บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แนวโน้มราคาน้ำมันปิโตรเลียมที่เพิ่มสูงขึ้นและกระแสความต้องการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม จึงเป็นสาเหตุให้มีการค้นคว้าวิจัยในด้านการหาแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซล จึงได้นำไขมันและน้ำมันที่อยู่ในธรรมชาติ หรือน้ำมันที่ใช้แล้วจากกระบวนการทางอุตสาหกรรมมาใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซล การศึกษาน้ำมันพืชแทนเชื้อเพลิงดีเซลมุ่งเน้นการแปลงรูปเป็นเมทิลเอสเทอร์ซึ่งให้คุณสมบัติดีกว่าการใช้น้ำมันพืชโดยตรง เมื่อน้ำมันพืชเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ขนาดโมเลกุลลดลงเหลือ 1 ใน 3 เป็นผลให้ความหนืดน้ำมันลดลงอย่างมากและลดลงใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลเกือบทุกอุณหภูมิ การฉีดให้เป็นละอองเข้าสู่ห้องเผาไหม้จะเผาไหม้ได้ดีกว่าน้ำมันพืช ข้อได้เปรียบของไบโอดีเซลเมื่อเทียบกับน้ำมันดีเซล คือมีความปลอดภัยในการใช้งานและถูกย่อยสลายได้ง่าย ช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับมลพิษทางอากาศและสิ่งแวดล้อมเพราะก๊าซเสียจากการเผาไหม้เครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันดีเซลชีวภาพมีองค์ประกอบของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ เขม่า หรือองค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอน ซึ่งถูกเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ในปริมาณต่ำกว่าเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันดีเซลปิโตรเลียม ปัจจุบันมีการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ยุ่งยากในการเก็บเกี่ยวกลีเซอรอล โพแทสเซียมหรือเกลือโซเดียมและมีการทำปฏิกิริยาที่รุนแรง ดังนั้นจึงมีทางเลือกใหม่โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการคือปฏิกิริยาไม่รุนแรงสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิห้องทำให้ประหยัดพลังงาน ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสมีข้อจำกัดทางด้านราคา ความคงตัวของเอนไซม์ รูปแบบการใช้มีลักษณะไม่ต่อเนื่อง ซึ่งการตรึงเอนไซม์ไลเปสก่อนที่จะนำไปใช้สามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ให้ลดลงได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

ตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมัน (*Elaies guineensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ การเพาะปลูกปาล์มน้ำมันมีมากในจังหวัดภาคใต้ของประเทศ นิยมปลูกกันมากในจังหวัด กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และ ตรัง ผลผลิตของปาล์มน้ำมันจะถูกนำไปแปรรูปเป็นน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี

กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมี 3 วิธี คือกระบวนการผลิตแบบใช้ไอน้ำ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน กระบวนการผลิตแบบย่างผลปาล์มหรือหีบน้ำมันผสม และกระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม ซึ่งจะได้น้ำมันปาล์ม 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ ถ้าได้จากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (palm kernel) เรียกว่าน้ำมันเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) ส่วนที่ได้จาก mesocarp เรียกว่าน้ำมันปาล์ม (palm oil) เมื่อนำน้ำมันปาล์มไปแยกส่วนและทำให้บริสุทธิ์จะได้ส่วนของของเหลว ที่เรียกว่าน้ำมันปาล์มโอเลอีน (palm olein) ซึ่งเป็นน้ำมันปาล์มที่ใช้กันทั่วไป และได้ส่วนของแข็งที่เรียกว่า ปาล์มสเตียริน (palm stearin)

น้ำมันปาล์มมีส่วนประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน พื้นดินบริเวณเพาะปลูกและภูมิอากาศ น้ำมันเมล็ดปาล์มและน้ำมันปาล์มมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 เช่น น้ำมันจากเมล็ดปาล์มมีเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิ่มตัวสูง (78.82%) ในขณะที่น้ำมันปาล์มมีเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ 48.05 และ 51.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. เอซิลกลีเซอรอล

เอซิลกลีเซอรอลหรือไขมันเป็นกลางเป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับแอลกอฮอล์กลีเซอรอลดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อพบได้ทั่วไปในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เอซิลกลีเซอรอลแบ่งออกเป็น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และ โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol)

2.1 ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์

ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์เป็นเอซิลกลีเซอรอลที่พบมากที่สุดประกอบด้วยกรดไขมันที่มีพันธะเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสามหมู่ของกลีเซอรอล ถ้าเป็นกรดไขมันชนิด

เดียวกันเรียกไตรเอซิลกลีเซอรอลธรรมดา (simple triacylglycerol) เช่น ไตรปาลมิโตอิลกลีเซอรอล (tripalmitoyl glycerol) แต่โดยทั่วไปจะประกอบด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เรียกว่า ไตรเอซิลกลีเซอรอลผสม (mixed triacylglycerol) เช่น 1-ปาล์มมิโตอิลไดสเตียโรอิลกลีเซอรอล (1-palmitoyl distearoyl glycerol) (อาภัสสรา ชมิดท์,2537) ในน้ำมันปาล์มมีโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว 2 ตำแหน่งมากที่สุดร้อยละ 48 รองลงมา คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว 2 ตำแหน่งร้อยละ 34.6 ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลมีผลโดยตรงกับการตกผลึกของน้ำมัน

2.2 โมโน และ ไดเอซิลกลีเซอรอล

โมโน และไดเอซิลกลีเซอรอลเป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันเพียงหนึ่งและสองโมเลกุล ตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ เอซิลกลีเซอรอลทั้งสองชนิดนี้ไม่ค่อยพบมากในธรรมชาติ แต่จะพบในไขมันที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสที่ไม่สมบูรณ์ โดยจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการสังเคราะห์หรือดัดแปลงโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหรือนำโมโนเอซิลกลีเซอรอลใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยาและเครื่องสำอาง ชนิดต่างๆ (Rosu *et al.*, 1997)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของน้ำมันปาล์ม

Table 1 Properties of palm oil

	Palm kernel oil	Palm oil
Iodine Value	14-20	43-59
Acid Value	20	15
Saponification Value	240-257	195-210
Unsponification 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)

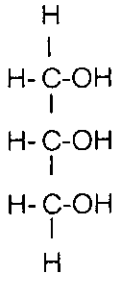
C-atom positions

1 หรือ α

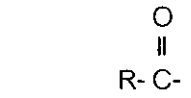
2 หรือ β

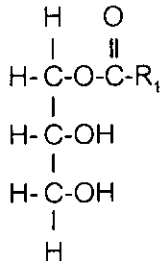
3 หรือ α'

Acyl group

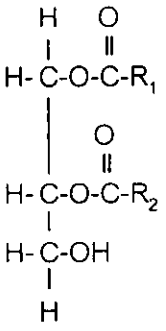


Glycerol

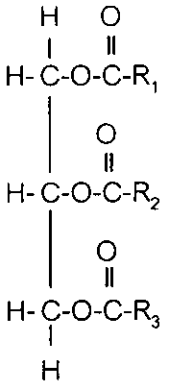




1-Monoacylglycerol



1,2- Diacylglycerol



Triacylglycerol

ภาพที่ 1 โครงสร้างของเอซิลกลีเซอรอล

Table 1 Structure of acylglycerol

ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2537)

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดของการเรียงตัวของกรดไขมันในโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันปาล์มตามคุณสมบัติความอิ่มตัว

Table 2 Classification of fatty acid arrangement in triacylglycerol structure of palm oil by saturation properties

