchetti, J. M., Miguel, V.U. and Errazu, A.F. 2007. Possible methods for biodiesel production. Renew. Sust. Energ. Rev. 11: 1300–1311.

Marty, A., Dossat, V. and Condoret, J. S. 1997. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: influence of the production of hydrophilic compounds. Biotechnol. Bioeng. 56(2): 232-237.

Matassoli, A.L.F., Corrêa, I.N.S., Veloso, C.O.and Langone, M.A.P. 2009. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. Appl. Biochem. Biotechnol. 155:347-355.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme Microb. Technol. 40: 1451-1463.

Meher, L.C., Vidya Sagar, D. and Naik S.N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification. Renew. Sust. Energ. Rev. 10: 248–268.

Methanol. 2008. Wikipedia. (Online). Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Methanol.(December 17, 2008)

Mitttelbach, M. 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 67(3): 168-170.

Moreira, A.B.R, Perez, V.H., Zanin, G.M. and de Castro, H.F. 2007. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica–PVA composite. Energ. Fuel. 21:3689-3694.

Nelson, L.A., Foglia, T.A., Dunn, R.O. and Marmer. W. N. 1996. Lipase-catalized production of biodiesel. J. Am. Oil Chem. Soc. 73(8): 1191-1195.

Noureddini, H., Gao, X. and Joshi, S. 2003. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by sol-gel entrapment and its application in the hydrolysis of soybean oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 80(11): 1077-1083.

Noureddini, H., Gao, X., Philkana, R.S. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresour. Technol. 96: 769–777.

Ophardt, C. E. 2003. Denaturation of Proteins. http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/568denaturation.html (11/10/2009).

Pleiss J, Fischer, M. and Schmid, R. D. 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. Chem. Phys. Lipids. 93: 67-80.

Qin H, Yan X, Yun T, Dong W. 2008. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. Chin. J. Catal. 29(1):41-46.

Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L. and Muthukumar, K. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresour. Technol. 99: 3975–3981.

Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E. and Miller, R. 2009. Lipases at interfaces: A review. Adv. Colloid. Interface. 147–148: 237–250.

Sabbani, S., Hedenstroma, E. and Nordin, O. 2006. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. J. Mol. Catal. B-Enzym. 42:1-9.

Saka, S and Kusdiana, D. 2001. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. J. Fuel 80: 225-231.

Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M. and Solinas and V. 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysts. J. Biotech. 119: 291-299.

Salis, A., Monduzzi, M. and Solinas, V. 2007. Used of Lipases for the Production of Biodiesel. *In* Industrial Enzymes (Polaina, J. and MacCabe, A. P. ed.) pp. 317-339. The Natherlands: Spinger press.

Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M. and Solinas, V. 2008. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. J. Mol. Catal. B-Enzym. 54: 19-26.

Salis, A., Bhattacharyya, M. S., Monduzzi, M. and Solinas, V. 2009. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. J. Mol. Catal. B-Enzym. 57: 262–269.

Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H. and Fukuda, H. 2000. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. J. Biosci. Bioeng. 90: 180-183.

Sanchez,,O. J., Cardona, C. A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresour. Technol. 99: 5270–5295.

Scrimgeour, C., 2005. Chemistry of Fatty Aids. *In* Shahidi, F. (Ed.), Bailey's Industrial Oil and Fat Products. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ.

Scrimgeour, C.M. and Harwood, J.L. 2007. Fatty acid and lipid structure. *In* Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. (Ed.), The lipid handbook, CRC Press, Boca Raton.

Selmi, B. and Thomas, D. 1998. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. J. Am. Oil Chem. Soc. 75 (6): 691-695.

Shah, S., Sharma, S. and Gupta, M.N. 2004. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. Energ. Fuel 18:154-159.

Shah, S. and Gupta, M.N. 2007. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. Process Biochem. 42: 409-414.

Shaw J-F, Chang, S.-W.,Lin, S.-C.,Wu, T.-T., Ju, H.-Y., Akoh, C. C., Chang, R.-H. and Shieh, C.-J. 2008. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. Energ. Fuel 22: 40-844.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. and Tominaga, Y. 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. J. Am. Oil Chem. Soc. 75 (7): 789-793.

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.

Siew, W.L. and Ng, W. L. 2000. Differential scanning thermograms of palm oil triglycerides in the presence of diglycerides. J. Oil Palm Res. 12 (1): 1-7.

Soumanou, M. M. and Bornscheuer, U.T. 2003a. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. Enzyme Microb. Technol. 3: 97–103.

Soumanou, M. M. and Bornscheuer, U.T. 2003b. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. : Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105 (11): 656-660.

Standard specification for biodiesel Fuel (B100)–ASTM D6751-08. 2008. American Society for Testing and Materials. West Conshohocken. PA. USA.

Stransky, K., Zarevucka, M., Kejık, Z., Wimmer, Z., Mackova, M. and Demnerov, K. 2007. Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. Biochem. Eng. J. 34: 209–216.

Su, E. and Wei, D. 2008. Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method. J. Mol. Catal. B-Enzym. 55: 118-125.

Sulaiman Al-Zuhair. 2005. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study. Biotechnol. Prog. 2005, 21: 1442-1448.

Vacek, M., M. Zarevucka, Z. Wimmer, K. Stransky, M. Mackova, and K. Demnerova. 2001. Enzymic alcoholysis of blackcurrant oil. Biotechnol. Lett. 23: 27–32.

Vasudevan, P. T. and Briggs, M. 2008. Biodiesel production-current state of the art and challenges. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35:421–430.

Vikbjerg, A.F., Peng, L., Mu, H. and Xu, X. 2005. Continuous production of structured phospholipids in a packed bed reactor with lipase from *Thermomyces lanuginosa.* J. Am. Oil Chem. Soc. 82(24): 237-242.

Virto, M.D., Agud, I., Montero, S., Blanco, A., Solozabal, R., Lascaray, J., Llama, M.J., Serra, J.L., Landeta, L.C. and Renobales, M. 1994. Hydrolysis of animal fats by immobilized *Candida rugosa* lipase. Enzyme Microb. Technol. 16(1):61-65.

Wang, H., Zong, M.-H., Wu, H., Lou, W.-Y. 2007. Novel and highly regioselective route for synthesis of 5-fluorouridine lipophilic ester derivatives by lipozyme TL IM. J. Biotechnol. 129(4):689-695.

Wang, L., Du, W. Liu, D., Li, L. and Dai, N. 2006. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. J. Mol. Catal. B-Enzym. 43: 29-32.

Warner, K. 2008. Chemistry of Frying Oils. *In* Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology (Casimir C. Akoh and David B. Min ed.) Third Edition: pp. 189-202. The United States of America: CRC Press.

Watanabe Y, Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. and Tominaga, Y. 2000. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. J. Am. Oil Chem. Soc. 77(4):355-360.

Watanabe Y, Pinsirodom, P., Nagao, T., Yamauchi, A., Kobayashi, T., Nishida, Y., Takagi, Y. and Shimada, Y. 2007a. Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. J. Mol. Catal. B-Enzym. 44:99-105.

Watanabe, Y., Nagau, T., Nishida, Y., Takagi, Y. and Shimada, Y. 2007b. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. J. Am. Oil Chem. Soc. 84: 1015-1021.

Weber, N. and Mukherjee, K. D. 2008. Chemistry of frying oils in Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology (ed. Casimir C. Akoh and David B. Min) third edition. Pp: 189-202. CRC Press Taylor & Francis Group.

Winayanuwattikuna, P., Kaewpiboona, C., Piriyakananona, K., Tantonga, S., Thakernkarnkita, W., Chulalaksananukulb, W. and Yongvanicha, T. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. Biomass Bioenerg. 32 :1279–1286.

Wu, W.H., Foglia, T.A., Marmer, W.N. and Philips, J.G. 1999. Optimizing production of ethyl esters grease using 95% ethanol by response surface methodology. J. Am. Oil Chem. Soc. 76(4):517-521.

Wu, H., Zong, M.H. and Lou, W.Y. 2004. Transesterification of waste oil to biodiesel in solvent free system catalyzed by immobilized. Chin. J. Catal. 25(11): 903-908.

Xu, Y., Du, W., Zeng., J. and Liu, D. 2004. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent-free medium. Biocatal. Biotransfor. 22(1):45-48.

Yamada, H., Sorimachi, Y. and Tagawa, T. 2007. Operation optimization of lipase-catalyzed biodiesel production. J. Chem. Eng. JPN. 40(7): 571-574.

Yesiloglu Y. 2004. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 81(2). 157-160.

Zhao, X., El-Zahab, B., Brosnahan, R., Perry, J. and Wang, P. 2007. An organic soluble lipase for water-free synthesis of biodiesel. Appl. Biochem. Biotechnol. 143:236-243.