Triglyceride Type	Composition (%)
Trisaturated (GS_3)	10.2
Disaturated (GS_2U)	48.0
Monosaturated (GSU_2)	34.6
Triunsaturated (GU_3)	6.8

Source : Hui (1996)

3. **กรดไขมัน** (Fatty acid)

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอน 4-24 อะตอม ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิลปลายอีกข้างมีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวของนอนโพลาร์ไฮโดรคาร์บอน ไฮโดรคาร์บอนทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ ในธรรมชาติกรดไขมันมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ และเป็นโซ่ยาวที่อิ่มตัว (ไม่มีพันธะคู่) หรือไม่อิ่มตัว (มีพันธะคู่) หรือมีพันธะสาม (triple bond) 1 คู่หรือมากกว่า กรดไขมันแต่ละชนิดมีความยาวของสายโซ่ จำนวนและตำแหน่งของพันธะไม่อิ่มตัวแตกต่างกัน กรดไขมันที่พบในเซลล์พืชหรือสัตว์จะไม่พบในรูปอิสระแต่จะอยู่รวมกันเป็นลิปิดด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งถูกย่อยสลายได้โดยการใช้เอนไซม์หรือสารเคมี

กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูงจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ อยู่ระหว่าง 14-22 อะตอม โดยเฉพาะ C16 และ C18 พบมากที่สุด และถ้าหากมีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ก็จะเป็นแบบนอนคอนจูเกต (-CH=CH-CH2-CH=CH-) โดยมีคอนฟิกุเรชันแบบซีส กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ (C16-C18) ละลายน้ำไม่ได้แต่เกลือของมันสามารถสร้างไมเซลล์ในน้ำได้และไมเซลสามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

4. **ไบโอดีเซล**

ไบโอดีเซล คือ น้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์แปลงรูปเป็นแอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ซึ่งได้จากกระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ระหว่างสารตั้งต้นไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นๆ

ไบโอดีเซลโดยทั่วไปมีองค์ประกอบที่มีลักษณะโมเลกุลใกล้เคียงกับน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลปิโตรเลียม ซึ่งสามารถผลิตและพัฒนาได้จากไขมันและน้ำมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์ แต่โดยส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งเน้นไปที่เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้จากปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ โดยใช้ไตรกลีเซอไรด์ในไขมันและน้ำมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์กับเมทานอลมากที่สุด (Krawczyk, 1996)

การนำน้ำมันพืชมาใช้แทนน้ำมันดีเซลมีหลายวิธี คือ

1. **การใช้น้ำมันพืชเสมือนเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลโดยตรง**

การใช้ไขมันและน้ำมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์เป็นแหล่งทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลโดยตรง มักจะใช้น้ำมันพืชเท่านั้นเนื่องจากมีคุณสมบัติที่สัมพันธ์กับการเป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่ดี และเหมาะสมกว่าไขมันสัตว์ มีประสิทธิภาพการใช้งานทดแทนสูงกว่า นอกจากนี้แล้วไขมันสัตว์มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า และมีลักษณะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญในการนำมาใช้เสมือนเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลเพราะทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมไขมันสัตว์สำหรับการใช้งานโดยตรง (Ma and Hanna, 1999)

2. **การเจือจางหรือการผสมตามส่วน**

การเจือจางหรือการผสมตามสัดส่วนของน้ำมันพืชสามารถนำมาละลายเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ในวัตถุเหลวบางชนิดเท่านั้น เช่น น้ำมันเชื้อเพลิงดีเซล ตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอนและแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นๆ Ziejewski และคณะ (1983) ศึกษาเกี่ยวกับการเจือจางของน้ำมันดอกทานตะวันโดยใช้น้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลเป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร และผ่านการทดสอบโดยใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้สำเร็จ แต่สารผสมนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลประเภท direct injection ในช่วงระยะเวลายาวเพราะว่าเกิดปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโค๊กที่ปลายของระบบหัวฉีดอย่างรุนแรง

3. **วิธีไมโครอิมัลชั่น**

ไมโครอิมัลชั่นเป็นกระบวนการที่ทำให้ของเหลวมีสารแขวนลอยกระจายตัวอยู่ เช่นการผสมน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ซึ่งจะมีสภาพเป็นอิมัลชันและเมื่อนำไปใช้สามารถฉีดให้เป็นฝอยได้ (Ma and Hanna, 1999)

4. **วิธีการแตกตัวด้วยความร้อน**

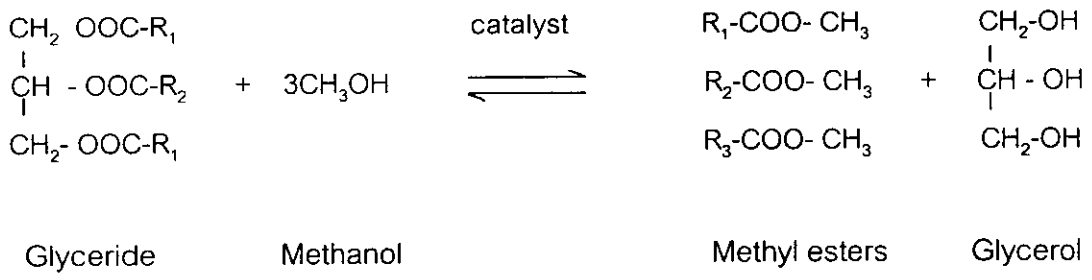
วิธีการแตกตัวด้วยความร้อนเป็นการให้ความร้อนกับน้ำมันพืชในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อให้น้ำมันแตกตัวเป็นโมเลกุลที่เล็กลงให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมหรือใกล้เคียงสำหรับการนำมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลซึ่งการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างเนื่องจากความร้อนของไตรกลีเซอไรด์จะให้สารประกอบเคมีอินทรีย์หลายประเภท เช่น แอลเคน แอลคีน แอลคาไดอีน แอโรมาติก และกรดคาร์บอกซิลิก เป็นต้น (Ma and Hanna, 1999)

5. **วิธีการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์**

กระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์บางครั้งนิยมเรียกว่าแอลกอฮอไลซิส หมายถึงปฏิกิริยาเคมีระหว่างไตรกลีเซอไรด์ในไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์เพื่อก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์แอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล กระบวนการนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อการปรับปรุงคุณภาพทางเชื้อเพลิงที่พัฒนาจากไตรกลีเซอไรด์ให้ดีขึ้นโดยเฉพาะลดค่าความหนืดของเชื้อเพลิงลง

ในกระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ส่วนใหญ่จะใช้แอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นในการทำปฏิกิริยาโดยเฉพาะเมทานอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่มีข้อได้เปรียบในเชิงพาณิชย์สูง เช่น

- มีราคาถูก
- มีคุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีที่เหมาะสม คือ เป็นแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นที่สุดและเป็นของเหลวมีขั้วสูง ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้มากที่สุด



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเมทานอล

Figure 2 Tranesterification of triglycerides with methanol

Source : Ma และ Hanna(1999)

โดยทางทฤษฎีแล้วสมดุลมวลสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ที่สมบูรณ์ ต้องประกอบด้วยอัตราส่วนโมลของสารตั้งต้น 3 ต่อ 1 ระหว่างแอลกอฮอล์ต่อกลีเซอไรด์ แต่ในทางปฏิบัติพบว่าปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์สามารถผันกลับได้ ดังนั้นถ้าต้องการผลิตภัณฑ์แอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน หรือน้ำมันดีเซลชีวภาพมากขึ้นต้องเพิ่มจำนวนโมลแอลกอฮอล์มากขึ้นด้วย เพื่อขับดันให้สภาวะสมดุลเลื่อนเข้าใกล้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด ปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์สามารถเพิ่มอัตราเร็วด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาหลายชนิด เช่น เบส กรด หรือเอนไซม์ก็ได้ (Ma and Hanna, 1999)