Zhou, D, Xu, X., Mu, H., Hoy, C. -E. and Adler-Nissen, J. 2000. Lipase-catalyzed production of structured lipids via acidolysis of fish oil with caprylic acid. J. Food. Lipids. 7:263-274.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การหาค่ากรดและกรดไขมันอิสระ (Fatty Acid, FA; Free Fatty Acid, FFA)

นิยาม: มิลลิกรัมของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้น้ำมัน 1 กรัมกลายเป็นกลาง

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล (N)
3. ฟีนอฟทาลีนเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-10 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกลางโดยการเติมฟีนอฟทาลีน 5 หยด และปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มาล หยดด่างทีละหยดพร้อมทั้งเขย่าหรือกวนจนได้สารละลายแอลกอฮอล์เป็นสีชมพูถาวร
3. เติมเอทิลแอลกอฮอล์ที่เป็นกลาง 50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง เขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างละลายในแอลกอฮอล์ถ้าละลายได้ไม่ดีให้อุ่นที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส
4. ไตเตรทสารละลายตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มาล ขณะไตเตรตต้องเขย่าอย่างแรงจนกระทั่งได้สารละลายสีชมพูคงที่อยู่ประมาณ 1 นาที
5. คำนวณค่ากรดและปริมาณกรดไขมันอิสระจากสูตร

$$\text{ค่ากรด} = \frac{\text{ปริมาณด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นด่าง (นอร์มอล)} \times 56.1}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

$$\text{กรดไขมันอิสระ(ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นด่าง (นอร์มอล)} \times 25.6}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

หมายเหตุ : น้ำหนักโมเลกุลของกรดโอเลอิก: 282
กรดปาล์มิติก: 256
กรดลอริก: 200

2. การหาค่าสปอนิฟิเคชัน (Saponification Number, S.N.)

นิยาม: มิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้เกิดสบู่ในน้ำมันหรือไขมัน 1 กรัม

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มอล ในเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ซึ่งเตรียมไว้อย่างน้อย 5 วันก่อนใช้ และสารละลายที่ได้ไม่ควรมีสีเหลืองฟาง
2. กรดเกลือเข้มข้น 0.5 นอร์มอล
3. ฟีนอฟทาลีนร้อยละ 1

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1.2 กรัม ใส่ในขวดกลั่นที่สะอาดและแห้ง
2. เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตและใส่ลูกแก้วในขวดกลั่นด้วย
3. จัดเครื่องกลั่นพร้อมเปิดน้ำหล่อชุดควบแน่นและเปิดสวิทซ์ไฟรีฟลักซ์สารละลายให้เดือดเบา ๆ นาน 1 ชั่วโมง
4. นำขวดใส่สารละลายออกจากชุดกลั่น
5. เติมฟีนอฟทาลีน 5 หยดแล้วไตเตรตด้วยกรดเกลือเข้มข้น 0.5 นอร์มอล
6. เตรียมและไตเตรตแบลงก์เช่นเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณค่าสปอนิฟิเคชันจากสูตร

$$\text{ค่าสปอนิฟิเคชัน (S.N.)} = \frac{(b-a) \times N \times 56.1}{W}$$

b = ปริมาตรกรดเกลือที่ใช้ไตเตรทกับแบลงก์ (มิลลิลิตร)

a = ปริมาตรกรดเกลือที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การคำนวณ ค่าน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันหรือไขมันจากค่าซาปอนิฟิเคชั่น

$$\text{น้ำหนักโมเลกุล} = \frac{1000 \times 3 \times 56.1}{S.N.}$$

หมายเหตุ: ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมันมีองค์ประกอบเป็นไตรกลีเซอไรด์ทั้งหมด

3. การหาค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide Value, P.V.)

นิยาม: ค่าเปอร์ออกไซด์คือ มิลลิกรัมสมมูลของออกซิเจนต่อน้ำมัน 1 กิโลกรัม

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายผสมอะซิติกกับคลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 3: 2
2. สารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)
3. สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล
4. น้ำแป้ง (soluble starch) เข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน ใส่ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร

Table 22. Available sample for P.V. determination.

ค่าเพอร์ออกไซด์ที่คาดคะเนไว้ (มิลลิกรัมสมมูล)	น้ำหนักตัวอย่างที่ต้องการชั่ง
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. เติมสารละลายอะซิติก- คลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างละลาย
3. เติมสารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ 1 มิลลิลิตร ปิดจุกพร้อมเขย่านาน 1 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้ที่มืด 5 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
5. ไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต พร้อมเขย่าอย่างแรงจนได้สารละลายสีเหลืองอ่อนเติมน้ำแป้ง 0.5 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทต่อไปจนสีน้ำเงินหมดไป (ถ้าการไตเตรทใช้สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.1 นอร์มาล ในปริมาณน้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตร ให้เปลี่ยนความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตเป็น 0.002 นอร์มอล)
6. เตรียมไตเตรทแบลงก์เช่นเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณค่าเพอร์ออกไซด์จากสูตร

$$\text{ค่าเพอร์ออกไซด์} = \frac{(a-b) \times N \times 1000}{W}$$

a: ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b: ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ที่ใช้ไตเตรทกับแบลงก์ (มิลลิลิตร)

N: ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

W: น้ำหนักตัวอย่างตัวอย่าง (กรัม)

4. การหาค่าไอโอดีน (Iodine Number, I.N.)

นิยาม: ค่าไอโอดีน คือ จำนวนกรัมของไอโอดีนที่ถูกดูดซึมโดยน้ำมัน 100 กรัม

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. Wij's solution
2. โพแทสเซียมไอโอไดด์เข้มข้น 10%
3. โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 . 5H_2O$) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล
4. ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane)
5. น้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 1

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับค่าไอโอดีนที่คาดคะเนในตาราง) ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่สะอาดและแห้ง

Table 23. Available sample for I.N. determination.

ค่าไอโอดีนที่คาดคะเน	น้ำหนักตัวอย่าง
< 5	3.00
5-20	1.00
21-50	0.4
51-100	0.2
101-150	0.13
151-200	0.1

2. เติมคาร์บอนเตตราคลอไรด์ หรือไซโคลเฮกเซน 15 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายวิจส์ 25 มิลลิลิตร โดยปิเปตและให้ปลายปิเปตจรดข้างขวดด้วยจำนวนครั้งที่แน่นอนและเท่ากันทุกครั้งที่ทำการทดลอง
4. เขย่าขวดและตั้งไว้ในที่มืด 1-2 ชั่วโมง
5. เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ปริมาณ 20 มิลลิลิตร และน้ำต้มใหม่ซึ่งเย็นแล้ว 150 มิลลิลิตร
6. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.1 นอร์มาล เขย่าอย่างสม่ำเสมอขณะไตเตรท จนได้สารละลายสีเหลืองอ่อนเติมน้ำแป้ง 2-3 หยดจะกลายเป็นสีน้ำเงินแล้วไตเตรทต่อไปจนสีน้ำเงินหมดไปก่อนปฏิกิริยาจะสิ้นสุดถึงจุดยุติให้ปิดขวดด้วยจุกย่างเขย่าอย่างแรง เพื่อให้ไอโอดีนที่เหลืออยู่ในชั้นของคาร์บอนเตรตราคลอไรด์ถูกดึงออกมาให้หมด
7. เตรียมแบลงก์โดยวิธีเดียวกัน
8. คำนวณค่าไอโอดีนจากสูตร

$$\text{ค่าไอโอดีน} = \frac{(b-a) \times N \times 12.69}{W}$$

a: ปริมาณโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตรเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b: ปริมาณโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตรเตรทกับแบลงก์ (มิลลิลิตร)

N: ความเข้มข้นของโซเดียมไทโอซัลเฟต (นอร์มอล)

W: น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

หมายเหตุ : ถ้า $b-a < b/2$ ให้ทดลองใหม่โดยใช้ปริมาณตัวอย่างให้น้อยลง

5. การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี Cupric acetate (Cupric acetate method)

1. การทำกราฟมาตรฐานกรดปาล์มิติก

- ชั่งกรดปาล์มิติก (fw = 256.4 g/ mol) 0.2564 กรัม ละลายในไอโซออกเทน (Isooctane) และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายของกรดปาล์มิติกที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
- นำสารละลายกรดปาล์มิติกแอซิดมา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทนให้ได้ 1 มิลลิลิตร
- เติม Cupric acetate-pyridine reagent 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลานาน 15 วินาที จากนั้นจึงทิ้งไว้ให้แยกชั้น
- ดูดสารละลายส่วนในด้านบนมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร (OD_{715}) โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงของไอโซออกเทนเป็นตัวปรับ (blank)

2. การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์

1) เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

2) เติมสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมจะหากิจกรรมปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (กรณีเอนไซม์ตรึงรูปใช้ 1 มิลลิกรัม) และใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม

2) เติมสับสเต่รทคือสารละลายน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 10 ของน้ำหนักต่อปริมาตรของไอโซออกเทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (หลังเติมต้องทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วเนื่องจากเอนไซม์จะเริ่มทำงาน)

3) ทำปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4) หยุดปฏิกิริยาด้วย 6 โมลลาร์(M) ของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที แล้วทิ้งให้แยกชั้น

5) ดูดส่วนใสด้านบนมา 0.1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6) เติมสารละลาย Cupric acetate-pyridine reagent 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสม 15 วินาที นำส่วนใสด้านบนไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร และคำนวนหาปริมาณกรดปาล์มิติกที่เกิดขึ้นโดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานตามสูตร

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรม (U/ml or U/mg)} = \frac{OD715}{slope \times samp. \times 0.1 \times T}$$

slope: ได้จากกราฟมาตรฐานกรดปาล์มมิติก ในที่นี้คือ 0.0979

samp.: ปริมาณตัวอย่างเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ (ในที่นี้คือ 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ หรือ 1 มิลลิกรัม ของเอนไซม์ตรึงรูป)

T: เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในที่นี้คือ 15 นาที

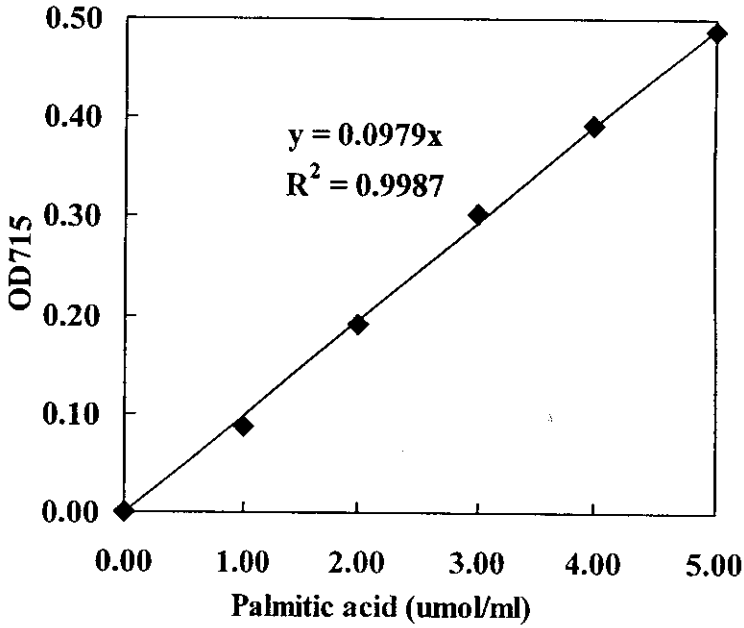
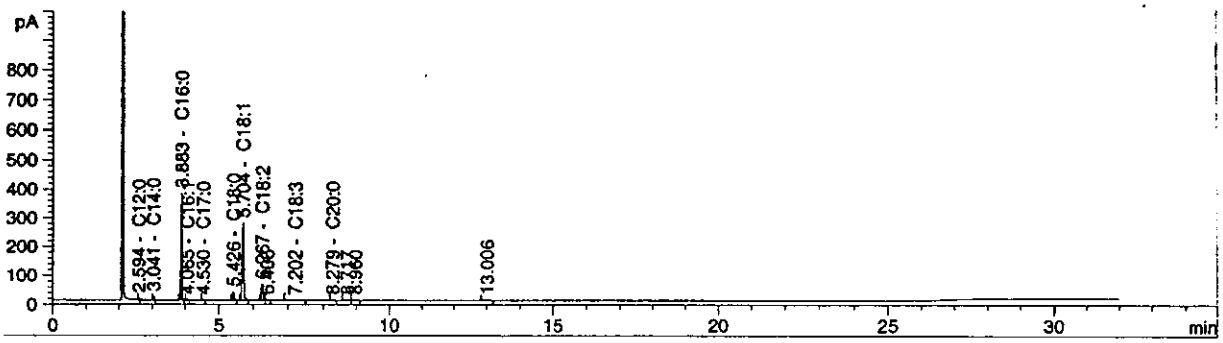


Figure 49. Standard curve of palmitic acid.