คุณสมบัติของเอสเทอร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3 โดยทำการเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล No.2

ตารางที่ 3 คุณสมบัติแอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้จากน้ำมันพืชต่างชนิดกันเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล

Table 3 Properties of alcyl esters from vegetable oil

Ester	Cetane number	Heating Value (KJ/Kg)	Viscosity (mPa.s)	Clound Point (°C)	Pour Point (°C)	Flash Point (°C)
Diesel fuel No.2	47	45343	2.30 (38°C)	-15	-33	52
Biodiesel Methyl						
Cottonseed	51.2	-	6.8 (21°C)	-	-4	110
Rapeseed	54.4	40449	6.7(40°C)	-2	-9	84
Safflower	49.8	40060	-	-	-6	180
Soybean	46.2	39800	4.08(40°C)	2	-1	171
Sunflower	46.2	39800	4.22(40°C)	0	-4	-
Tallow		39949	4.11(40°C)	12	9	96
Ethyl						
Palm	56.2	39070	4.50(37.8°C)	8	6	164
Soybean	48.2	40000	4.41(40°C)	1	-4	174
Tallow	-	-	-	15	12	-
Propyl						
Tallow	-	-	-	17	12	-
Isopropyl						
Soybean	52.6	-	-	-9	-12	185
Tallow	-	-	-	-8	0	-

ที่มา : กัญจนา บุณยเกียรติ (2544)

ความแตกต่างของคุณสมบัติไบโอดีเซลแต่ละชนิดขึ้นกับองค์ประกอบของน้ำมันที่นำมาทำปฏิกิริยา ซึ่งน้ำมันแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบที่เป็นกรดไขมันแตกต่างกัน และมีปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดไม่เท่ากัน โดยน้ำมันที่มีกรดไขมันชนิดอิ่มตัวสูงจะให้ค่าซีเทน (ตัวเลขแสดงคุณสมบัติการจุดระเบิดของน้ำมันภายใต้สภาวะมาตรฐาน) ของไบโอดีเซลสูงกว่ากรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของเอสเทอร์ที่ได้จากกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว

Table 4 Properties of esters from saturated fatty acid and unsaturated fatty acid

Fatty acid ester (No. carbon atom: No. double bond	Mol.wt	Melting Point (°C)	Boiling Point (°C)	Cetane No.	Heating value (Kj/Kg)
Methyl caprylate (8:0)	158.24	-	193	33.6	34716
Methyl caprate (10:0)	186.30	-	224	47.7	36495
Methyl laurate (12:0)	214.30	5	266	61.4	37877
Methyl myristate (14:0)	242.41	18.5	295	66.2	38904
Methyl palmitate (16:0)	270.46	30.5	415	74.5	39448
Methyl stearate (18:0)	298.51	39.1	442	86.9	40072
Methyl oleate (18:1)	296.49	-20	218.5	47.2	39908
Methyl linoleate (18:2)	294.48	-35	215	28.5	39697
Methyl linolenate (18:3)	292.46	-57	109	20.6	39342
Methyl erucate (22:1)	352.60	-	221	76	40496

ที่มา : กัญจนา บุณยเกียรติ (2544)

ข้อได้เปรียบของไบโอดีเซล เมื่อเทียบกับน้ำมันดีเซล (Nelson *et al.*, 1996)

- มีความปลอดภัยในการจัดเก็บเพราะไม่เป็นพิษและสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้
- ผลิตได้จากวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตร หรือน้ำมันที่ใช้แล้วจากกระบวนการอุตสาหกรรม
- ช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับมลพิษทางอากาศและสิ่งแวดล้อม เพราะก๊าซเสียที่ได้จากการเผาไหม้เครื่องยนต์ซึ่งใช้น้ำมันไบโอดีเซลชีวภาพ จะมีองค์ประกอบของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ คาร์บอนมอนนอกไซด์ เขม่า หรือองค์ประกอบของไฮโดรคาร์บอนซึ่งถูกเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ ในปริมาณที่ต่ำกว่าเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันดีเซลปิโตรเลียม

5. การผลิตแอลคิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์สามารถเพิ่มอัตราเร็วด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิด ดังนี้

1. เบส
2. กรด
3. เอนไซม์

การผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดดังนี้ มีการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และมีความยุ่งยากในการเก็บเกี่ยวกลีเซอรอล ปัจจุบันมีการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการคือปฏิกิริยาไม่รุนแรงสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ง่ายในการเก็บเกี่ยวกลีเซอรอลแต่การผลิตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสต้องใช้ต้นทุนสูง (ตารางที่ 5) แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสและเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 3

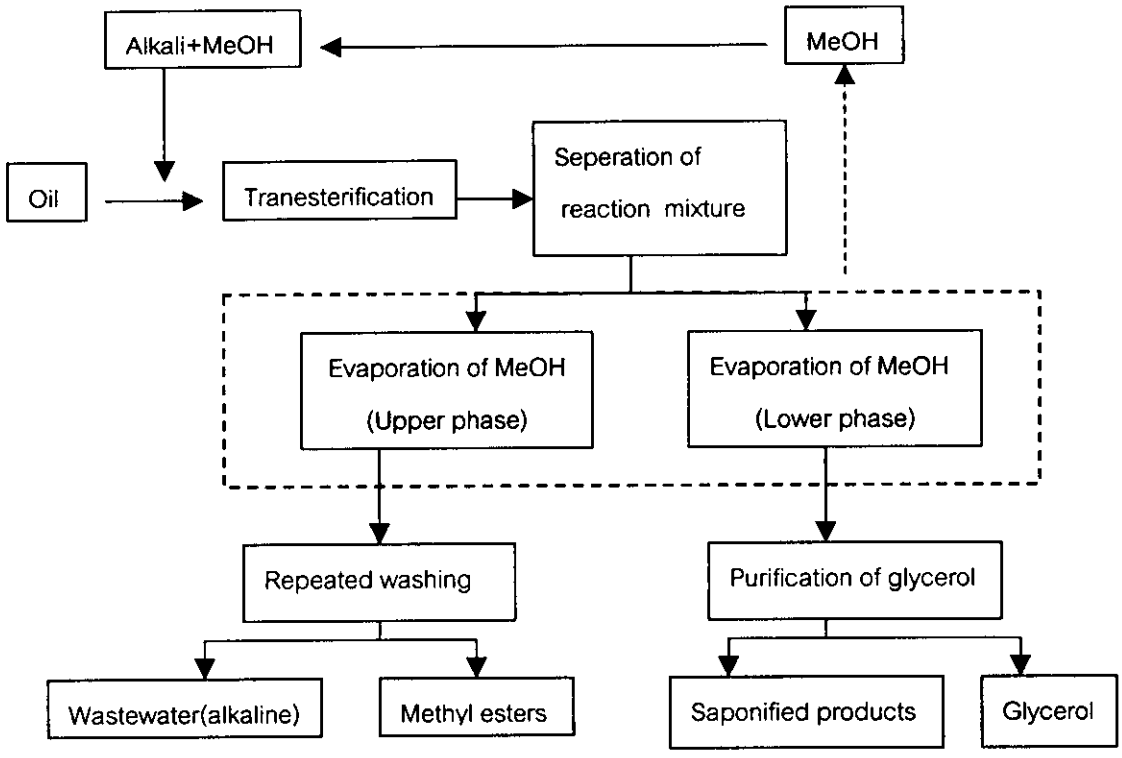
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสและอัลคาไลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Table 5 Comparison between alkali-catalysis and lipase-catalysis methods for biodiesel fuel production