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์

1. ผลการวิเคราะห์แก๊สโครมาโตกราฟฟี่ (Gass chromatography) ของน้ำมันปาล์มใช้แล้ว



No.	Sample Name	Time (Min)	Compound Name	% Fatty Acid Methyl Ester
1	Used Palm Oil	2.594	Lauric Acid Methyl Ester (C12:0)	0.56678
		3.041	Myristic Acid Methyl Ester (C14:0)	1.07900
		3.883	Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0)	37.66280
		4.065	Pamitoleic Acid Methyl Ester (C16:1)	0.20916
		4.530	Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0)	0.11193
		5.426	Stearic Acid Methyl Ester (C18:0)	4.26333
		5.704	Oleic Acid Methyl Ester (C18:1)	43.85114
		6.267	Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2)	9.50762
		7.202	Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3)	0.26725
		8.279	Arachidic Acid Methyl Ester (C20:0)	0.37067

Test Instrument: HP 6850 Gas Chomatograph with Flame Photometric Detector

Test Technique: Gas Chromatography

Condition: Inlet temperature: 290 ^{o}C, Detector temperature: 300 ^{o}C

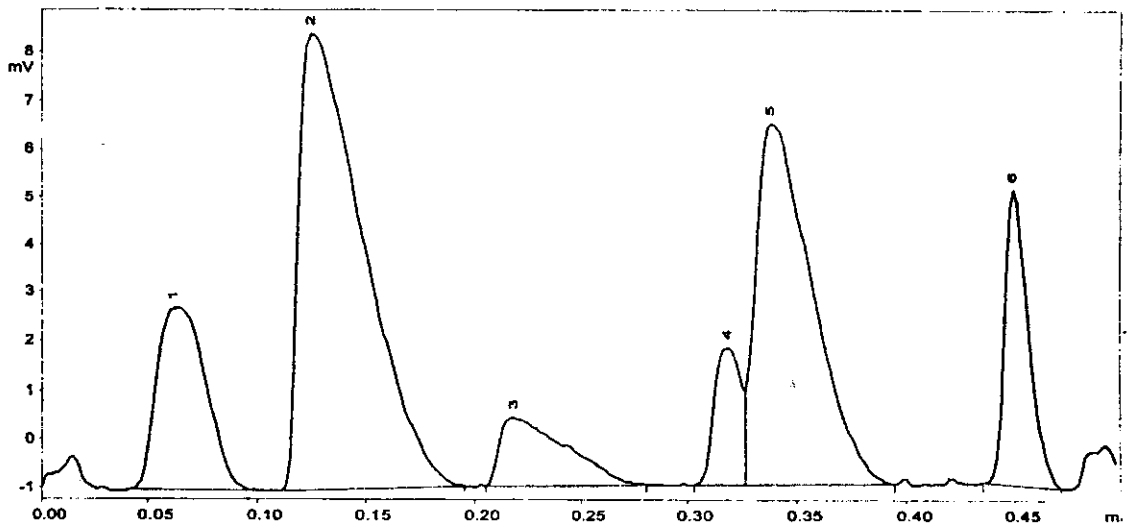
Oven temperature: initial 210 ^{o}C hold 25 minutes

Ramp to 250 ^{o}C at 20 ^{o}C/min, hold 5 minutes

Column: Select Biodiesel for Fame, length 30 m., 320 μm I.D., 0.25 μm film thickness

Figure 50. GC chromatogram of used palm oil fatty acid.

2. ผลการวิเคราะห์ TLC/FID ของไบโอดีเซล



Peak no	Ret. Time (min)	Pk.Start (min)	Pk.End (min)	Area	Height (mV)	Area %
1	0.062	0.042	0.100	2952	3.68	11.670
2	0.125	0.112	0.195	10147	9.38	40.118
3	0.218	0.205	0.282	1615	1.40	6.383
4	0.328	0.303	0.327	1284	2.80	5.078
5	0.338	0.327	0.395	6877	7.43	27.189
6	0.450	0.435	0.472	2418	6.11	9.561
				25294	30.79	100.000

Condition:

Stationary phase: Chromorod –SIII

Mobile phase: n-hexane: diethyl ether: formic acid (50:20:0.3)

Gas flow: H_2 160 mL/min, Air 2 L/min

Scanning speed: 30 s/scan

Figure 51. TLC/FID chromatogram of fatty acid ethyl ester.

Table 24. TLC/FID report.