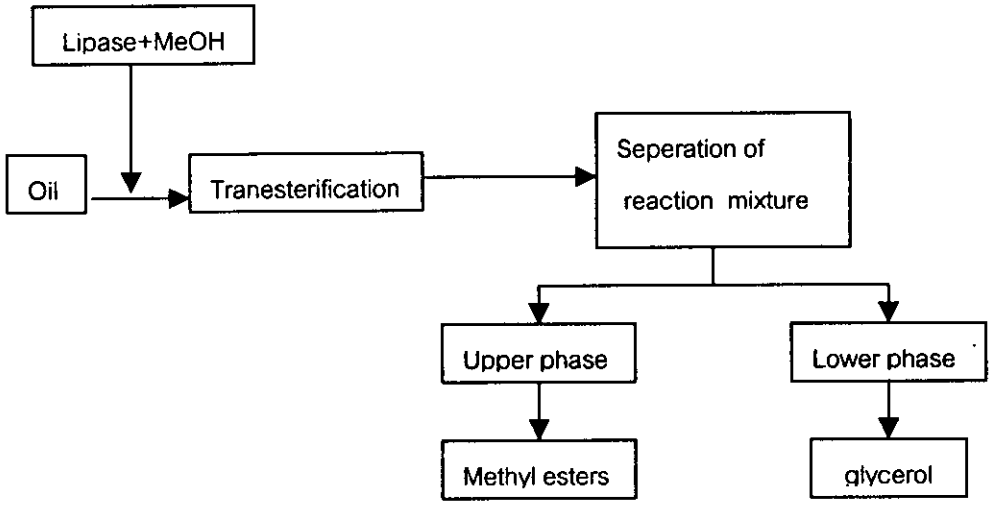
	Alkali-catalysis process	Lipase-catalysis process
Reaction temperature	60-70°C	30-40°C
Free fatty acids in raw materials	Saponified products	Methyl esters
Water in raw materials	Interference with the reaction	No influence
Yield of methyl esters	Normal	Higher
Recovery of glycerol	Difficult	Easy
Purification of methyl esters	Repeated washing	None
Production cost of catalyst	Cheap	Relatively expensive

Source : Fukuda *et al.* (2001)

(a)



(b)



ภาพที่ 3 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้อัลคาไล (a) และ ไลเปส (b) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Figure 3 Flow diagrams comparing biodiesel production using the alkali (a) and lipase-catalysis (b) processes

Source : Fukuda *et al.* (2001)

มีการศึกษาค้นคว้าและทำวิจัยการผลิตแอลคิลเอสเทอร์ด้วยกระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปได้ทั้งในระบบที่มีน้ำและไม่มีน้ำผสมอยู่ กลไกของปฏิกิริยาเป็นไปตามทฤษฎีจลนพลศาสตร์ของ Michaelis Menten และกลศาตร์การทำงานของเอนไซม์อธิบายตามลักษณะกลไกแบบ Ping-Pong Bi-Bi (Mittelbach, 1990; Linko *et al.*, 1994)

Dossat และคณะ (2002) ศึกษาปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ของน้ำมันดอกทานตะวันโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปใน n-hexane ใช้แบบจำลองแบบ Ping Pong Bi Bi เพื่ออธิบายจลศาสตร์ของปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ พบว่าเมื่อใช้สับสเตรทระหว่างน้ำมันกับบิวทานอลอัตราส่วน 1:3 จะให้ปริมาณเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์

Kose และคณะ (2002) ศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิสของน้ำมันเมล็ดฝ้ายโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica* สภาวะที่เหมาะสมในการทดลองคือ ความเข้มข้นเอนไซม์ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักน้ำมัน อัตราส่วนระหว่างน้ำมันและแอลกอฮอล์เท่ากับ 1 ต่อ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 91.5 เปอร์เซ็นต์

Linko และคณะ (1998) ศึกษาปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์เพื่อผลิตเอสเทอร์และโพลีเอสเทอร์โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยใช้น้ำมันเรพสีด และ 2-ethyl-1-hexanol เป็นสับสเตรท พบว่าน้ำมันสามารถเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ได้ 97 เปอร์เซ็นต์

3.1 **เอนไซม์ไลเปส** (Lipase)

เอนไซม์ไลเปส (EC. 3.1.1.3, glycerol ester hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายชนิด เช่น ปฏิกิริยาการย่อยสลาย การเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (acidolysis, alcoholysis, ester-exchange และ aminolysis) และการสังเคราะห์เอสเทอร์ เป็นต้น

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธ์ซึ่งอาจจะผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายในและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ไลเปสที่ได้จากพืชได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์และข้าวบาร์เลย์ ไลเปสจากสัตว์จะพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรัม สำหรับไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้มากเนื่องจากมีความเข้มข้น

สูงและสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยโดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าได้หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4 จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugosa* สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่นิยมผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphylococcus*

ตารางที่ 6 ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตทางการค้า

Table 6 Type of commercial 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 antarctica* A		Boehring Mannheim, Novo Nordisk
CAL-B	*Candida antarctica* B		Boehring Mannheim, Sigma, Novo Nordisk
CLL	*Candida lipolytica*		Amano
GCL	*Geotrichum candidum*		

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Table 6 (Continued)

Type	Source	Another name	Company
HLL	*Humicola lanuginosa*	Thermomyces l.	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 lipases		
PCL	*Pseudomonas cepacia*	*Burkholderia cepacia*	Altus Biologics, Amano, Boehringer Mannheim, Fluka, Sigma
PCL-AH	*Pseudomonas cepacia*		Amano
PFL	*Pseudomonas fluorescens*		Amano, Biocatalysts Ltd.
PfragiL	*Pseudomonas fragi*		Wako Pue Chemical
CVL	*Chromobacterium viscosum*		Sigma, Genzyme, Asahi Chemical, Biocatalysts Ltd., Amano
	Pseudomonas sp.	*Pseudomonas glumae*	
BTL2	*Bacillus thermocatenulatas*		Boehringer Mannheim
	Alcaligenes species		Meito Sangyo

Source : Kazlauskas and Bornscheuer (1997)

3.1.1 การแบ่งกลุ่มไลเปสทางการค้า

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้าตามแหล่งของจุลินทรีย์บางครั้งพบว่าไลเปสบางชนิดมีโครงสร้างที่เหมือนกัน ดังนั้น Kazlauskas และ Bornscheuer (1997) เสนอว่าวิธีการที่ง่ายที่สุดในการแบ่งกลุ่มคือการแบ่งตามการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในโครงสร้างโปรตีนของไลเปส ซึ่งมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังตารางที่ 7 คือ ไลเปสจากสัตว์ ไลเปสจากยีสต์ ราและไลเปสจากแบคทีเรีย สำหรับไลเปสจากยีสต์และราแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม *Candida rugosa* และกลุ่ม *Rhizomucor* ส่วนไลเปสจากแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มของ *Pseudomonas* และกลุ่ม *Staphylococcus* ไลเปสในกลุ่ม *Candida rugosa* (CRL), *Geotricum candidum* (GCL) และ pancreatic cholesterol esterase (CE) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลใหญ่ (59-65 KD) แต่ *Candida* lipase B มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (30-35 KD) ดังนั้นจึงไม่ได้จัดไว้ในกลุ่มนี้แม้ว่าจะเป็นไลเปสที่ได้จากยีสต์ *Candida* ก็ตาม

ไลเปสในกลุ่ม *Rhizomucor* เป็นไลเปสที่ได้จากราหลายชนิดได้แก่ *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Penicillium camembertii* (PcamL), *Humicola lanuginosa* (HLL) และ *Candida antarctica* B (CAL-B) สำหรับในกลุ่ม *Pseudomonas* เป็นไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* ทุกตัวรวมทั้งไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum*