Peak no	Compound name	% of compound
1	Fatty acid ethyl ester	11.67
2	Triglyceride	40.11
3	Free fatty acid	6.38
4	1,3 Diglyceride	5.08
5	1,2 Diglyceride	27.19
6	Monoglyceride	9.56

ภาคผนวก ค

มาตรฐาน

Table 25. มอก. 288-2535 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันปาล์มสำหรับบริโภค: องค์ประกอบของกรดไขมัน

รายการที่	กรดไขมัน	เกณฑ์ที่กำหนด	
		น้ำมันปาล์มธรรมชาติและน้ำมันปาล์มผ่านกรรมวิธี	น้ำมันปาล์มโอลีนผ่านกรรมวิธี
1	กรดลอริก (lauric acid)	ไม่เกิน 1.2	ไม่เกิน 1.2
2	กรดไมริสติก (myristic acid)	0.5 ถึง 5.9	0.5 ถึง 5.9
3	กรดพาล์มิติก (palmitic acid)	32 ถึง 59	32 ถึง 59
4	กรดปาล์มมิโตเลอิก (palmitoleic acid)	น้อยกว่า 0.6	น้อยกว่า 0.6
5	กรดสเตรียริก (stearic acid)	1.5 ถึง 8.0	1.5 ถึง 6
6	กรดโอเลอิก (oleic acid)	27 ถึง 52	35 ถึง 52
7	กรดไลโนเลอิก (linoleic acid)	5 ถึง 14	10 ถึง 16
8	กรดไลโนเลนิก (linolenic acid)	ไม่เกิน 1.5	ไม่เกิน 1.5
9	กรดอะราชิดิก (arachidic acid)	ไม่เกิน 1.0	ไม่เกิน 1.0

ที่มา: วิภาวรรณ ศรีมุข (2546)

Table 26. มอก. 288-2535 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันปาล์มสำหรับบริโภค: คุณลักษณะทางฟิสิกส์และทางเคมี

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด				วิธีทดสอบ
		น้ำมันปาล์มธรรมชาติ	น้ำมันปาล์มผ่านกรรมวิธี	น้ำมันปาล์มโอเลอีนผ่านกรรมวิธี		
				ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	
1.	ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (relative density) ที่ 50/20 องศาเซลเซียส		0.891 ถึง 0.899			CAC/RM 9
2.	ดัชนีหักเห (refractive index) ที่ n_D 50 องศาเซลเซียส		1.455 ถึง 1.456			IUPAC (1979) ข้อ 2.102
3.	จุดขุ่น องศาเซลเซียส	ไม่กำหนด	ไม่กำหนด	ไม่เกิน 5	ไม่เกิน 10	AOCS Cc 6-25
4.	น้ำและสารที่ระเหยได้ ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ร้อยละโดยน้ำหนักไม่เกิน	0.2	0.2	0.2	0.2	IUPAC (1979) ข้อ 2.601
5.	สิ่งอื่นที่ไม่ละลาย (nonsoluble impurities) ร้อยละโดยน้ำหนักไม่เกิน	0.05	0.05	0.05	0.05	IUPAC (1979) ข้อ 2.204

ที่มา: วิภาวรรณ ศรีมุข (2546)

Table 26. 288-2535 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันปาล์มสำหรับบริโภค: คุณลักษณะทางฟิสิกส์และทางเคมี (ต่อ)

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด				วิธีทดสอบ
		น้ำมันปาล์มธรรมชาติ	น้ำมันปาล์มผ่านกรรมวิธี	น้ำมันปาล์มโอเลอีนผ่านกรรมวิธี		
				ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	
6.	ไอโอดีนแบบวิจส์ (Iodine value, Wijs)	50 ถึง 55	50 ถึง 55	ไม่น้อยกว่า 60	55 ถึง 60	IUPAC (1979) ข้อ 2.205
7.	ค่าซาปอนนิฟิเคชั่น (saponification value) มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อตัวอย่าง 1 กรัม	190 ถึง 209	190 ถึง 209	190 ถึง 209	190 ถึง 209	IUPAC (1979) ข้อ 2.202
8.	สารที่ซาปอนนิไฟด์ไม่ได้ (unsaponifiable matter) กรัมต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม ไม่เกิน	12	12	8	10	IUPAC (1979) ข้อ 2.401
9.	ค่ากรด (acid value) มิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ไม่เกิน	4	0.6	0.6	0.6	IUPAC (1979) ข้อ 2.201
10.	ค่าเพอร์ออกไซด์ (peroxide value) มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม ไม่เกิน	10	10	10	10	IUPAC (1979) ข้อ 2.501
11.	สบู่ ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่เกิน	0	0.005	0.005	0.005	CAC/RM 13
12.	บีตาแคโรทีน (beta carotene) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	500 ถึง 2000	ไม่กำหนด	ไม่กำหนด	ไม่กำหนด	AOAC 1984 ข้อ 43.008- 43.013

ที่มา: วิภาวรรณ ศรีมุข (2546)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวเบญจมาส เชียรศิลป์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Benjamas Cheirsilp

หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
โทรศัพท์ (074) 286374 โทรสาร (074) 446727
E-mail: benjamas.che@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.	วุฒิปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน
2546	Ph.D	Biotechnology Engineering	Osaka University Japan
2542	M.Eng.	Biotechnology Engineering	Osaka University Japan
2540	B.Eng.	Chemical Engineering	Tohoku University Japan

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสาร

Shibasaki-Kitakawa, N., **Cheirsilp, B.**, Iwamura, K., Kushibiki, M., Kitakawa, A. and Yonemoto, T. (1998) Kinetic model for oligosaccharide hydrolysis using suspended and immobilized enzymes. Biochem. Eng. J. 1(3): 201-209.