ไลเปสบางตัวยังไม่ได้แบ่งกลุ่ม เนื่องจากยังไม่ทราบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน ได้แก่ ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus niger* (ANL) สำหรับไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* A (CAL-A) แม้ทราบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนแต่มีลักษณะที่เหมือนกับไลเปสในแต่ละกลุ่มน้อยมากจึงจัดไว้ในกลุ่มนี้ (Hoegh *et al.*, 1995)

ตารางที่ 7 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า

Table 7 Type of commercial lipases

Source	Molecular weight	Abbreviation
Mammalian lipase	50kD	PPL
Fungal lipase		
Candida rugosa	59-65 kD	CRL, GCL, CE
Rhizomucor	29-42 kD	CAL-B, RML, ROL, PcamL, HLL
Bacterial lipases		
Pseudomonas	30-35 kD	PCL, PFL, CVL
Staphyloccocus	68-73 kD	BTL2
None specificity		ANL, CAL-A, CLL

Source : Kazlauskas and Bornscheuer (1997)

3.1.2 คุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของไลเปส

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Kwon *et al.*, 1996) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 8-9) แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท ปริมาณเกลือและชนิดของสารอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Malcata *et al.*, 1992) ส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีช่วงพีเอชเป็นกรดพบมากในไลโซโซมในส่วนเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.6 ถึง 8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Yamane, 1987) โดยเฉพาะไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส (Gibert,1993) ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับสับสเตรท เป็นไปได้ว่าสับสเตรททำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Malcata *et. al.*,1992)

3.1.3 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

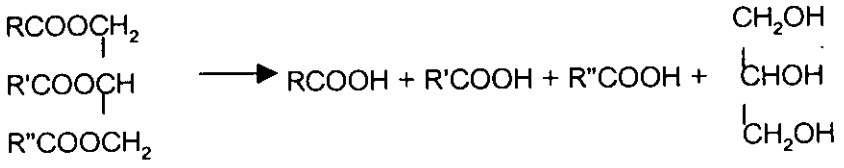
Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์พวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นอินเตอร์มีเดียทในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

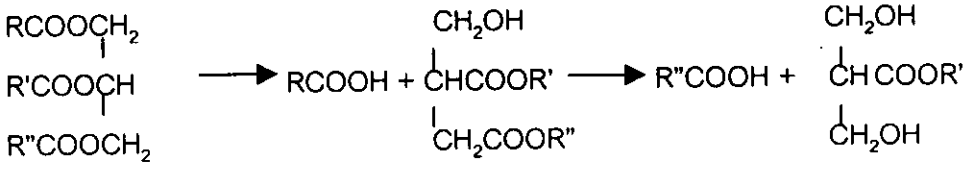
กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1, 2 (2, 3) ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ (1, 2), (2, 3) - โมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารประกอบชนิดไม่คงตัว ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานจะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสที่อยู่กลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* แลในพวก *Rhizopus* อีกหลาย species

กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางพวก เช่น จาก *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มี double bond ตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี (ภาพที่ 4)

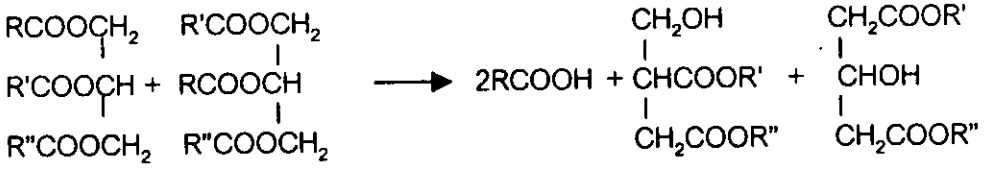
1. **เอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์**



2. **เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์**



3. **เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์**



ภาพที่ 4 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะ

Figure 4 Classification of lipase according to specificity

Source : Macrae (1983)

Central Library
Prince of Songkla University

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ การย่อยสลาย (hydrolysis) การสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis of ester) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) (ภาพที่ 5)

1. Hydrolysis of ester

$$R\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R' + H_2O \longrightarrow R\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}OH + HO\text{-}R'$$

2. Synthesis of ester

$$R\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}OH + HO\text{-}R' \longrightarrow R\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R' + H_2O$$

3. Tranesterification

3.1 Acidolysis

$$R\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R' + R_2\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}OH \longrightarrow R_2\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R' + R_1\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}OH$$

3.2 Alcoholysis

$$R\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R' + HO\text{-}R_2' \longrightarrow R\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R_2 + HO\text{-}R_1'$$

3.3 Ester Exchange (Interesterification)

$$R1\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R'_1 + R_2\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R'_2 \longrightarrow R_1\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R'_2 + R_2\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R_1'$$

3.4 Aminolysis

$$R\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R'_1 + H_2N\text{-}R'_2 \longrightarrow R_1\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R_2' + R_2\text{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}R_1'$$

ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

Figure 5 Lipase catalyzed reactions

Source : Yamane (1987)

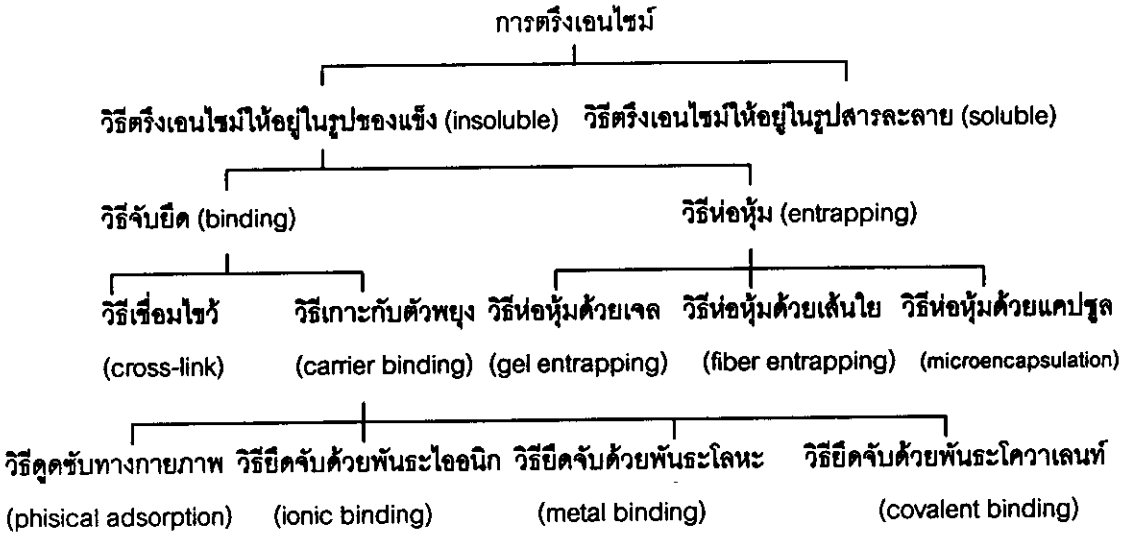
ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระ

1. ราคาแพง
2. เอนไซม์อิสระไม่เสถียร
3. เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ได้เพียงครั้งเดียว
4. เอนไซม์อิสระถ้าจะให้มีกิจกรรมสูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้งาน
5. การแยกเอนไซม์อิสระออกจากผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก

ดังนั้นจึงมีการตรึงเอนไซม์ไลเปสก่อนที่จะนำไปใช้ซึ่งสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ให้ลดลงได้

5.2 การตรึงเอนไซม์

เอนไซม์ที่ถูกตรึง หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกทำให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัดโดยเอนไซม์นั้นยังคงมีกิจกรรมอยู่ สามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้งและยังนำไปใช้ยังระบบต่อเนื่อง การจัดแบ่งเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีหลายแบบ โดยวิธีของ Kennedy และ Cabral (1987) ภาพที่ 6



ภาพที่ 6 วิธีตรึงเอนไซม์

Figure 6 Methods of enzyme immobilization

Source : Kennedy และ Cabral (1987)

การตรึงเอนไซม์แบบวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical-Adsorption Method)

การตรึงด้วยวิธีนี้พันธะที่ใช้จะเป็นพันธะไฮโดรเจน แรงวาลล์เดอวาลล์ และ hydrophobic interaction ซึ่งเป็นแรงยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับผิวของตัวพยุงที่เป็นของแข็ง การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำได้โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวพยุงที่ใช้ตรึง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทิ้งไว้เพื่อให้มีการจับกัน จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกด้วยการเหวี่ยงหรือการกรอง ความสามารถในการดูดซับเอนไซม์บนตัวพยุงขึ้นอยู่กับพีเอช ธรรมชาติของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของอิออนในสารละลาย ความเข้มข้นของเอนไซม์กับพาหะ และอุณหภูมิที่ใช้ นอกจากนี้ต้องอาศัยธรรมชาติของเอนไซม์และตัวพยุง เช่น พื้นที่ผิวของตัวพยุง อัตราส่วนของหมู่ที่ชอบน้ำและหมู่ที่ไม่ชอบน้ำซึ่งมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกจับบนตัวพยุงและกิจกรรมของเอนไซม์หลังถูกจับ การควบคุมสภาวะต่างๆ เหล่านี้ให้เหมาะสมจะช่วยให้มีการตรึงเอนไซม์ได้ดี และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงยังคงมีอยู่สูง ปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนตัวพยุง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สัมผัสกับหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวของตัวพยุง กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ จนถึงจุดอิ่มตัวถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์อีกก็ไม่ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงเพิ่มขึ้น

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลเอนไซม์หรือบริเวณเร่งน้อยมาก

ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

1. มีโอกาสเพิ่มกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์
2. สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง
3. นำไปใช้กับระบบต่อเนื่องได้

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

6.1 ชนิดน้ำมันพืช

Kamini และคณะ (2000) ศึกษาชนิดของน้ำมันพืชต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่าง น้ำมันมะกอก น้ำมันเรพสีด น้ำมันรำข้าว และน้ำมันถั่วเหลืองต่อเมทานอลอัตราส่วน 1:1 (โมล/โมล) 10 กรัม โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus spp. S-2* 500 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ

24 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 96 ชั่วโมงเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้น้ำมันรำข้าวเป็นสับสเตรทสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ 24.9 เปอร์เซ็นต์

6.2 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส

Shimada และคณะ (1999) คัดเลือกชนิดเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเมทธาโนไลซิสของน้ำมันพืชจะคัดเลือกจากเอนไซม์ 5 ชนิด คือ เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei Candida antarctica Rhizopus delemar Fusarium heterosporum* และ *Aspergillus niger* 0.4 กรัม ทำปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันพืช (น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันเรพสีด) ต่อ เมทานอล อัตราส่วน 1:1 (โมล/โมล) 10 กรัม เติมน้ำในปฏิกิริยาเริ่มต้น 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica* สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ตรึงรูปทั้งหมดที่นำมาคัดเลือก

Kaieda และคณะ(1999) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสอิสระต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อเมทานอล อัตราส่วน 1:1 (โมล/โมล) 10 กรัม ใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* 1.05, 4.16, 15.8, 25.9, 71.3 และ 179.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งคือ 60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ก็จะคงที่ ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสม คือ 60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Kamini และคณะ (2000) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล อัตราส่วน 1:1 (โมล/โมล) 10 กรัม โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus spp. S-2* ปริมาณ 500, 1000, 1500, 2000 และ 2500 ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส 500-2000 ยูนิต เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มากกว่า 2000 ยูนิต เปอร์เซ็นต์ผลผลิตจะคงที่

6.3 ปริมาณน้ำ

Shimada และคณะ (1999) ศึกษาผลของน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica* 0.4 กรัม ทำปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรท 10 กรัม เติมน้ำในปฏิกิริยา 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเติมน้ำปริมาณมากขึ้นค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตลดลง

Kaieda และคณะ (1999) ศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่าง น้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล อัตราส่วน 1:1 (โมล/โมล) 10 กรัม โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* 210 ยูนิตเติมน้ำให้ได้สารละลายเอนไซม์ 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.4, 3.0, 6.0 และ 9.0 มิลลิลิตร พบว่าที่เวลาเมื่อใช้สารละลายเอนไซม์ 1.2-9.0 มิลลิลิตร (ปริมาณน้ำ 4-30% ของน้ำหนักสับสเตรท) สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มสูงขึ้นถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์

Kamini และคณะ (2000) ศึกษาผลของน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus spp.* ใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล อัตราส่วน 1:4 (โมล/โมล) และใช้ปริมาณน้ำ 20-200 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท บ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำ 80-100 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 62.6-66.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ การผลิตเมทิลเอสเทอร์ลดลง

6.4 ปริมาณเมทานอล

Kaieda และคณะ (1999) ศึกษาผลของการเติมเมทานอลต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล อัตราส่วน 1:1 (โมล/โมล) 30 กรัม โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* 180 ยูนิต พบว่าเมื่อเติมเมทานอลครั้งละ 1 โมล อีกสองครั้งหลังจากเติมสับสเตรทเริ่มต้นสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้นและปริมาณกรดไขมันที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายลดลง

Kamini และคณะ(2000) ศึกษาผลของเมทธานอลต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันรำข้าวโดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทธานอล อัตราส่วน 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 (โมล/โมล) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus* spp. 2000 ยูนิต และ

ใช้ปริมาณน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท พบว่าที่เวลา 120 ชั่วโมง เมื่อใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล อัตราส่วน 1:4 (โมล/โมล) สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 79.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้สับสเตรทที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล อัตราส่วน 1:6 โมล/โมล จะผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ต่ำเนื่องจากปริมาณเมทานอลสูงเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพ

6.5 อุณหภูมิ

Kamini และคณะ (2000) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันรำข้าวโดยเอนไซม์ไลเปส โดยทดลองที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และที่เวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 62.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 30 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง

Shimada และคณะ (1999) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันพืชโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ศึกษาที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากปฏิกิริยาดำเนินไป 6 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตจะเพิ่มขึ้นและเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 29.9 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง

6.6 ชนิดตัวทำละลายอินทรีย์

Kamini และคณะ (2000) ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสจากน้ำมันรำข้าวโดยเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ dimethylsulfoxide, diethylether, n-hexane และ petroleum ether เติมลงไป 10 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักสับสเตรท พบว่าที่เวลา 120 ชั่วโมง เมื่อเติม dimethylsulfoxide, n-hexane และ petroleum ether ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้น 4.8-7.0 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเติม diethylether ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลง 9.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์

Millqvist และคณะ (1994) ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิสจากไตรปาล์มมิตินโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Rhizopus arrhizus* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิด คือ methyl-*tert*-butyl ether, diisopropyl ether, hexane, isooctane, methyl isobutyl ketone และ toluene พบว่าเมื่อเติม methyl-*tert*-butyl ether จะให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