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2001) Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:639-646.

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2003) Enhanced kefiran production of *Lactobacillus kefiranofaciens* by mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 100(1): 43-53.

Cheirsilp, B., Shoji, H., Shimizu, H. and Shioya, S. (2003) Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture of kefiran production. J. Biosci. Bioeng. 96 (3): 279-284.

Shioya, S., **Cheirsilp, B.**, Egawa, S., Wardani, A.K., Nagahisa, K., Tada, S., Katakura, K. and Shimizu, H. (2004) Production from mixed culture of lactic acid bacteria and yeast. J. Biotechnol. 82(9): 438-439. (Japanese)

Shimizu, H., **Cheirsilp, B.**, and Shioya, S. (2005) Development of co-culture systems of lactic acid bacteria and yeasts for bioproduction. Japanese J. Lactic Acid Bacteria. 16 (1): 2-10.

Cheirsilp, B. (2006) Study on interaction of two microorganisms in mixed culture for kefiran fermentation by model analysis. Thai J. Biotechnol. 7(1): 52-59.

Cheirsilp, B. (2006) Simulation of kefiran production of Lactobacillus kefiranofaciens JCM6985 in fed-batch reactor. Songklanakarin J. Sci. Technol. 28(5): 1059-1069.

Jeamjounkhaw, P., H-Kittikun, A. and **Cheirsilp, B.** (2007) Optimization of lipase entrapment in alginate gel bead for palm olein hydrolysis. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29 (Suppl. 2): 261-267. (Thai)

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2007) Kinetic modeling of kefiran production in mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochem. 42: 570-579.

Cheirsilp, B., Kaewthong, W. and H-Kittikun, A. (2007) Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. Biochem. Eng. J. 35: 71-80.

Cheirsilp, B. and H-Kittikun, A. (2007) A mathematical model approach to a glycerolysis reaction for monoacylglycerol production. WIT Transactions on Modelling and Simulation 46: 225-232.

Yeesang, C., Chanthachum, S. and **Cheirsilp, B.** (2008) Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. World J. Microbiol. Biotechnol. 24(7): 1195-1201.

Cheirsilp, B. and Umsakul, K. (2008) Processing of banana-based wine product using pectinase and α-amylase. J. Food Process Eng. 31: 78-90.

H-Kittikun, A., Kaewthong, W. and **Cheirsilp, B.** (2008) Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized Lipase PS. Biochem. Eng. J. 40: 116-120.

Cheirsilp, B., H-Kittikun, A. and Limkatanyu, S. (2008) Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. Biochem. Eng. J. 42: 261–269.

Kitcha, S., Maneerat, S. and **Cheirsilp, B.** (2008) Cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. C26. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30(6): 723-728.

Cheirsilp, B., Jeamjounkhaw, P. and H-Kittikun, A. (2009) Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. J. Mol. Catal. B: Enzym. 59: 206-211.

ชื่อ (ภาษาไทย) รศ.ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล

(ภาษาอังกฤษ) Asso. Prof. Dr. Aran H-Kittikun

หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
โทรศัพท์ (074) 286363 โทรสาร (074) 446727

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.	วุฒิปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน
2515	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์การอาหาร	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2518	ปริญญาโท	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2527	ปริญญาเอก	เทคโนโลยีชีวภาพ	U. New South Wales ออสเตรเลีย

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวเกษรา ทองบริบูรณ์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Ketsara Tongboriboon

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ผลงานนำเสนอและตีพิมพ์

ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

Tongboriboon, K., H-Kittikun, A. and Cheirsilp, B. 2007. Production of Biodiesel from Used Palm Oil by Immobilized Lipases. TSB2007: The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology; Biotechnology for Gross National Happiness, Thammasat University, Pathumthani, Thailand. O-IV-05 (Oral presentation)

ผลงานตีพิมพ์

Tongboriboon, K., Cheirsilp, B., H-Kittikun, A. (2010) Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. J. Mol. Catal. B: Enzym. 67 (1-2): 52-59.