7. ถังปฏิกรณ์สำหรับเอนไซม์

7.1 Batch stirred-tank reactor (BSTR)

BSTR เป็นถังปฏิกรณ์ที่ใช้กันอยู่ทั่วไป การผลิตจะทำเป็นแบบกะ จะประกอบด้วยถังทรงกระบอกและมีการกวนภายในถังด้วยอุปกรณ์ต่างๆ เช่น แท่งแม่เหล็ก submerged impeller, reciprocal oscillator หรือ end-over-end reactor ไลเปสตรึงรูปสามารถแยกออกจากปฏิกิริยาได้โดยการกรองหรือการหมุนเหวี่ยง ถังปฏิกรณ์ชนิดนี้มีความง่ายในการจัดการ เช่น การให้ความร้อน ความเย็น การล้างและการบำรุงรักษา และต้องการอุปกรณ์หรือเครื่องมือน้อย อย่างไรก็ตาม จะต้องเสียเวลาในการถ่ายออก ทำความสะอาด และเติมเข้าไปใหม่ ดังนั้นจึงอาจต้องพิจารณาเมื่อใช้ขนาดใหญ่ (Balco *et al.*, 1996)

7.2 Packed-bed reactor (PBR)

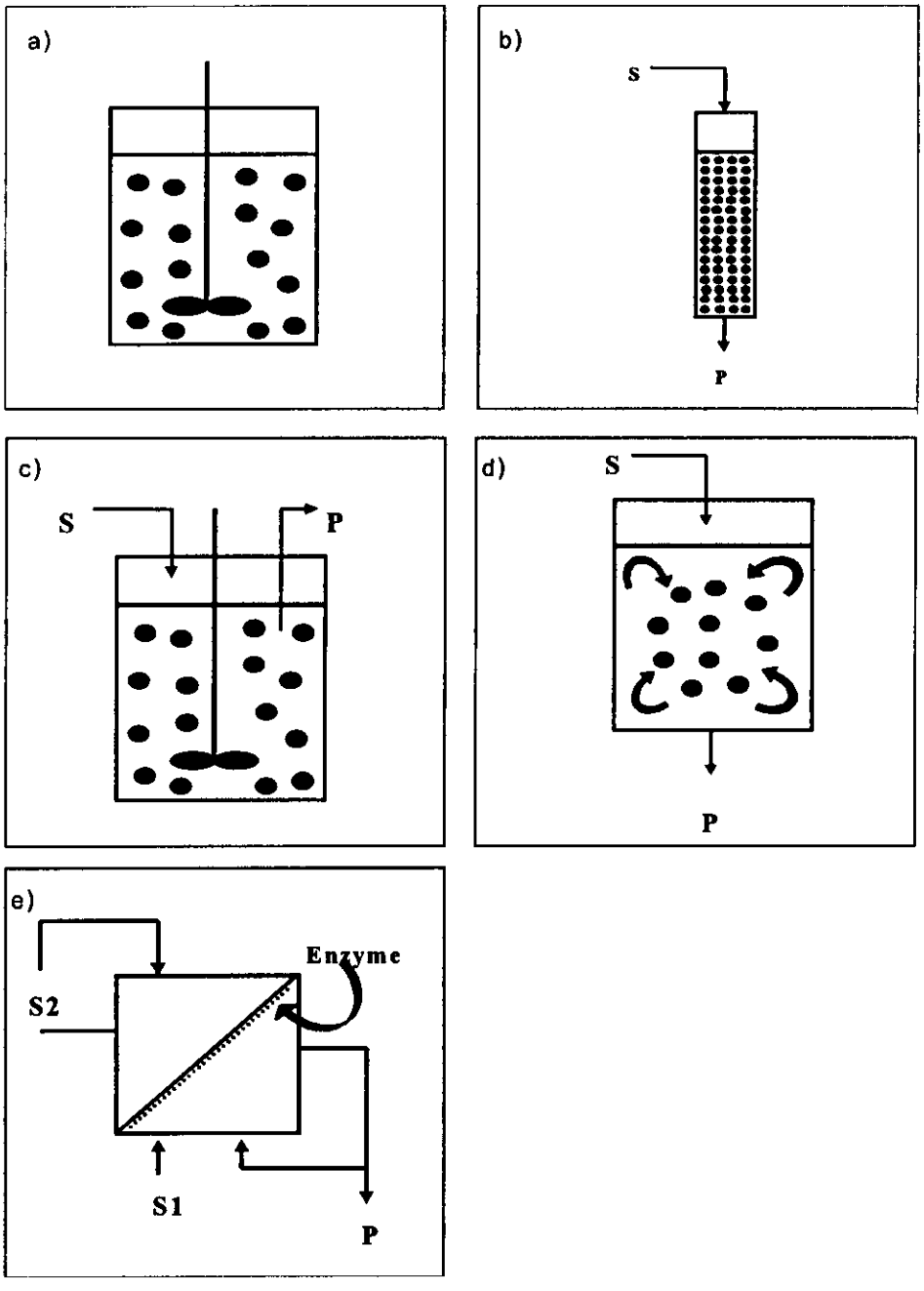
ถังปฏิกรณ์แบบ PBR หรือที่รู้จักกันดีอีกชื่อหนึ่งว่า fixed-bed reactor พบว่าถังปฏิกรณ์แบบ PBR มีประสิทธิภาพสูง ต้นทุนต่ำ และง่ายในการสร้าง การจัดการและการบำรุงรักษา ส่วนใหญ่แล้วมักจะใช้ขนาดใหญ่ ในถังปฏิกรณ์แบบนี้เอนไซม์ตรึงรูปจะถูกบรรจุภายในคอลัมน์ที่มี jacketed thermostat ห่อหุ้ม ดังนั้นจึงพบว่ามีพื้นที่ผิวต่อหน่วยปริมาตรของถังปฏิกรณ์สูง ในกรณีเป็นเฟสเดียวอาจมีการปั๊มสับสเตรทเข้าทางด้านบนหรือด้านล่าง ส่วนในกรณีที่เป็นสองเฟส อาจปั๊มสับสเตรทสวนทางกัน (countercurrent flows) โดยปั๊มสารที่มีความหนาแน่นมากกว่าทางด้านบน หรืออาจจะปั๊มสับสเตรทเข้าทางเดียวกัน ถังปฏิกรณ์แบบ PBR มักจะเกิดปัญหาการอุดตัน โดยเฉพาะ การลดขนาดของตัวตรึง (Balcao *et al.*, 1996)

7.3 Continuous stirred-tank reactor (CSTR)

ในถังปฏิกรณ์แบบ CSTR พบว่าจะเกิดการผสมกันดี ทำให้มีอุณหภูมิและความเข้มข้นเดียวกันตลอด เนื่องจากมีการกวนที่มีประสิทธิภาพทำให้เอนไซม์สัมผัสกับสารในปฏิกิริยาได้ดี ถังปฏิกรณ์แบบนี้มีต้นทุนต่ำในการสร้าง แต่จะต้องใช้ขนาดใหญ่กว่าถังปฏิกรณ์แบบ PBR มาก เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เท่ากัน หรืออาจจะใช้หลายๆถังแทนการใช้ถังใหญ่เพียงถังเดียว แต่จะมีปัญหาคือจะต้องใช้พื้นที่มาก (Balcao *et al.*, 1996) ซึ่ง Helga และคณะ (1998) ศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสจากน้ำมันตับปลาแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์แบบ Continuous stirred-tank reactor พบว่าหลังจากทำปฏิกิริยา 150 นาที เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Humicola lanuginosa* ผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจา*ก Candida rugosa* ซึ่งผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้ 45 และ 26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

7.4 Fluidized-bed reactor (FBR)

ถังปฏิกรณ์แบบ FBR เป็นการผสมระหว่างถังปฏิกรณ์แบบ CSTR กับแบบ PBR โดยจะต้องมีการเคลื่อนที่ของของเหลวขึ้นด้านบนเร็วกว่าการตกลงมาของเอนไซม์ตรึงรูป ปกติแล้วจะต้องใช้ปั๊มขนาดใหญ่ที่มีกำลังสูง ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการใช้ถังปฏิกรณ์แบบนี้ ยังไม่มีรายงานการใช้ถังปฏิกรณ์แบบ FBR ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป อย่างไรก็ตามยังมีการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบ FBR เพื่อผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอล ตัวอย่างเช่น Kosugi และคณะ 1990 ใช้ถังปฏิกรณ์แบบ FBR เพื่อผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอล นอกจากนี้ Kosugi และคณะ (1995) ใช้ถังปฏิกรณ์แบบ counter-current FBR ผลิต EPA และ DHA โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสน้ำมันปลาซาดีนด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และมีการกวนเป็นจังหวะด้วยปั๊ม



ภาพที่ 7 ถังปฏิกรณ์สำหรับเอนไซม์

Figure 7 Enzyme reactor designs

a) batch stirred-tank reactor b) packed-bed reactor

c) continuous stirred-tank reactor d) fluidzed-bed reactor

e) membrane reactor

Source : Kaewthong and H-Kittikun (2001)

7.5 Membrane reactor (MR)

ถังปฏิกรณ์แบบ MR หรือเรียกอีกอย่างว่าถังปฏิกรณ์แบบไดอะแฟรม อาจใช้ได้กับปฏิกิริยาที่มีของเหลวสถานะเดียวหรือสองสถานะ ในถังปฏิกรณ์แบบนี้เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่บนเมมเบรน ซึ่งอาจจะเป็นแบบแผ่น (flat sheet) (Garcia *et al.*, 1992) หรือเป็นแบบรูกลวง (hollow fiber) (Pronk *et al.*, 1992; van der Padt *et al.*, 1992) เนื่องจากเมมเบรนเป็นตัวแยกของเหลวที่ไม่เข้ากัน ทำให้มักจะใช้กับระบบที่มีของเหลวสองชนิดที่ไม่เข้ากัน การป้องกันและการกำจัดการอุดตันของรูพรุนในเมมเบรนมีความยุ่งยากกว่าการอุดตันในถังปฏิกรณ์แบบ PBR แต่จะเกิด preassure drops ต่อพื้นที่เกิดปฏิกิริยาน้อยกว่า (Balco *et al.*, 1996) ยังไม่มีรายงานการใช้ถังปฏิกรณ์แบบ MR ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป อย่างไรก็ตามยังมีการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบ MR ในการผลิตโมโนกลีเซอไรด์ van der Padt และคณะ (1992) ทำการศึกษาการผลิตโมโนกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ใน MR ที่มีคอลัมน์แยกผลิตภัณฑ์ ถังปฏิกรณ์แบบ MR พบว่าสามารถผลิตโมโนกลีเซอไรด์ได้ประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

8. **การวัดปริมาณเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เทคนิค** Thin layer Chromatography-Flame Ionization detection (TLC/FID)

Thin layer Chromatography-flame Ionization detection (TLC/FID) เป็นการแยกของผสมในสารละลาย เช่น แยกลิปิด วิธีนี้ประกอบด้วย แท่งแก้วที่เคลือบบางๆ ด้วยตัวดูดซึม (adsorbent)เช่น ซิลิกาเจล หรืออะลูมินา แท่งแก้วที่ถูกเคลือบแล้วจะปล่อยให้แห้งแล้วอบด้วยความร้อนที่อุณภูมิสูงและระยะเวลาที่กำหนดเรียกกระบวนการนี้ว่าแอคติเวชั่น เป็นการกำจัดน้ำออกจากตัวดูดซับ การแยกสารด้วยวิธีนี้ใช้หลักที่ว่าสารแต่ละชนิดมีอัตราการเคลื่อนที่บนตัวดูดซับไม่เท่ากันบางชนิดอาจถูกดูดซับไว้ด้วยตัวดูดซับซึ่งเป็นส่วนคงที่ แต่บางชนิดอาจถูกพาเคลื่อนที่ด้วยส่วนเคลื่อนที่ การแยกทำเหมือนกันกับโครมาโทกราฟีแบบกระดาษโดยให้ตัวละลายซะจากล่างขึ้นไปข้างบน การแยกเกี่ยวข้องกับการดูดซับ โดยแรงวาลล์เดอวาลล์ พันธะไฮโดรเจน และการเปลี่ยนประจุ (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537) การตรวจหาตำแหน่งของลิปิดที่แยกออกจากกันใช้ Flame Ionization Detector

Kose และคณะ (2001) วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เตรียมๆได้จากปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์จากน้ำมันเมล็ดนุ่นโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* โดยใช้เทคนิค TLC/FID พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปส 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักน้ำมัน ใช้น้ำมันต่อเมทานอล อัตราส่วน 1:4 (โมล/โมล) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 91.5 เปอร์เซ็นต์

Freedman และคณะ (1984) วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เตรียมๆได้จากปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์จากน้ำมันพืช โดยใช้อัลคาไลน์และกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้เทคนิค TLC/FID พบว่าอัลคาไลน์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่ากรด

9. การวัดชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)

แก๊สโครมาโตกราฟีเป็นรูปแบบหนึ่งของกระบวนการแยกสารโครมาโตกราฟีเกี่ยวข้องกับการแจกแจง (distribution) หรือพาร์ทิชั่นของสารประกอบใดๆ ระหว่างวัฏภาคที่แตกต่างกันสองวัฏภาค ซึ่งเป็นวัฏภาคที่เคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ ในของผสมสารประกอบหลายๆ พาร์ทิชั่น หรือแบ่งองค์ประกอบอยู่แตกต่างกันไประหว่างวัฏภาคสองวัฏภาค ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายสัมพัทธ์ในแต่ละวัฏภาค เมื่อสารประกอบในของผสมเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่นำไปมักจะถูกเหนี่ยวรั้งมากน้อยแตกต่างกันไป เนื่องจากความสามารถในการละลายที่แตกต่างกันและจะถูกแยกออกจากกัน สารใดที่มีความสามารถในการละลายในวัฏภาคคงที่มากกว่าก็จะใช้เวลามากกว่าในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ ส่วนวัฏภาคที่เป็นของเหลวที่มีมวลโมเลกุลสูง ซึ่งอยู่ที่พื้นผิวที่ละเอียดของอนุภาคของสารแข็งรองรับ แต่ปัจจุบันนิยมเคลือบฉาบของเหลวที่เป็นวัฏภาคคงที่ไว้บนผนังด้านในของท่อคาพิลลารีที่มีขนาดยาว (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

Chu และคณะ (2001) ศึกษาชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไขปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์มโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ชนิด BPx70 ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิจาก 115-180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร่ง 80 องศาเซลเซียสต่อนาที โดย injector และ detector มีอุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส

Jham และคณะ (1982) ศึกษาชนิดกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี เตรียมน้ำมันให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์สกัดน้ำมันถั่วเหลือง และย่อยสลายไขมันโดยใช้ KOH/MeOH ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันกับ HCl/MeOH ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกชนิดเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขปาล์มและน้ำมันปาล์ม
2. คัดเลือกตัวพยุงที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์แบบกะโดยใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป
4. ศึกษาและวิเคราะห์คุณสมบัติที่สัมพันธ์ทางเชื้อเพลิงของเมทิลเอสเทอร์
5. ศึกษาการขยายขนาดการผลิตเมทิลเอสเทอร์แบบกะ
6. ศึกษาการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่
7. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป