การศึกษาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ปริญญานิพนธ์
ของ
ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี
พฤษภาคม 2552

การศึกษาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ปริญญานิพนธ์
ของ
ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี
พฤษภาคม 2552

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

บทคัดย่อ

ของ

ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี
พฤษภาคม 2552

ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม. (2552). *การศึกษาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา*. ปริญญานิพนธ์ วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สินศุภา จุ้ยจุลเจิม, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชัย อัษฎมงคล.

ในการศึกษาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าการใช้เอนไซม์ในลักษณะต่างกันส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้แตกต่างกันออกไป เอนไซม์อิสระให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยไตรกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันสูงกว่าเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป 3-4 เท่า ปัจจัยหลักที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน คือ สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล, อุณหภูมิ, ความเร็วรอบการเขย่า และค่าความเป็นกรด-ด่างในการตรึงรูปเอนไซม์ พบว่าองค์ประกอบหลักของเอทิลเอสเทอร์ที่ได้ คือ เอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอท และปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักเอทิลเอสเทอร์สูงสุดที่ผลิตได้คือ 20.43 ในสภาวะที่ใช้คือ: สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินต่อเอทานอลที่ 1 ต่อ 3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และ pH ในการตรึงรูปเอนไซม์ 7.5 ใช้เวลาประมาณ 27 ชั่วโมง และ พบว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลสามารถอธิบายได้โดยแบบจำลอง Ping-Pong Bi Bi พบว่า อัตราเร็วเริ่มต้นสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) เท่ากับ 0.030 มิลลิโมลต่อนาที ค่าคงที่ของเอทานอล (K_m^{EtOH}) และค่าคงที่ของไตรกลีเซอไรด์ (K_m^{TG}) เท่ากับ 9.335 และ0.294 มิลลิโมล ตามลำดับ

A STUDY ON BIODIESEL SYNTHESIS BY TRANSESTERIFICATION USING IMMOBILIZED LIPASE AS A CATALYST

AN ABSTRACT

BY

PORAMATH NUAMPIAM

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Engineering Degree in Chemical Engineering
at Srinakharinwirot University
May 2009

Poramath Nuampiam. (2009). *A Study on Biodiesel Synthesis by Transesterification Using Immobilized Lipase as a Catalyst.* Master thesis, M.Eng. (Chemical Engineering). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assist Prof. Sinsupha Chuichulcherm, Assist Prof. Pichai Asadamongkon.

A Study on biodiesel synthesis by transesterification using immobilized lipase as a catalyst was conducted in laboratory scale in batch mode. It was found that the activity of free enzyme was nearly 4 times higher than the activity of immobilized enzyme. Moreover, it was also found that the enzyme activity in the water from the washing step during immobilizing the lipase. When using immobilized lipase as a catalyst for biodiesel production, triglyceride (TG) was reduced to fatty acid and reacted with ethyl alcohol to form ethyl ester.

The factors affecting yield of ethyl ester were : 1) molar ratio of palm olein to alcohol, 2) reaction temperature, 3) mixing speed, and 4) pH of the buffer in preparing for enzyme immobilization. The maximum yield of ethyl ester in the experiments when using the reaction conditions as follows: the molar ratio of the palm olein to alcohol of 1:3, temperature of 40 $^{\circ}$C, mixing speed of 200 rpm and pH 7.5 of the buffer in preparing for enzyme immobilization; was 20.43 % by wt. The enzyme kinetics could be explained by Ping-pong Bi Bi model with the maximum velocity of 0.030 mmol/min. The k_m^{EtOH} and k_m^{TG} were found to be 9.335 mM and 0.294 mM respectively.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การศึกษาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
ของ
ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 25.....

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินศุภา จุ้ยจุลเจิม)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชัย อัษฎมงคล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินศุภา จุ้ยจุลเจิม)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชัย อัษฎมงคล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร)

..... กรรมการ
(ดร.สุพจน์ พินิตเกียรติสกุล)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินศุภา จุ้ยจุลเจิม ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการวิจัย ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิชัย อัษฎมงคล และ รศ.ดร.ศิริวรรณ ศรีสรฉัตร ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจปริญญานิพนธ์ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร. สุพจน์ พินิตเกียรติสกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการวิจัยและตรวจปริญญานิพนธ์ให้มีความถูกต้อง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านโดยเฉพาะคุณกิตติโรจน์ หวันตาหลา คุณปรีชา แก้วศรีพรม และคุณสุภกิจ ขาวเนตร ที่ได้อำนวยความสะดวกด้านการใช้ที่ให้การช่วยเหลือในการทำปริญญานิพนธ์มาโดยตลอด ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้าทุกคนเป็นอย่างยิ่ง ที่ได้ส่งเสริม สนับสนุนช่วยเหลือตลอดจนเป็นกำลังใจและดูแลข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษา

ประโยชน์อันเนื่องมาจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้มีความรู้จนถึงปัจจุบัน

ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	น้ำมันปาล์ม	4
	เอนไซม์ไลเปส	11
	ไบโอดีเซล	29
	การเร่งปฏิกิริยาและตัวเร่งปฏิกิริยา	33
	จลนพลศาสตร์เคมี	37
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	46
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	51
	วัตถุดิบ	51
	อุปกรณ์และเครื่องมือ	52
	เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์เอทิลเอสเทอร์	53
4	**ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง**	65
	ลักษณะของเอนไซม์ตรึงรูป	65
	ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารตั้งต้นแต่ละชนิด	65
	ผลการศึกษาสภาวะที่มีผลกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ, เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในสารตั้งต้นของน้ำมันชนิดต่าง ๆ	67
	ผลการศึกษาสภาวะการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	72
	ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยแบบจำลอง Ping –pong Bi Bi	81

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	95
ข้อเสนอแนะ	96
บรรณานุกรม	97
ภาคผนวก	101
ภาคผนวก ก	102
ภาคผนวก ข	104
อภิธานศัพท์	109
ประวัติผู้ทำวิจัย	110

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม.....	4
2	สมบัติและองค์ประกอบกรดไขมันหลักของน้ำมันพืชต่าง ๆ.....	5
3	องค์ประกอบภายในโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG).....	7
4	ประเภทของไตรเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมันปาล์มที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC…	8
5	สัดส่วนการใช้ประโยชน์น้ำมันปาล์มในอุตสาหกรรมต่าง ๆ.....	10
6	โพลิเมอร์และสารเชื่อมขวางที่ใช้ในการห่อหุ้มเอนไซม์.....	22
7	โมโนเมอร์ชอบน้ำและโมโนเมอร์ไม่ชอบน้ำและโพลิเมอร์.....	25
8	โพลิเมอร์และตัวทำละลายที่ใช้ในการทำแคปซูลเล็กแบบแยกชั้น.....	27
9	การเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป.....	28
10	การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของตัวเร่งปฏิกิริยา.....	28
11	สมบัติของน้ำมันดีเซล และเอสเทอร์ของกรดไขมัน.....	29
12	ส่วนประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์มโอลิอิน.....	55
13	สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอิน [CPO] กับเอทานอล [EtOH] ปริมาตรรวม 25 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง.....	64
14	อัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่อใช้ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์คงที่และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH].....	86
15	ค่า K_m^{EtOH} ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ต่าง ๆ กัน.....	90
16	k_m^{TG} ของปฏิกิริยาที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์และเอทานอลต่าง ๆ.....	92
17	k_m^{EtOH} ของปฏิกิริยาที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์และเอทานอลต่าง ๆ.....	93
18	ค่าคงที่ต่าง ๆ ของปฏิกิริยาของการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	93

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์.....	13
2	เอนไซม์ไลเปสชนิดที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์.....	14
3	การจำแนกประเภทของเอนไซม์ตรึงรูป.....	20
4	กระบวนการตรึงรูปเอนไซม์ให้อยู่ในรูปของแข็ง.....	21
5	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (Transesterification)	31
6	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	34
7	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	35
8	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	37
9	กลไกแบบ Random Bi Bi หรือ Random rapid equilibrium.....	41
10	กลไกแบบ Ordered Bi Bi หรือ Compulsory order mechanism.....	42
11	กลไกแบบ Ping-pong Bi Bi หรือ Double displacement reaction.....	42
12	กราฟไลน์วีเวอร์-เบอร์คของปฏิกิริยาที่มีกลไกแบบ Ping-pong Bi Bi (ก) กราฟระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[A_0]}$ ที่ค่า $[B_0]$ คงที่ต่าง ๆ (ข) กราฟระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$ ที่ค่า$[A_0]$ คงที่ต่าง ๆ.....	44
13	กราฟไลน์วีเวอร์-เบอร์คของปฏิกิริยาที่มีกลไกแบบ Ping-pong Bi Bi (ก) การเขียนกราฟระหว่างค่าจุดตัดแกน $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$ (ข) การเขียนกราฟระหว่างค่าจุดตัดแกน $\frac{1}{K_m}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$	45
14	การเตรียมน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยวิธีการตกผลึก (Crystallization).....	54
15	ขั้นตอนการผลิตเอทิลเอสเทอร์ระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอลโดยมีเอนไซม์ตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	61
16	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารตั้งต้นน้ำมันแต่ละชนิด.....	67
17	ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบการเขย่าและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันชนิดต่าง ๆ (ก) น้ำมันมะกอก (ข) น้ำมันปาล์มโอลิอิน และ (ค) น้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์.....	69

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

18 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันชนิดต่าง ๆ (ก) น้ำมันมะกอก (ข) น้ำมันปาล์มโอลิอิน และ(ค)น้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์..... 71

19 ความสัมพันธ์ของร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์และสัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล ที่เวลาต่างๆ..... 74

20 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์และอุณหภูมิที่เวลาต่างๆ..... 76

21 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์และความเร็วรอบการเขย่า ที่เวลาต่างๆ..... 78

22 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์และ pH ในการตรึงรูปที่เวลาต่างๆ..... 80

23 กลไกการเกิดปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยแบบจำลอง Ping-Pong Bi Bi..... 82

24 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์[TG] 4 mM และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] (ก) [EtOH] = 4 mM (ข) [EtOH] = 6 mM (ค) [EtOH] = 8 mM..... 83

25 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์[TG] 6 mM และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] (ก) [EtOH] = 4 mM (ข) [EtOH] = 6 mM (ค) [EtOH] = 8 mM..... 84

26 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์[TG] 8 mM และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] (ก) [EtOH] =4 mM (ข) [EtOH] = 6 mM (ค) [EtOH] = 8 mM..... 85

27 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[EtOH]}$ ในรูปแบบของไลน์วีเวอร์-เบอร์คของปฏิกิริยา เมื่อค่าความเข้มข้นของเอทานอลคงที่ใน 3 ชุดการทดลอง..... 90

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

28 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[TG]}$ ในรูปแบบของไลน์วีเวอร์-เบอร์คของ ปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ที่มีกลไกแบบ Ping-pong Bi Bi เมื่อค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์คงที่ใน 3 ชุดการทดลอง..... 91

29 การเปรียบเทียบอัตราเร็วเริ่มต้นจากการทดลองจริงกับอัตราเร็วเริ่มต้นที่ได้จากการคำนวณที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ที่แตกต่างกัน (ก) [TG] = 4 mM (ข) [TG] = 6 mM และ (ค) [TG] = 8 mM..... 94

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

จากกระแสพระราชดำรัสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวพระราชทานเนื่องในวโรกาสวันเฉลิมพระชนมพรรษา ณ ศาลาดุสิตดาลัย พระตำหนักจิตรลดาฯ เมื่อเย็นวันที่ 4 ธันวาคม 2548 ใจความสำคัญทรงแสดงความห่วงใยในเรื่องของพลังงาน โดยเฉพาะปัญหาการขาดแคลนพลังงานในอนาคตทรงย้ำว่า “น้ำมันเชื้อเพลิงที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน อีกไม่กี่สิบปีมันก็จะหมดไป ฉะนั้นเราต้องมีการขวนขวาย ถ้าขวนขวายหาวิธีทำเชื้อเพลิงทดแทนได้ ประเทศไทยก็จะไม่มีความเดือดร้อน” เน้นให้รัฐบาลและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเร่งผลิตพลังงานทดแทน โดยเฉพาะการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มทั้งนี้ ได้ทรงชี้แนะว่าในปัจจุบันมีการผลิตเครื่องบินขนาดเล็กที่ใช้ไบโอดีเซลได้แล้ว ต่อไปในอนาคตเครื่องบินขนาดใหญ่ก็จะใช้ ไบโอดีเซลรวมทั้งสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงมาผลิตกระแสไฟฟ้า ในปี 2551 ประเทศไทยได้เกิดวิกฤตการณ์น้ำมันเชื้อเพลิง อันเนื่องมาจากราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกปรับตัวสูงขึ้นเป็นประวัติการณ์ เนื่องจากมีความต้องการน้ำมันเชื้อเพลิงที่สูงทั้งด้านอุตสาหกรรมและด้านอื่นอีกมากมายซึ่งทำให้ปริมาณของน้ำมันไม่เพียงพอต่อความต้องการ และมีการคาดการณ์ว่าน้ำมันดิบของโลกจะหมดไปในอีก 50 ปีข้างหน้า ประเทศไทยมีการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นสินค้านำเข้าอันดับหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันดีเซล (พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล. 2544: 14)

ดังนั้น ประเทศไทยต้องเสียดุลการค้าจากการนำเข้าน้ำมันดิบ ทำให้ประเทศไทยต้องหาแนวทางเพื่อลดปัญหาการนำเข้าน้ำมันและปรับปรุงพัฒนาพลังงานทดแทนประเภทต่างๆ แนวทางหนึ่งที่ใช้เป็นทางเลือกทดแทนน้ำมันดีเซล คือไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นน้ำมันที่ผลิตได้จากน้ำมันพืชชนิดต่างๆ และไขมันจากสัตว์ทำปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) โดยจะใช้แอลกอฮอล์และมีตัวเร่งปฏิกิริยาเข้ามาช่วยซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลคิลเอสเทอร์ นั้นคือไบโอดีเซล และได้มีการทดสอบการใช้ไบโอดีเซลกับเครื่องยนต์แบบอัตโนมัติมี 4 สูบโดยทดสอบในสภาวะต่างๆ พบว่า อุณหภูมิการการเผาไหม้ต่ำกว่าน้ำมันดีเซลจากน้ำมันดิบ นอกจากนั้นการเผาไหม้ของไบโอดีเซลในเครื่องยนต์ดีเซลมีการสันดาปภายในที่สมบูรณ์และก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศน้อยลงเนื่องจากไม่มีควันดำ และไม่มีการสะสมของของซัลเฟอร์และตะกั่ว ไบโอดีเซลที่ได้รับการทดสอบมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลจากน้ำมันดิบ

น้ำมันปาล์มเป็นน้ำมันพืชที่นิยมนำมาผลิตไบโอดีเซลเนื่องจากในปี 2548–2549 น้ำมันปาล์มมีมากเกินความต้องการของตลาด ทำให้น้ำมันปาล์มมีราคาที่ต่ำมาก ประกอบกับที่องค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันปาล์มมีไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงทำให้เป็นที่นิยมในการประกอบอาหารน้อยกว่าน้ำมันถั่วเหลือง

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม จะอาศัยการสลายโมเลกุลน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิส (Alcoholysis) โดยที่ปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิสของน้ำมันพืชนั้นจะถูกเร่งปฏิกิริยาได้ 2 แบบคือ วิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ วิธีทางเคมีจะใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยานี้อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงคือการเกิดสบู่ (Sponification) ส่งผลให้ได้เอทิลเอสเทอร์ในปริมาณที่ลดลง และยังส่งผลทำให้ไบโอดีเซลที่ได้ไม่บริสุทธิ์และเมื่อเกิดสบู่ขึ้น จึงต้องมีการล้างสบู่ออก แต่สบู่จะล้างออกยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย อาจก่อให้เกิดสารอิมัลชันขึ้นได้ทำให้เกิดมลพิษทางน้ำ ทำให้ปัจจุบันนี้มีการใช้วิธีทางชีวภาพมาทดแทนวิธีทางเคมีเพื่อลดการเกิดมลพิษ วิธีทางชีวภาพนั้นคือการใช้เอนไซม์ไลเปสในกระบวนการแอลกอฮอไลซิส เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสนั้นมีคุณสมบัติที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในไขมัน การเลือกใช้วิธีทางชีวภาพสามารถลดปัญหาของการใช้วิธีทางเคมีได้และยังมีข้อดีคือ ไบโอดีเซลจะมีความบริสุทธิ์มาก นอกจากนี้ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสทำให้สามารถเลือกคัดสารได้มากขึ้น ได้แก่ โมโนกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์และสามารถลดปัญหาสารเคมีที่ตกค้างในไบโอดีเซล

รายงานการวิจัยนี้เป็นการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล และทำการทดลองหาข้อมูลพื้นฐานทางจลนพลศาสตร์ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียว อีกทั้งเป็นการนำผลิตผลทางการเกษตรที่ได้มาผลิตไบโอดีเซล ทำให้ช่วยขยายตลาดให้ผลิตผลทางการเกษตรมีแหล่งตลาดขนาดใหญ่ขึ้นภายในประเทศ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสอิสระ
2. เพื่อศึกษาสภาวะการสังเคราะห์ไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวโดยที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
3. เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ขอบเขตของการวิจัย

1. การทดลองนี้ใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Psudomonas fluorescens* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอาศัยเทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีห่อหุ้มด้วยเจลโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตเป็นสารรองรับและน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์อย่างน้อย 95.00 เปอร์เซ็นต์
2. ศึกษาสภาวะที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ อุณหภูมิ, ความเร็วรอบในการเขย่าที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป, เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปโดยหาค่ากิจกรรมด้วยวิธี Routine measurement of microbial lipase เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 แบบ รวมทั้งเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารตั้งต้นได้แก่ น้ำมันปาล์มโอลิอิน, น้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์และน้ำมันมะกอก

3. ศึกษาสภาวะที่ใช้สังเคราะห์ไบโอดีเซลจะทำการศึกษาในรูปเอทิลเอสเทอร์ ได้แก่ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวกับเอทานอล, อุณหภูมิ, ความเร็วรอบการเขย่า, pH ในการตรึงรูปเอนไซม์ที่มีต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยเทคนิคแก๊สโครโตมากราฟี

4. ศึกษาค่าคงที่ปฏิกิริยาของการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาโอกาสในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรภายในประเทศมาเป็นพลังงานทดแทน

2. เพื่อเป็นแนวทางการพัฒนาพลังงานทดแทนในอนาคต

3. เพื่อเป็นข้อมูลทางจลนพลศาสตร์การสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวและเอทานอลโดยอาศัยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. น้ำมันปาล์ม
2. เอนไซม์ไลเปส
3. ไบโอดีเซล
4. การเร่งปฏิกิริยาและตัวเร่งปฏิกิริยา
5. จลนพลศาสตร์เคมี
6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมันมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า Elaeis Guineesis ผลปาล์มจะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นผลปาล์มซึ่งน้ำมันที่ได้จากผลปาล์มนั้นจะเป็นน้ำมันปาล์มที่มีสีแดงส้ม เนื่องจากมีความเข้มข้นของแคโรทีนในน้ำมันปาล์มจะมีค่าสูงถึง 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 16-18 อะตอมและอุณหภูมิจุดหลอมเหลวมีค่าสูงและอีกส่วนที่เป็นเมล็ด มีคุณสมบัติไม่มีสีและมีปริมาณกรดไขมันอิสระต่ำน้ำมันปาล์มประกอบด้วยเอซิลกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบหลัก องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม

ชื่อสามัญ	ระบบ IUAC	เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก
<u>กรดไขมันอิ่มตัว</u>		
กรดไมริสติก (Myristic acid)	n- tetradecanoic acid	1-6
กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid)	n-hexadecanoic acid	32-46
กรดสเตียริก (Stearic acid)	n-octadecanoic acid	1-6
<u>กรดไขมันไม่อิ่มตัว</u>		
กรดโอลิอิก (Oleic acid)	Cis-9-octadecanoic acid	40-52
กรดไลโนลีอิก (Linoleic acid)	Cis-9-cis-12 octadecanoic acid	5-7

ที่มา: ไตรทศ วงษาภักดี. (2545). *รายงานการวิจัย การทดสอบการติดของกัมเมื่อใช้น้ำมันไบโอดีเซลที่ได้จากปาล์มสเตอรินผสมน้ำมันดีเซล.* หน้า 45.

ตาราง 2 สมบัติและองค์ประกอบกรดไขมันหลักของน้ำมันพืชต่าง ๆ

น้ำมันชนิดดิบ	ค่าไอโอดีน	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1
น้ำมันปาล์ม	14.1 -21.0	ND - 0.5	0.5 -0.2	39.9 -47.5	3.5 -6.0	36.0 -44.0
น้ำมันปาล์มโอลิอิน	>56	0.1 -0.5	0.5 -1.5	38.0 -43.5	3.5 -5.0	39.8 -46.0
น้ำมันปาล์มสเตียริน	<48	0.1 -0.5	1.0 -2.0	48.0 -74.0	3.9 -6.0	15.5 -36.0
น้ำมันเมล็ดในปาล์ม	50.0 -55.0	45.0 -55.0	14.0 -18.0	6.5 -10.0	1.0 -3.0	12.0 -19.0
น้ำมันมะพร้าว	6.3 -10.6	45.1 -53.2	16.8 -21.0	7.5 -10.2	2.0 -4.0	5.0 -10.0
น้ำมันถั่วลิสง	86 - 107	ND -0.1	ND -0.1	8.0 -14.0	1.0 -3.0	35.0 -67.0
น้ำมันเมล็ดสบู่ดำ	101	ND	ND	14.9	6.0	41.2
น้ำมันเมล็ดเรพ	94 -120	ND	ND-0.2	1.5 -6.0	0.5 -3.1	8.0 -60.0
น้ำมันถั่วเหลือง	124 - 139	ND -0.1	ND -0.2	8.0	2.0 -5.4	17.7 -28.0

หมายเหตุ: หมายเลขหน้าเครื่องหมาย : หมายถึง จำนวนคาร์บอนอะตอม
หมายเลขหลังเครื่องหมาย : หมายถึง จำนวนพันธะคู่
ND คือ ไม่พบ

ที่มา: พิศมัย เจนวนิชปัญจกุล. (2544). ไบโอดีเซล พลังงานทางเลือก. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. หน้า 5-7.

2.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันปาล์ม (Smith, K.W. 2001: 357-361)

น้ำมันพืชส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติทางเคมีคล้ายกันทุกชนิด แต่สำหรับน้ำมันปาล์มนั้นจะประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลและเอซิลกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งภายในโมเลกุลจะมีหมู่เอซิลและสัดส่วนที่มีลักษณะเฉพาะในแต่ละโมเลกุลเอซิลกลีเซอรอล จึงทำให้เกิดความแตกต่างที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดเป็นคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันปาล์ม องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันปาล์มได้แก่

2.1.1.1 กรดไขมัน

น้ำมันปาล์มประกอบด้วยกรดไขมันอยู่หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาตรที่เท่ากัน แล้วยังมีกรดไขมันอิ่มตัวอยู่ตำแหน่งที่ 2 ในสัดส่วนที่สูงอีกด้วย จึงทำให้น้ำมันปาล์มเป็นน้ำมันที่ต่างจากน้ำมันชนิดอื่นๆ กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักที่อยู่ในน้ำมันปาล์ม คือ กรดปาล์มมิติกและกรดโอลิอิก นอกจากนี้จะมีกรด สเตียริกและกรดไลโนเลอิกเป็นองค์ประกอบรองลงมาตามลำดับ กรดไขมันอิสระที่พบในน้ำมันปาล์มเกิดขึ้นจากการแยกสลายน้ำมันโดยเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในเมล็ดปาล์มด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส การย่อยไตรเอซิลกลีเซอรอล 1 โมล จะให้กรดไขมันอิสระได้ 1 ถึง 2 โมล เมื่อนำน้ำมันปาล์มมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จะส่งผลให้กรดไขมันอิสระลดลงเหลือในปริมาณที่น้อยมาก

2.1.1.2 ไตรเอซิลกลีเซอรอล

ในแต่ละโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลเกิดจากการรวมตัวของกรดไขมัน 3 โมเลกุลเป็นการรวมตัวกรดไขมันชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันถ้าในโมเลกุลไตรเอซิลกลีเซอรอลเกิดจากการรวมตัวของกรดไขมันชนิดเดียวกันจะเรียกว่า เอซิลกลีเซอรอลชนิดเชิงเดี่ยว (Simple Acylglycerol) แต่ถ้าถูกเอสเทอริไฟด์ด้วยกรดไขมันต่างชนิดเรียกว่า เอซิลกลีเซอรอลชนิดผสม (Mixed Acylglycerol) ดังนั้น จึงมีการเรียงตัวของกรดไขมันชนิดต่างๆ ภายในโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่เป็นแบบซ้ำกัน จึงทำให้มีแบบของการเรียงตัวเพียงไม่กี่แบบ แต่อย่างไรก็ตามการเรียงตัวกรดไขมันภายในโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลแบบต่างๆ จะสามารถแสดงคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มได้ดังตาราง 3 ตารางแสดงการเรียงตัวของกรดไขมันที่อยู่ในโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล ไตรเอซิลกลีเซอรอลส่วนใหญ่มีกรดไขมันเป็นแบบ 1,3-Dipalmitoyl-2-Oleoylglycerol (POP 22 เปอร์เซ็นต์) และ *rac*-1-Palmitoyl-2,3-Dioleoylglycerol (POO 22 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังมีไตรเอซิลกลีเซอรอล ส่วนอื่นๆ ที่สำคัญ เช่น *rac*-1,2-Dipalmitoyl-3-Oleoylglycerol (PPO 5 เปอร์เซ็นต์) Tripalmitoylglycerol (PPP 5 เปอร์เซ็นต์) *rac*-1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Stearoylglycerol (POSt 5 เปอร์เซ็นต์) 1,3-Dipalmitoyl-2-Linoleoylglycerol (PLP 7 เปอร์เซ็นต์) Trioleoylglycerol (OOO 5 เปอร์เซ็นต์) *rac*-1-Palmitoyl-2-Linooleoyl-3-Oleoylglycerol (PLO 7 เปอร์เซ็นต์) และ *rac*-1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Linoleoylglycerol (POL 3 เปอร์เซ็นต์) ยังมีกลุ่มอื่นๆ อีกแต่มีน้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 3 องค์ประกอบภายในโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG)

ไตรเอซิลกลีเซอรอล	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
จำนวนพันธะคู่ 0 คู่	7.4
PPP	5.1
PPst	1.2
PStP	0.3
จำนวนพันธะคู่ 1 คู่	36.8
MOP	0.9
POP	23.7
POSt	5.7
PPO	4.4
PStO	0.2
จำนวนพันธะคู่ 2 คู่	34.0
POO	20.3
StOO	2.4
OPO	1.0
PLP	6.5
StLP	1.6
จำนวนพันธะคู่ 3 คู่	16.1
OOO	4.4
POL	4.1
PLO	5.6
จำนวนพันธะคู่มากกว่า 3 คู่	5.6
LOO	1.8
OLO	1.2

หมายเหตุ M คือ ไมริสติก P คือ ปาล์มิติก St คือ สเตียริก O คือ โอลิอิก L คือ ไลโนลิอิก

ที่มา: Smith, K. W. (2001). *Crystallization of palm oil and its fraction*. *Crystallization Process in Fats and Lipid Systems*. p. 357-361.

ถ้าพิจารณาองค์ประกอบของไตรเอซิลกลีเซอรอลในส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่อยู่ภายในโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC จะได้องค์ประกอบของน้ำมันปาล์ม ดังแสดงดังตาราง 3 พบว่าน้ำมันปาล์มแบบแข็ง (Harder) จะมีระดับของ Trisaturated (SSS) 1,3-Disaturated-2-Monooleoyl (SOS) และ *rac*-1,2-Disaturated-3-Monooleoyl (SSO) อยู่สูง ซึ่งตรงข้ามกับน้ำมันแบบอ่อน (Softer) จะมีเพียง 1,3-Disaturated-2-Monolinoleoyl (SLS) และ *rac*-1-Monosaturated-2,3-Monooleoyl (SOO) ทั้ง 5 กลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญมากเพราะจะทำให้มีจุดหลอมเหลวต่างกันในระหว่างกลุ่ม ถ้ามีกรดไขมันอิ่มตัวสูงส่งผลให้มีจุดหลอมเหลวของน้ำมันสูง และมีการใช้จุดหลอมเหลวสำหรับการแยกกรดไขมันตามลักษณะการนำไปใช้ ดังนั้นความรู้ในเรื่องขององค์ประกอบของน้ำมันปาล์มเป็นส่วนสำคัญที่จะทำให้สามารถเข้าใจเรื่องการตกผลึกของไตรเอซิลกลีเซอรอล และการทำปฏิกิริยาร่วมกันมากขึ้น

ตาราง 4 ประเภทของไตรเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมันปาล์มที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ประเภทของไตรเอซิลกลีเซอรอล	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
SSS	8.8
SOS	30.9
SSO	7.1
SLS	8.8
SSL	2.2
SOO	22.2
OSO	2.1
SLO	10.0
OOO	3.5
มากกว่า 3 พันธะคู่	4.5

หมายเหตุ S คือ กรดไขมันอิ่มตัว O คือ โอลิอิก L คือ ไลโนเลอิก

ที่มา: Smith, K. W. (2001). *Crystallization of palm oil and its fraction. Crystallization Process in Fats and Lipid Systems*. p. 357-361

2.1.1.3 ส่วนประกอบรอง

น้ำมันปาล์มดิบมีองค์ประกอบของเอซิลกลีเซอรอล รวมทั้งกรดไขมันอิสระมักพบว่าอยู่ในระดับเดียวกับไดเอซิลกลีเซอรอลประมาณ 5 ถึง 8เปอร์เซ็นต์ โมโนเอซิลกลีเซอรอลที่พบโดยทั่วไปปกติจะมีค่าน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วยังสามารถลดน้อยลงหลังผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ส่วนไดเอซิลกลีเซอรอลหลังจากผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ปกติทั่วไปจะมีค่าประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ แต่ในน้ำมันปาล์มดิบจะมีไดเอซิลกลีเซอรอลมากถึง 8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไดเอซิลกลีเซอรอลที่พบส่วนมากในน้ำมันปาล์มเป็นแบบ Dipalmitoylglycerol (PP) Palmitoyloleolyglycerol (PO) และ Dioleoylglycerol (OO) ส่วนประกอบรองก่อให้เกิดการตกผลึกของน้ำมัน ดังนั้นการกำหนดระดับต่างๆ ของส่วนประกอบรองเป็นส่วนสำคัญในกำหนดลักษณะของน้ำมัน

สารประกอบอื่นๆ มีอยู่น้อยมาก เช่น คาโรทีนอย โทโคฟีรอล ซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ แล้วยังประกอบด้วยสเตียรอลและฟอสโฟไลพิดอีกด้วย หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้วส่วนประกอบรองจะมีอยู่น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันปาล์ม

2.1.2.1 การหลอมเหลว

น้ำมันปาล์มประกอบด้วยของผสมของไตรเอซิลกลีเซอรอลหลายแบบ ก่อให้เกิดช่วงการหลอมเหลวมากกว่าที่เป็นจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิใดอุณหภูมิหนึ่ง ไตรเอซิลกลีเซอรอลบางตัวมีจุดหลอมเหลวสูง เช่น Tripalmitoylglycerol (PPP) จะมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียส และยังมีไตรเอซิลกลีเซอรอลตัวอื่นที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ เช่น Trioleoylglycerol (OOO) จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีการหลอมเหลวที่อุณหภูมิกลาง เช่น 1,3-Dipalmitoyl-2-Oleoylglycerol (POP) จุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เมื่อเป็นเช่นนี้ถ้าต้องการลดระดับของไขแข็งจะต้องทำการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น (Darmoko D; & Cheryan, M. 2002: 90-94)

2.1.2.2 การตกผลึก

เนื่องจากไตรเอซิลกลีเซอรอลประกอบด้วยกรดไขมันหลายชนิดซึ่งเมื่อมีการตกผลึกเกิดขึ้นอุณหภูมิจะอยู่ในช่วงที่อุณหภูมิที่ลดต่ำลงกว่าจุดหลอมเหลว แต่จะไม่ตกผลึกที่อุณหภูมิค่าใดค่าหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งการตกผลึกนี้จะส่งผลทำให้ระดับไขแข็งของน้ำมันปาล์มเพิ่มมากขึ้น

2.1.3 กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มทางอุตสาหกรรม

การสกัดน้ำมันปาล์มโดยที่กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การรับปาล์มสดที่โรงงาน การนึ่งปาล์ม การแยกผลปาล์มออกจากทะลาย การตีผลปาล์มให้แตกโดยเครื่องย่อย การนำไปเข้าไปเครื่องหีบเกลียวอัดเพื่อแยกน้ำมันและส่วนที่เป็นของแข็ง (เส้นใยและเมล็ด) ส่วนของแข็งจะถูกนำไปอบและแยกส่วนที่เป็นเมล็ดเพื่อนำมากะเทาะเอาเมล็ดในเพื่อส่งขายต่อไป น้ำมันปาล์มดิบมีสีแดงเมื่อผ่านกระบวนการกำจัดสีแล้ว โดยลักษณะเป็นของเหลวผสมกับส่วนที่เป็นของแข็งสีขาวหรือสีเหลือง ส่วนของเหลวด้านบน เรียกว่า ปาล์มโอลิอิน (Palm olein) ใช้เป็นน้ำมันพืชในการปรุงอาหาร ส่วนของแข็งด้านล่าง เรียกว่า ปาล์มสเตียริน (Palm stearin) นิยมใช้ทำเนยเทียม หรือไขมันผสม การใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม แสดงดังตาราง 5

ตาราง 5 สัดส่วนการใช้ประโยชน์น้ำมันปาล์มของอุตสาหกรรมต่างๆ

ประเภทอุตสาหกรรม	เปอร์เซ็นต์
อุตสาหกรรมเพื่อการการบริโภค	62.2
อุตสาหกรรมสบู่	9.2
อุตสาหกรรมของว่างและของคบเคี้ยว	8.6
อุตสาหกรรมบริโภคอื่นๆ เช่นพลาสติก	7.6
อุตสาหกรรมบะหมี่สำเร็จรูป	5.9
อุตสาหกรรมนมข้นหวานและนมจืด	4.4
อุตสาหกรรมครีมเทียม	1.3
อุตสาหกรรมเนยเทียม เนยขาว	1.0

ที่มา: ไตรทศ วงษาภักดี. (2545). *รายงานการวิจัย การทดสอบการติดของกัมเมื่อใช้น้ำมันไบโอดีเซลที่ได้จากปาล์มสเตอรินผสมน้ำมันดีเซล.* หน้า 46.

2.1.4 เทคนิคการแยกส่วนน้ำมันปาล์มสเตียริน แบ่งเป็น 3 วิธี (ไตรทศ วงษาภักดี. 2545: 52)

2.1.4.1 การแยกส่วนแบบแห้ง (Dry fractionation)

หลักการของการแยกผลึกแบบแห้ง คือการควบคุมอุณหภูมิให้เย็นลงโดยไม่มีการเติมสารเคมีใดๆ แล้วแยกส่วนของแข็งและของเหลวออกจากกันโดยการกรอง เป็นการแยกสารส่วนน้อยที่ไม่ต้องการ การใช้วิธีนี้จะให้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 35-40 ของน้ำมันปาล์ม ซึ่งข้อเสียของการแยกแบบนี้คือ การกรองแยกส่วนจะทำได้ยากที่อุณหภูมิต่ำ

2.1.4.2 การแยกส่วนโดยการใช้สารละลาย (Solvent fractionation)

การแยกส่วนด้วยตัวทำละลาย ทำการแยกส่วนโดยผสมน้ำมันกับตัวทำละลาย โดยตัวทำละลายช่วยให้ไขมันเจือจางแล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ จนตกผลึก ตัวทำละลายที่นิยมใช้ เช่น Acetone, Hexane, 2-Nitropropane จะเกิดการแยกส่วนที่อุณหภูมิต่ำ ได้ผลผลิตเฉลี่ยของปาล์มสเตียรินร้อยละ 20-30 ในทางกลับกัน ข้อเสียของการแยกส่วนโดยการการใช้ทำละลายจะต้องให้อุณหภูมิสูงทำให้สีและกลิ่นเปลี่ยนไป และต้นทุนของการผลิตสูงมากเนื่องจากราคาของตัวทำละลาย (Gonzalez, J.M.;& Rodrigvez, T. 2002: 443-450)

2.1.4.3 การแยกส่วนโดยใช้สารลดแรงตึงผิว (Infactent fractionation)

หลักการตะกอนแยกส่วนโดยเติมสารSurfactant เช่น Sodium lauyl sulphate, Sodium dodecyl sulfate (SDS) และสารอิเล็กโทรไลต์ เช่น Sodium sulfate, Magnesium sulfate ผลผลิตเฉลี่ยของปาล์มสเตียรินร้อยละ 20-30 ในทฤษฎีเกี่ยวกับปรากฏการณ์ของสารลดแรงตึงผิว อาศัยหลักการที่ว่าผลึกของน้ำมันจะถูกแทนที่ด้วยสารลดแรงตึงผิวโดยที่สารลดแรงตึงผิวและสารอิเล็กโทรไลต์จะสามารถดูดซับอยู่บริเวณผิวของสารทุกชนิด

2.1.5 การทำไขมันและน้ำมันให้บริสุทธิ์ มีขั้นตอนดังนี้ (รำไพ สิริมนกุล. 2543: 26)

2.1.5.1 กำจัดสารแขวนลอยต่างๆ ในน้ำมัน

การกำจัดสารแขวนลอยต่างๆ ในน้ำมัน ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ฟอสฟาไทด์ และน้ำ โดยการนำไขมันมาทำให้ร้อนแล้วตั้งทิ้งไว้ น้ำมันและวัตถุอื่นๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าก็จะตกลงด้านล่าง แล้วจึงกำจัดออกไป อีกวิธีหนึ่งคือการต้มไขมันที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส โดยมีตัวดูดซับแล้วทำการกรอง

2.1.5.2 กำจัดกรดไขมันอิสระ

การกำจัดกรดไขมันอิสระซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไลโปลิซิสทำได้โดยการให้น้ำมันทำปฏิกิริยากับด่าง ส่วนมากให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เติมลงไปในไขมันที่ต้มให้ร้อน คนอย่างแรงแล้วตั้งทิ้งไว้ กรดไขมันอิสระจะทำปฏิกิริยากับสบู่เมื่อตั้งทิ้งไว้สบู่จะจมลงจึงทำการแยกออก

2.1.5.3 กำจัดสีโดยการฟอกสี

วิธีเติมสารดูดซับสี เช่น ผงถ่าน หรืออาศัยปฏิกิริยาเคมี การฟอกสีนิยมใช้เบนโตไนด์ (Bentonite) ซึ่งเป็นโคลนฟอกสี (Bleaching clay) ประกอบด้วยแร่ montmorilonite ($Al_4\ Si_8O_2(OH)_4.nH_2O$) ไม่น้อยกว่า 85% โดยเติมในน้ำมันและให้ความร้อนภายใต้สภาวะสูญญากาศและทำซ้ำจนกระทั่งน้ำมันใส การฟอกสีนิยมทำภายใต้สูญญากาศ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งจะเกิดขึ้นถ้าทำการฟอกสีที่อุณหภูมิสูง อันจะทำให้น้ำมันมีสีเข้ม เบนโตไนต์กำจัดสีเขียว (Cholophyl) ได้ดีกว่าสีแดง (Carotene หรือ Xantophyl) ความร้อนอาจทำให้น้ำมันมีสีแดงเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของโทโคเฟอรอล (Tocopherol) เกิดเป็นโครมัน -5-6 ควิโนน (Chroman-5-6-quinone) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสีแดง ดังนั้นการฟอกสีอาจใช้ผงถ่าน (Charcoal) ร่วมกับเบนโตไนต์ เพื่อกำจัดสารสีแดงในน้ำมันมะพร้าวได้

2.1.5.4 การกำจัดกลิ่น

โดยการให้น้ำมันที่ร้อนไหลตกลงมาเป็นชั้นๆในหอสูญญากาศสวนทางกับไอน้ำร้อน ซึ่งเคลื่อนที่ในทิศทางตรงกันข้ามซึ่งจะทำให้สารที่ทำให้เกิดกลิ่นระเหยออกไป สารพวกนี้ได้แก่ แอลดีไฮด์ คีโตน เปอร์ออกไซด์ เป็นต้น

2.2 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปสมีชื่อเรียกตามระบบของ International Union of Biochemistry ว่ากลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) ซึ่งเป็นกลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในไขมัน และมีชื่อตามรหัส คือ EC.3.1.1.3 ซึ่งชื่อตามระบบนี้จะความหมายรวมถึง โมโนกลีเซอริเดสและบางครั้งก็มีความหมายถึง เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการเกิดกรดไขมันด้วย ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ โดยในระยะเริ่มแรกนั้นผลิตไลเปสได้จากเมล็ดพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง พบในอวัยวะ

ของสัตว์ ได้แก่ ตับอ่อนและของเหลวภายในเซลล์ เช่น น้ำนม แต่อย่างไรก็ตาม ไลเปสจากจุลชีพมีข้อดีกว่าไลเปสจากพืชหรือสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็วปัจจุบันนี้มีการนำ ไลเปสมาใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้นมากขึ้น เช่น อุตสาหกรรมอาหาร โดยจะมาใช้ในกระบวนการหมัก โดยที่นำไลเปสเนื่องจากจะทำหน้าที่ผลิตกลิ่นและรสในอาหารโดยมีรสเฉพาะตัวทำให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เช่น ผลิตภัณฑ์การทำเนยแข็ง เค้ก และช็อกโกแลต เป็นต้น

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ของไลเปส

การนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันนั้น ที่จะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ปัจจัยเหล่านั้นได้แก่

2.2.1.1 อุณหภูมิ

เอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเกิดขึ้นเนื่องจากโครงสร้างตติยภูมิเรียงตัวกันในทิศทางที่จะต้องจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณจับและบริเวณเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าระบบมีอุณหภูมิสูงกว่าสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์มีพลังงานมากเกินไปจะเกิดการสูญเสียของพันธะนอนโควาเลนท์ส่งผลทำให้เกิดแรงตึงผิวระหว่างอากาศกับน้ำไปทำลายโครงสร้างตติยภูมิของไลเปส ทำให้เอนไซม์ไลเปสเสียสภาพตามธรรมชาติและสูญเสียค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไป แต่ถ้ามีอุณหภูมิต่ำกว่าสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะทำให้มีพลังงานที่ต่ำทำให้เอนไซม์นั้นไม่สามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาได้เต็มที่ ดังนั้นการใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาจะส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสนั้นสามารถที่จะทำงานได้ดีที่สุด

จากรายงานการวิจัย พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Psudomonas fluorescens* และใช้ t – butanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตโมโนกลีเซอไรด์ร้อยละ 85-90 (Chen Wi Jech; & Wen Teng Wu. 2000: 180 -183)

ดังนั้น การนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ จะมีการศึกษาถึงคุณสมบัติการทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปสก่อนนำมาใช้งาน ได้มีการเปรียบเทียบให้เห็นถึงการทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ไลเปสจาก *Psudomonas fluorescens* และ *C.cylindracea* พบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Psudomonas fluorescens* สามารถทนความร้อนได้ดีกว่า *C.cylindracea* เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานกว่า 30 นาที กาเซีย (Garcia T; et al. 2006: 2841-2846)

ชิมาดะ ยูชิ (Shimada Yuji; et al. 1999: 133-142) ศึกษาวิจัยพบว่าผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันพืชโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิที่ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากทำปฏิกิริยาไป 6 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิปริมาณของเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นและเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสปริมาณของเอสเทอร์ที่มากที่สุดคือ 29.9 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจะทำให้ปริมาณเอสเทอร์ที่ได้ลดลง

2.2.1.2 ความจำเพาะเอนไซม์

ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น

เอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นกลุ่ม เป็นความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่มีต่อกลุ่มไขมัน (Lipid class specificity) คือสารตั้งตันที่เป็นโมโนหรือไดหรือไทรเอทิลกลีซอลรอล ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยามีของเอนไซม์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของไลเปส เช่นไลเปสจาก *Penicilium sp.*จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนกลีเซอรอลแต่ถ้าเมื่อสารตั้งต้นเป็นไดหรือไทรเอซิลกลีเซอรอลค่ากิจกรรมจะลดลง แต่ในความจำเพาะของไลเปส *Psudomonas fluorescens* นอกจากจะขึ้นอยู่กับกลุ่มของไขมันแล้วยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิด้วย

ความจำเพาะต่อตำแหน่ง

สามารถที่จะจำแนกเอนไซม์ไลเปสได้ 2 กลุ่มคือ

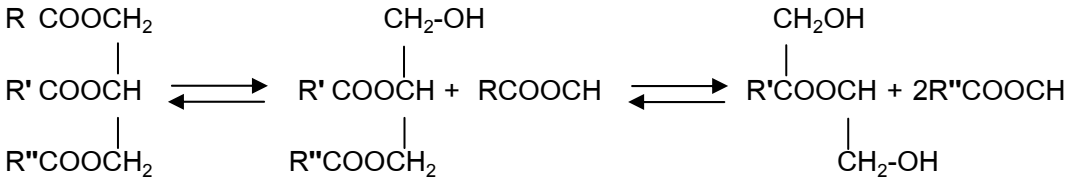
เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ซึ่งกลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไซด์ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารกึ่งกลาง (Intermediate) ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindrace, Corynebecterium acnes, Staphylococus aureus* และ *Psudomonas fluorescens*

เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

ภาพประกอบ 1 เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: ปวีณา อร่ามรัตนา. (2548). *เอนไซม์ทางอาหาร.* หน้า 56.

เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เมื่อไตรกลีเซอไรด์ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3) ไดกลีเซอไรด์และ 2 โมโนกลีเซอไรด์ แต่ 1,2 (2,3) ไดกลีเซอไรด์และ1,3 ไตรกลีเซอไรด์ไม่คงตัวถ้ามีการบ่มเป็นเวลานานพอจะเกิดขบวนการเอซิลไมเกรชัน (Acyl migration)ทำให้ได้ 2 โมโนกลีเซอรอลและจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger , Mucor javanicus, Rhizopus spp*. เป็นต้น



ภาพประกอบ 2 เอนไซม์ไลเปสชนิดที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุล ของไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: Malcata; et.al (1990). Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oil a Review. *JAOCS.* 67(2): 890-910.

ความจำเพาะต่อกรดไขมัน

กลไกของไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันชี้นอยู่กับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C_8) บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลาง (C_8-C_{14}) และบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดยาว (ตั้งแต่ C_{14}เป็นต้นไป) อัตราการไฮโดรไลซ์กรดไขมันชนิดต่างๆ ของไลเปสแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น ไลเปสจาก *Candida paralipolytica* สามารถไฮโดรไลซ์ไตรคาไพริน (Tricaprylin ,C_{10}) ได้เร็วกว่าแต่ไฮโดรไลซ์พวกเมธิลบิวทีเรท (Metyl butyrate ; $C_{4:0}$) ; เมธิลคาโพรเอท (Metyl caproate ; $C_{8:0}$) และโมโนโอลิอิน (Monoolein) ได้ค่อนข้างช้า แสดงว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida paralipolytica* นี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลางมากกว่าขนาดสั้นและขนาดยาว

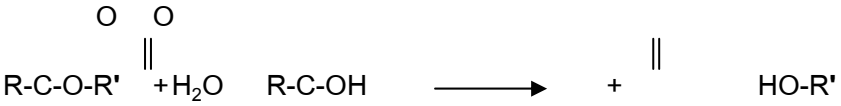
ความจำเพาะต่อสเทอริโอเคมี

สารสเทอริโอเคมีเป็นสารประกอบที่มีลำดับของพันธะโควาเลนต์มีตำแหน่งสลับกันและพบว่า ไลเปสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสเทอริโอเคมีแตกต่างกัน เช่น ไลเปสจากตับคนที่มีความจำเพาะที่ Sn-3 สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง Sn-1 เช่นไลเปสจาก *Humicola langginosa* และ *P. fluoroscens* เป็นต้น

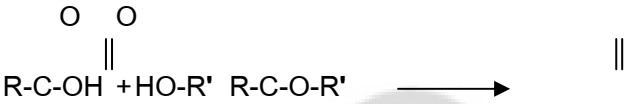
ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยากับกรดไขมันได้หลายลักษณะดังนี้

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นปฏิกิริยาที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ



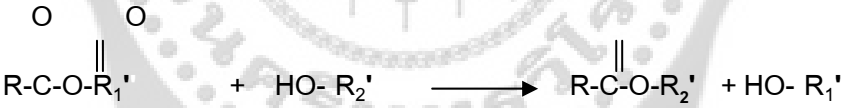
ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน เป็นปฏิกิริยาที่สร้างพันธะเอสเทอร์กลับคืนมา



ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นปฏิกิริยาที่สังเคราะห์เอสเทอร์ของกรดไขมัน สามารถแบ่งเป็น 4 ปฏิกิริยาย่อยดังนี้ (อภิชาต สุขสำราญ. 2545: 78)

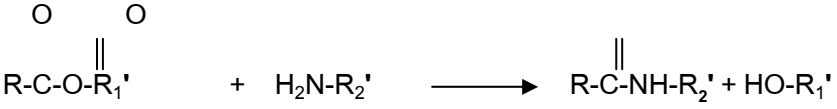
Acidolysis

Alcoholysis



Esterexchange (interesterification)

Aminolysis



ปฏิกิริยาเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้พร้อมกัน แต่จะเกิดปฏิกิริยาใดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมและปริมาณสาร เช่น ถ้ามีน้ำอยู่ในปฏิกิริยามาก (มีค่าa_wสูง) จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดี แต่ในการผลิตไบโอดีเซลจะไม่ต้องการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพราะจะไปแข่งขันกับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จึงจำเป็นต้องจำกัดปริมาณน้ำหรือลดปริมาณให้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามไม่สามารถลดปริมาณน้ำทั้งหมดลงได้ เพราะเอนไซม์จะทำงานในระบบได้จำเป็นต้องมีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้อง

2.2.1.3 ปริมาณของเอนไซม์

ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณของสารตั้งต้น และความว่องไวของเอนไซม์ต่อการทำงานในสภาวะที่ศึกษา โดยปกติเมื่อปริมาณของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอัตราการเร่งปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสจะสูงขึ้นด้วย แต่เมื่อปริมาณเอนไซม์สูงกว่าระดับที่เร่งปฏิกิริยาพอดีกับสารตั้งต้น จะมีผลทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นคงที่ ดังนั้นต้องทำการศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา เพื่อไม่ให้เกิดการสิ้นเปลืองจากการใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ไม่เหมาะสม

2.2.1.4 วัตถุดิบ

โดยธรรมชาติแล้วไตรกลีเซอรอลที่ไม่ละลายในน้ำเป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะสำหรับไลเปสซึ่งอาจมีการจับกันอยู่ในรูปฟิล์มโมเลกุลชั้นเดียว ไมเซล (Micelles) หรืออิมัลชัน ถ้ามีปริมาณน้ำในสารตั้งต้นมากเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกลายเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแทนทำให้ได้โมโนกลีเซอไรด์ต่ำ

2.2.1.5 การถ่ายเทมวลสาร

อัตราเร็วการเขย่าสารมีผลต่อการกระจายตัวและการถ่ายเทมวลสารของเอนไซม์ (Mass transfer)ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับปริมาณสารในระบบด้วย กรณีที่มีสารอยู่ในระบบน้อยอาจจะใช้ความเร็วรอบในการเขย่าต่ำก็ได้หรือกรณีที่สารในระบบมีปริมาณมากขึ้น จะต้องใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่มากขึ้น การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ปฏิกิริยาที่มีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจาก 100 เป็น 200 รอบต่อนาทีปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 250 - 300รอบต่อนาทีปฏิกิริยาจะเกิดได้ช้าลง การใช้ความเร็วรอบในการเขย่านั้นมีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากถ้าใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่สูงเกินไปจะทำให้อากาศเข้าไปในสารละลายไลเปสระหว่างการเขย่า ทำให้เอนไซม์นั้นเกิดการออกซิเดชันส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

ความเร็วรอบการเขย่าจะกระทบต่อการถ่ายเทมวลของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป จึงมีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปริมาณเอสเทอร์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จากการศึกษาความเร็วในการกวนที่แตกต่างกันคือ ที่ความเร็วรอบ 150, 250 และ300 รอบต่อนาทีความเร็วรอบการเขย่าจะกระทบต่อการถ่ายเทมวลของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป จึงมีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปริมาณเอสเทอร์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จากการศึกษาความเร็วในการกวนที่แตกต่างกันคือ ที่ความเร็วรอบ 150, 250 และ300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันพืช พบว่าช่วงแรกปริมาณเอสเทอร์เพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วรอบการกวนเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเร็วรอบสูงกว่า 250 รอบต่อนาที ปริมาณของเอสเทอร์กลับลดลง นอร์เดรดินี เอช และคณะ (Noureddini. H; et al. 2005: 769–777)

2.2.2 การตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

สารตั้งต้นที่นิยมนำมาใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์นั้น คือ ไตรกลีเซอไรด์ซึ่งไม่สามารถละลายน้ำได้ ไตรกลีเซอไรด์นิยมหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสควรที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิที่จะทำการศึกษา เนื่องจากการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นของแข็งนั้นจะเกิดขึ้นช้ามาก เพื่อความสะดวกจึงนิยมใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้น เนื่องจากการใช้ไตรกลีเซอไรด์บริสุทธิ์มีราคาแพงกว่ามาก เราจึงทำให้อยู่ในรูปของอิมัลชันของน้ำมันมะกอก

วิธีอย่างง่ายในการทำการตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทำได้โดยการไตเตรทหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาที่มีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยที่ไตรกลีเซอไรด์เป็นสารตั้งต้น หลังจากการบ่มและทำการหยุดปฏิกิริยาแล้ว การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไฮโดรไลซิส โดยทั่วไปจะใช้กัมอราบิก (Gum arabic) เติมลงไปเพื่อผสมน้ำกับน้ำมันเข้าด้วยกัน อย่างไรก็ตามวิธีอื่นในการใช้ตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสนอกเหนือจากการไตเตรทกรดไขมัน เช่น Polarimetric, Colorimetric และ Fluorometric ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา

2.2.3 การใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล

การใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลสามารถทำได้สองวิธี คือ การใช้แบคทีเรียทั้งตัวเพื่อผลิตเอนไซม์ในกระบวนการ (Intracellular enzyme) การสกัดเอนไซม์บริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการผลิต (Extracellular enzyme) ซึ่งการนำเอนไซม์มาใช้จะมีทั้งการใช้ในรูปของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึง ส่วนใหญ่แล้วจะมีการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงมากกว่าเนื่องจากสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง และเอนไซม์ยังสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ดีกว่า แต่การตรึงเอนไซม์ทำให้มีการสูญเสียค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไปบางส่วนเช่นกัน

เชน และเวน (Chen; & Wen. 2003: 466-469) ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับเมทานอล, เอทานอล, n-propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol ,tert-butanol โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica*ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างคือ 1:3 พบว่าแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือเมทานอลมีค่าคอนเวอร์ชันเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์

ทอเรส คาร์ลอส และคณะ (Torres Carlos; et al. 2005: 107-116) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือ เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* และทำการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิส พบว่ากรณีที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์จะให้ค่าคอนเวอร์ชันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำมันดอกทานตะวันต่อเมทานอลเท่ากับ 1 : 4.5 และใส่เอนไซม์ตรึงรูปลงในน้ำมันประมาณ 5 ชั่วโมงก่อนที่จะใส่เมทานอลลงไป

ลิปโค และคณะ (Linko; et al. 1998: 41-50) ได้ทำการศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เมล็ดเรปและแอลกอฮอล์คือ 2-ethyl-1-hexanol มาทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* พบว่ามีปริมาณของเอสเทอร์เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

วู ดับเปิลยู เอช และคณะ (Wu,W.H; et al. 1999: 517-521) ได้ทำการศึกษาการนำน้ำมันที่ใช้แล้วจากภัตตาคารมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันกับเอทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสจาก *P. cepacia* และ *C. antarctica* พบว่าได้ปริมาณของเอสเทอร์เท่ากับ 85.4 เปอร์เซ็นต์

เซลมิซาย บี และ โทมัส ดี (Selmi Sei.B; & Thomas, D. 1998: 1372-1378) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันจากเมล็ดทานตะวันร่วมกับเอทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือ เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* พบว่าปริมาณของเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับ 83 เปอร์เซ็นต์

นอร์เดรดินี เอช และคณะ (Noureddini. H; et al. 2005: 769-777) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลและเอทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Pseudomonas cepacia* และทำการตรึงรูปโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปด้วยวิธีห่อหุ้มโดยมี sol-gel เป็นสารห่อหุ้มใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อเมทานอลคือ 1:7.5 และอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อเอทานอลคือ 1:15.2 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์และเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์

ไทซิ ซามุกาวา และคณะ (Taichi; et al. 2000: 180-183) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของการตรึงรูปเอนไซม์จาก *Candida antarctica* ในปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลโดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

ซิมาดะ และคณะ (Shimada; et al 1999: 133-142) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันพืชโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิที่ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากทำปฏิกิริยาไป 6 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ ปริมาณของเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นและเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาณของเอสเทอร์ที่มากที่สุดคือ 29.9 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจะทำให้ปริมาณเอสเทอร์ลดลง

คามินิ และ เลฟูจิ (Kamini; & Lefuji. 2001: 405-410) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิลจากน้ำมันรำข้าวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำการทดลองที่อุณหภูมิที่ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของเอสเทอร์ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่วนเวลาที่ใช้ในกากรทดลอง 96 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอสเทอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 62.3 เปอร์เซ็นต์และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจะทำให้ปริมาณเอสเทอร์ลดลง

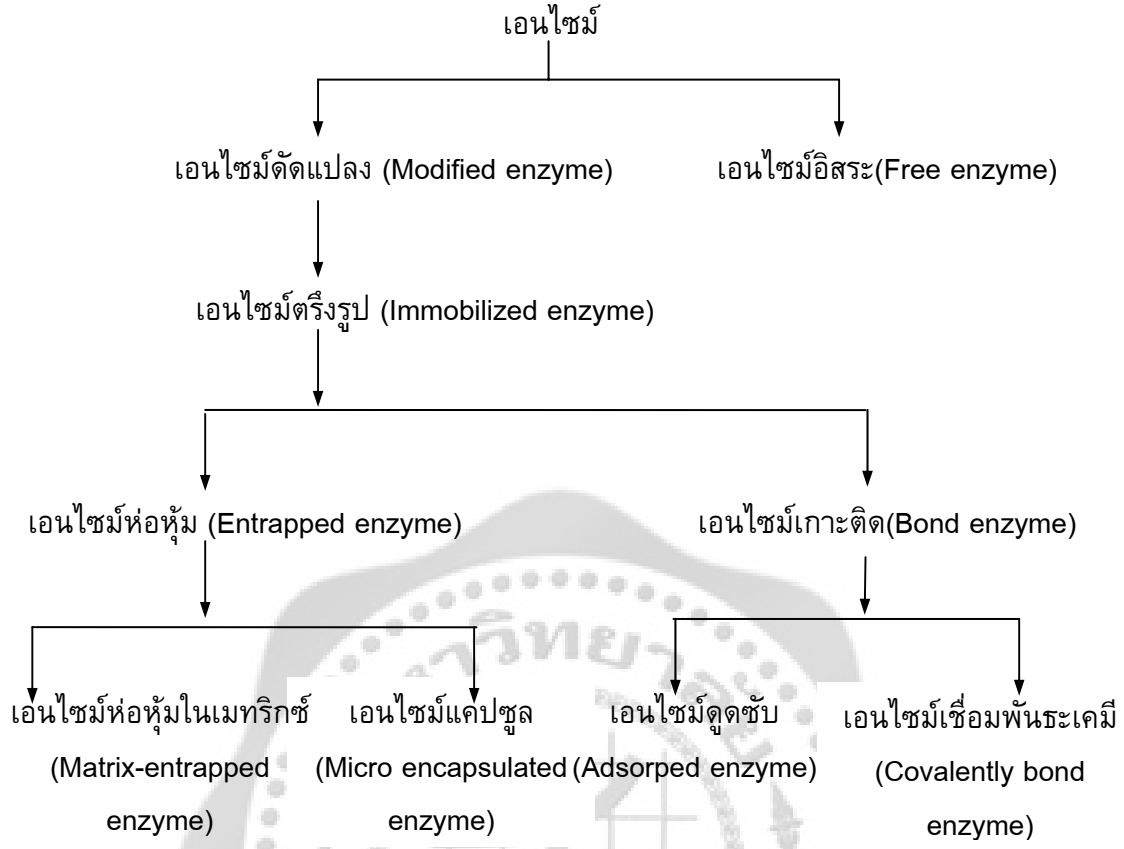
วันตานาบิ และคณะ (Watanabe; et al. 2002: 151-155) ทำการศึกษาปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการแยกดีกัมกับเมทานอลร่วมกับคลอโรฟอร์มโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ตรึงรูปจาก *Candida antarctica* โดยมีการเติมเมทานอล พบว่า ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 93.2 เปอร์เซ็นต์

เอล รัสซี, เอเลน เปอร์ราด และเอเลน (El Rassy; Alain Perrard; & Alain. 2004:137-150) ได้ทำการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Burkholderia cepacia* โดยใช้เทคนิคการตรึงรูปแบบห่อหุ้มใช้สารห่อหุ้มคือ Sillica aerogelและทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระกับเอนไซม์ตรึงรูปและทำการศึกษาจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปส

โดสเสด และคอมเบส (Dossat; & Combes. 2002: 90-94) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิสของน้ำมันดอกทานตะวันโดยอาศัยเอนไซม์ตรึงรูปในสารละลายอินทรีย์ n-hexane ใช้แบบจำลอง Ping-pong Bi Bi อธิบายจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน พบว่า เมื่อใช้น้ำมันดอกทานตะวันในอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันดอกทานตะวันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 จะให้ปริมาณเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์

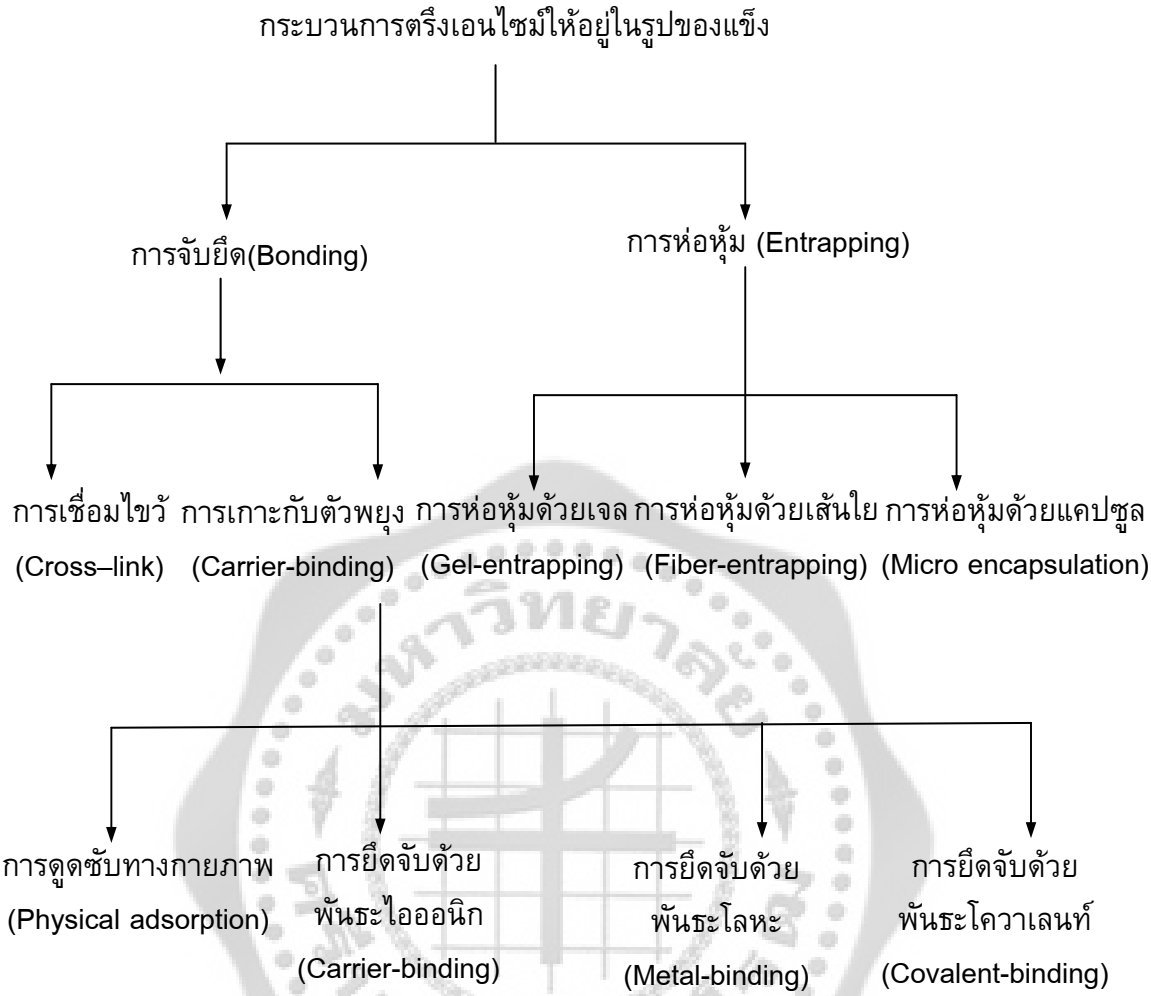
2.2.4 การตรึงเอนไซม์ (Immobilized Enzyme)

เอนไซม์เป็นสารชีวโมเลกุลจำพวกโปรตีน และทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต โดยเอนไซม์มีสมบัติต่างจากตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีทั่วไปหลายอย่าง เช่น มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น สามารถทำเร่งปฏิกิริยาได้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง เป็นต้น แต่ในความเป็นจริงพบว่าการนำเอนไซม์มาใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมไม่นิยมเท่าที่ควรเพราะเอนไซม์มีความคงตัว และกระบวนการสกัดเอนไซม์ยังมีต้นทุนที่สูง, เอนไซม์อิสระนั้นไม่เสถียร, เอนไซม์อิสระนั้นไม่สามารถที่จะแยกเอนไซม์อิสระออกจากผลิตภัณฑ์ได้ยาก เอนไซม์อิสระไม่สามารถนำมาใช้ได้ในเครื่องปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องและเอนไซม์ไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้ จากข้อจำกัดของการใช้หากนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมจะทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูงไปด้วย ดังนั้นจึงมีแนวความคิดที่จะพัฒนาให้มีการนำเอนไซม์สามารถทำการเร่งปฏิกิริยาได้หลายๆ ครั้ง เอนไซม์ทั่วไปมี 2 รูป คือ เอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์เดิมและเอนไซม์ดัดแปลง กรณีของเอนไซม์ดัดแปลงซึ่งในกระบวนการที่จะทำการตรึงเอนไซม์มีอยู่ด้วยกันหลายกระบวนการโดย แต่ละกระบวนการมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ต้องคำนึงถึงการนำไปใช้งาน มีลักษณะงานและสารตั้งต้นซึ่งกระบวนการตรึงเอนไซม์สามารถแสดงดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 การจำแนกประเภทของเอนไซม์ตรึงรูป

ที่มา: ภาวิณี คณาสวัสดิ์; และด้วง พุธศุกร์. (2527). *การสังเคราะห์เมทิลและเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยวิธีทางเคมีและทางเอนไซม์*. หน้า 55.



ภาพประกอบ 4 กระบวนการตรึงรูปเอนไซม์ให้อยู่ในรูปของแข็ง

ที่มา: ภาวิณี คณาสวัสดิ์; และด้วง พุธศุกร์. (2527). *การสังเคราะห์เมทิลและเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยวิธีทางเคมีและทางเอนไซม์.* หน้า 55.

2.2.4.1 การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีกักหรือห่อหุ้ม (Entrapping method)

วิธีการกักหรือห่อหุ้มเป็นการตรึงเอนไซม์อิสระไว้ในช่องว่างของตาข่ายโพลิเมอร์ หรือกักเอนไซม์อิสระไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้มีสารซึมผ่านได้บ้าง (Semipermeable membrane) เช่น สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ผ่านเข้าออกได้ แต่จะกักเอนไซม์ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่ามากไว้ภายใน เช่น การใช้ Ultramembrane filter ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการตรึงเอนไซม์โดยการกักเหมือนกันเพราะเอนไซม์ถูกจำกัดโดยเมมเบรนให้อยู่ในบริเวณหนึ่งเท่านั้น แต่ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีโมเลกุลเล็กกว่าสามารถผ่านเมมเบรนออกไปได้ สามารถแบ่งเป็นการตรึงเอนไซม์โดยวิธีการกักหรือห่อหุ้มออกเป็น 3 ประเภท คือ การกักเอนไซม์ในช่องตาข่าย (Lattice type) การกักเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก

(Microcapsule type)และการกักเอนไซม์ด้วย Ultramembrane การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้แตกต่างจากวิธีเชื่อมพันธะโควาเลนต์และวิธีเชื่อมขวาง กล่าวคือ เอนไซม์ไม่เชื่อมพันธะเคมีใดๆ กับสารที่กักหรือห่อหุ้ม ทำให้ได้เอนไซม์ที่สมบัติเหมือนกับเอนไซม์ที่อยู่อย่างอิสระในสารละลาย ดังนั้นจึงนิยมใช้วิธีนี้อย่างแพร่หลายแม้ว่าปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดสารโพลิเมอร์สำหรับห่อหุ้มนั้นต้องการภาวะที่รุนแรง อาจส่งผลกระทบต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องเลือกภาวะที่มีผลกระทบน้อยที่สุด จะสังเกตได้ว่าการกักเอนไซม์นั้นเหมาะสมสำหรับเอนไซม์ที่มีสับสเตรทโมเลกุลเล็กพอที่จะผ่านรูพรุนของ โพลิเมอร์หรือเยื่อหุ้มของไมโครแคปซูลได้โดยแบ่งเป็น 3 วิธีหลักๆ ดังนี้

วิธีกักเอนไซม์ในช่องตาข่าย (Lattice type)

วิธีห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)

วิธีกักด้วยอัลตราเมมเบรน (Ultramembrane)

2.2.4.2 วิธีกักเอนไซม์ในช่องตาข่าย (Lattice type)

การกักเอนไซม์ในช่องตาข่ายของโพลิเมอร์ไม่ละลายน้ำ ทำได้โดยผสมเอนไซม์เข้ากับสารที่ใช้กักในขณะที่กำลังจะเกิดโพลิเมอร์ โมเลกุลของเอนไซม์จะถูกห่อหุ้มด้วยช่องตาข่ายอย่างสม่ำเสมอทุกช่องอย่างช้าๆ การตรึงรูปเอนไซม์ลักษณะนี้จะส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของโปรตีนเอนไซม์โดยตรง เนื่องจากสารที่กำลังรวบตัวเป็นโพลิเมอร์

โพลิเมอร์ที่มีการนำมาใช้กักเอนไซม์คือ แคปปาคาราจินาน (k-carragenan) และโซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) สารทั้งสองเป็นโพลิเมอร์ละลายโดยการต้มที่ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำเอนไซม์มาผสมให้เข้ากันดี เมื่อลดอุณหภูมิลงโพลิเมอร์จะแข็งตัวและกักเอนไซม์ไว้ภายในโซเดียมอัลจิเนตมีลักษณะพิเศษคือ ต้องการแคลเซียมไอออนเป็นตัวรักษาสภาพโพลิเมอร์ให้เสถียรไว้ กรณีของโซเดียมอัลจิเนตนั้นทำได้โดยการหยดสารละลายผสมระหว่างอัลจิเนตกับเอนไซม์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จะได้เม็ดของโพลิเมอร์ ลักษณะทรงกลมเหมือนไข่ปลา สามารถเก็บไว้ใช้งานต่อไป

ตาราง 6 โพลิเมอร์โมโนเมอร์และสารเชื่อมขวางที่ใช้ในการห่อหุ้มเอนไซม์

Natural polymer	Monomer
Starch matrix	Acrylamide
Mannan	Acrylamide and Acrylic acid
α-carrageenan	Acrylamide and Hydroxyethylmethacrylate

ตาราง 6 (ต่อ)

Ca-alginate	Acrylamide,N,N-dimethylaminoethylmethacrylate and Polyethyleneglycolmethacrylate
Gelatin	
Collagen	
Chitin	
Polymer	Prepolymer
Polyvinyl alcohol	ENT and ENTP (photocrosslinkable) prepolymer
Cellulose acetate	Urethane propolymer

ที่มา: Chaplin; & Bucke. (1999). *Enzyme Technology.* p. 250.

สารเชื่อมขวางระหว่างสายโพลิเมอร์ ได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์และสารอื่นๆ ตามความเหมาะสมของชนิดโพลิเมอร์สังเคราะห์และพันธะเคมีที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างช่องตาข่าย (Lattice) ระหว่างสายตรงของโพลิเมอร์ จะได้ช่องตาข่ายที่สม่ำเสมอและคงตัว เราสามารถควบคุมความแข็งและรูพรุนของร่างแหโพลิเมอร์ได้ การเปลี่ยนอัตราส่วนของโมโนเมอร์โพลิเมอร์ธรรมชาติไม่นิยมใช้สารเชื่อมขวาง เนื่องจากช่องตาข่ายในโพลิเมอร์ธรรมชาติสามารถเกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องใช้ตัวเชื่อมกล่าว คือ ช่องตาข่ายของสายโพลิเมอร์ธรรมชาติจะอยู่ในลักษณะช่องตาข่ายแบบกายภาพ ซึ่งเกิดจากสายสาขาของโพลิเมอร์ธรรมชาติจับเรียงตัวไม่เป็นระเบียบเกิดช่องตาข่ายขึ้นเอง

อัลจิเนตเป็นสารโพลิเมอร์ที่นิยมมาใช้ในการตรึงรูป เนื่องจากเป็นสารโพลิเมอร์ที่มีราคาถูกและเป็นสารธรรมชาติที่ไม่มีพิษ ซึ่งอัลจิเนตเป็นสารโพลิเมอร์เชิงเส้นที่เป็นประจุลบ ซึ่งประกอบด้วย 1,4-linked β-D-mannuronic acid และ α-L-guluronic acid ในสัดส่วนและมีการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกันออกไปและมีการดักจับเอนไซม์ไว้ภายในเม็ดแคปซูล ทำได้โดยวิธีการหยดสารละลายกระด้างของเกลือ Ca^{2+} ซึ่งตัวของประจุบวกจะทำหน้าที่เป็นสารเชื่อมไขว้ (Cross linking agent) ผ่านอัลจิเนตจนตกตะกอนโดยที่เอนไซม์จะถูกดักจับไว้ภายในช่องว่างตาข่ายของอัลจิเนต

2.2.4.3 วิธีห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)

เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์โดยสร้างเยื่อหุ้มกึ่งซึม (Semipermeable membrane) ล้อมรอบเอนไซม์ในแคปซูลที่มีขนาดเล็กมาก (Microcapsule) โดยใช้ Nylon หรือ Colldion ที่มีขนาดและความพรุนตามที่กำหนด ให้อยู่ในสารละลายเอนไซม์เกิด Emulsified droplete สารละลายเอนไซม์เอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีนี้ ได้แก่ Carbonic anhydrase, L-asparaginase, β-galactosidase, Catalase และ Urease

วิธีทำแคปซูลเล็กเพื่อห่อหุ้มเอนไซม์ สามารถแบ่งตามลักษณะการเกิดโพลิเมอร์ได้ 3 วิธีคือ

วิธีการเกิดโพลิเมอร์ระหว่างชั้น (Interfacial polymerization method)

เป็นวิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยโพลิเมอร์ซึ่งทำเป็นแผ่นบาง สารสามารถซึมผ่านได้เพียงบางส่วน การทำแคปซูลจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเกิดโพลิเมอร์ซึ่งเกิดจากโมโนเมอร์ต่างชนิดกัน 2 อย่าง คือ โมโนเมอร์ชอบน้ำ (Hydrophilic monomer) และโมโนเมอร์ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic monomer) การเกิดโพลิเมอร์ระหว่างชั้น (Interfacial polymerization

ขั้นตอนการเกิดแคปซูลเล็กแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

ก. การเกิดอิมัลชัน (Emulsification)

ทำให้สารละลายเอนไซม์และโมโนเมอร์ชอบน้ำเป็นอิมัลชันกระจายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เบนซีน ไซโคลเฮนเซน คลอโรฟอร์ม เป็นต้น ทำการรบกวนตลอดเวลาจนอิมัลชันคงตัวได้นานและละเอียด

ข. การเกิดโพลิเมอร์ระหว่างชั้น (Interfacial polymerization)

เติมโมโนเมอร์ไม่ชอบน้ำซึ่งละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ กวนให้สม่ำเสมอตลอดเวลาจนกระทั่งเกิดโพลิเมอร์ของโมโนเมอร์ทั้งสองชนิด ซึ่งคั่นด้วย ตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำ โพลิเมอร์จะเกิดขึ้น ถ้าสัดส่วนของตัวถูกละลายทั้งหมดพอดี ส่วนของตัวถูกละลายส่วนเกิดจะถูกแยกออกไป

ค. การแยกโมโนเมอร์ที่ไม่ทำปฏิกิริยา

แยกส่วนของโมโนเมอร์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาการสร้างโพลิเมอร์รอบเอนไซม์ไม่ว่าเป็นโมโนเมอร์ชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำ จะได้ส่วนที่เหลือคือ Enzyme droplet แขวนลอยในตัวทำละลายอินทรีย์

ตาราง 7 โมโนเมอร์ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำและโพลิเมอร์

โมโนเมอร์ชอบน้ำ	โมโนเมอร์ไม่ชอบน้ำ	โพลิเมอร์
Polyamine	Polybasic acid chloride	Polyamide
	Bishaloformate	Polyurethane
	Polyisocyanate	Polyurea
Glycol, Polyphenol	Polybasic acid chloride	Polyester
	Polyisocyanate	Polyurea

ที่มา: Chaplin; & Bucke. (1999). *Enzyme Technology*. p. 255.

วิธีการเกิดโพลิเมอร์โดยการทำแห้ง (Liquid drying method)

วิธีการทำแคปซูลเล็กของเอนไซม์โดยการทำให้สารโพลิเมอร์แห้งในขณะเกิดแคปซูลเล็กของเอนไซม์ขั้นตอนการเกิดแคปซูลเล็กแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

ก. การเกิดอิมัลชันครั้งที่ 1 (1st Emulsion)

ละลายโพลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์จนเป็นเนื้อเดียวกัน (ตัวทำละลายอินทรีย์นี้ต้องไม่ละลายในน้ำ) จากนั้นกระจายสารละลายเอนไซม์ลงในสารละลาย โพลิเมอร์เกิดเป็นอิมัลชันในลักษณะของหยดน้ำกระจายในน้ำมัน (Water in oil) เรียกอิมัลชันครั้งที่ 1 (ชั้น 1)

ข. การเกิดอิมัลชันครั้งที่ 2 (2nd Emulsion)

เติมสารลดแรงตึงผิว (Sulfactants หรือ Sulface actice agent) ได้แก่ เจลาติน โพลิไวนิลแอลกอฮอล์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อช่วยรักษาการเกิดคอลลอย์ในลักษณะของการเกิดอิมัลชันครั้งที่ 2 (ชั้น 2) ที่คงตัวกว่า คือ เกิดอิมัลชันแบบหยดน้ำมันกระจายในน้ำ (Oil in water) เมื่อกวนเรื่อยๆ จะยิ่งทำให้ส่วนของโพลิเมอร์ในชั้นของผิวอิมัลชันครั้งที่ 2 (ชั้น 2) เข้มข้นสูงจนเกิดฟิล์มแข็งคงตัวขึ้น เป็นแคปซูลเล็กของเอนไซม์

ค. การทำแห้ง (Drying vacuum)

แยกส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป โดยการระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ จะช่วยรักษาสภาพธรรมชาติของโพลิเมอร์ให้คงตัว

การทำแคปซูลเล็กด้วยวิธีนี้ มีข้อควรพิจารณาคือ การควบคุมให้เกิดอิมัลชันครั้งที่ 2 หรือชั้นที่ 2 นั้นปกติกระทำได้ยาก จึงต้องเลือกสารลดแรงตึงผิวที่จะช่วยรักษาความคงตัวของคอลลอยด์ให้เหมาะสม และในขั้นตอนการทำแห้งอาจทำการแยกตัวทำละลายอินทรีย์ออกได้ยาก เพราะตัวทำละลายอินทรีย์อาจรวมตัวกับสารลดแรงตึงผิว ตัวอย่างของโพลิเมอร์ ได้แก่ Ethyl cellulose, Polystyrene และ Polyethylene เป็นต้น ตัวอย่างของตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เบนซีน ไซโคลเฮกเซน และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น

วิธีแยกชั้น (Phase separation method)

วิธีนี้คล้ายกับวิธีการเกิดโพลิเมอร์โดยการทำแห้งสามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

ก. การเกิดอิมัลชัน (Emulsification)

ละลายโพลิเมอร์ด้วยทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1 และทำให้สารละลายเอนไซม์กระจายเป็นอิมัลชันในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 1 และโพลิเมอร์ โดยอยู่ในลักษณะของอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (Water in oil emulsion) ต้องกวนอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา

ข. การแยกชั้น (Phase separation)

ทำให้สารละลายโพลิเมอร์แยกเป็น 2 ชั้น โดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 2 ซึ่งรวมอยู่กับตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1 ได้ดี แต่ไม่ละลายโพลิเมอร์ ดังนั้นถ้าเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 2 ลงไปทีละน้อยพร้อมกับกวนตลอดเวลา ซึ่งจะไปรวมตัวกับตัวทำละลายตัวที่ 1 ส่งผลทำให้สารละลายโพลิเมอร์ถูกแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นในที่มีความเข้มข้นโพลิเมอร์สูง ซึ่งก็คือส่วนโพลิเมอร์ที่ล้อมรอบ Enzyme droplet กลายเป็นเยื่อบางห่อหุ้มเอนไซม์ไปในที่สุด ส่วนชั้นนอกที่อยู่ห่าง Enzyme droplet ออกไป จะมีสารโพลิเมอร์ความเข้มข้นต่ำ ไม่สามารถกลายเป็นเยื่อบางได้

ค. การแทนที่ตัวทำละลาย (Solvent substitution)

เมื่อมีการเติมตัวทำละลายตัวที่ 2 และกวนตลอดเวลา จนกระทั่งเกิดการแทนที่ของตัวทำละลายอย่างสมบูรณ์ ส่วนของฟิล์มโพลิเมอร์จะค่อยๆ แข็งตัวขึ้น

การทำแคปซูลเล็กในลักษณะการแยกชั้นจะต้องระมัดระวังในช่องของการทำแยกชั้นและการแทนที่ตัวทำละลายเพื่อมิให้ส่วนของโพลิเมอร์ตกตะกอนแยกออกมา รวมทั้งต้องแยกตัวทำละลายที่เหลือในโพลิเมอร์ออกให้หมด จึงจะได้แคปซูลเอนไซม์ที่คงตัว

วิธีนี้ได้มีการนำมาใช้ตรึงรูปแอสปาราจิเนส ยูริเอส แคทาเลส และยังมีการทดลองทำแคปซูลร่วมกับการดูดซับทางกายภาพบนซิลิกาเจล

วิธีห่อหุ้มด้วยอัลตราเมมเบรน (Ultramembrane)

การใช้อัลตราเมมเบรนในการกักเอนไซม์ จะพบในเครื่องปฏิกรณ์ชนิดต่างๆ ที่ต้องการให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในระบบต่อเนื่อง (Continuous process) โดยสามารถเลือกใช้อัลตราเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาดต่างๆ กัน (ปกติมีช่วงของ Molecular weight cut off ตั้งแต่ 500 ไปจนถึง 200,000) ตัวอย่างอุปกรณ์สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลส โดยการกักเอนไซม์เซลลูโลสให้อยู่ภายในเครื่องปฏิกรณ์ด้วยอัลตราเมมเบรน วิธีการใช้อัลตราเมนเบรนสามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

ก. การเกิดอิมัลชัน (Emulsification)

ละลายโพลิเมอร์ด้วยทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1 และทำให้สารละลายเอนไซม์กระจายเป็นอิมัลชันในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 1 และโพลิเมอร์ โดยอยู่ในลักษณะของอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (Water in oil emulsion) ต้องกวนอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา

ข. การแยกชั้น (Phase separation)

ทำให้สารละลายโพลิเมอร์แยกเป็น 2ชั้น โดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 2 ซึ่งรวมอยู่กับตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1 ได้ดี แต่ไม่ละลายโพลิเมอร์ ดังนั้นถ้าเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 2 ลงไปทีละน้อยพร้อมกับกวนตลอดเวลา ซึ่งจะไปรวมตัวกับตัวทำละลายตัวที่ 1 ส่งผลทำให้สารละลายโพลิเมอร์ถูกแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นในที่มีความเข้มข้นโพลิเมอร์สูง ซึ่งก็คือส่วนโพลิเมอร์ที่ล้อมรอบ Enzyme droplet กลายเป็นเยื่อบางห่อหุ้มเอนไซม์ไปในที่สุด ส่วนชั้นนอกที่อยู่ห่าง Enzyme droplet ออกไป จะมีสารโพลิเมอร์ความเข้มข้นต่ำ ไม่สามารถกลายเป็นเยื่อบางได้

ค. การแทนที่ตัวทำละลาย (Solvent substitution)

เมื่อมีการเติมตัวทำละลายตัวที่ 2 และกวนตลอดเวลา จนกระทั่งเกิดการแทนที่ของตัวทำละลายอย่างสมบูรณ์ ส่วนของฟิล์มโพลิเมอร์จะค่อยๆ แข็งตัวขึ้น

การทำแคปซูลเล็กในลักษณะการแยกชั้นจะต้องระมัดระวังในช่องของการทำแยกชั้นและการแทนที่ตัวทำละลายเพื่อมิให้ส่วนของโพลิเมอร์ตกตะกอนแยกออกมา รวมทั้งต้องแยกตัวทำละลายที่เหลือในโพลิเมอร์ออกให้หมด จึงจะได้แคปซูลเอนไซม์ที่คงตัว ตาราง 8 แสดงโพลิเมอร์และตัวทำละลายที่ใช้ในการทำแคปซูลเล็กแบบแยกชั้น

ตาราง 8 โพลิเมอร์และตัวทำละลายที่ใช้ในการทำแคปซูลเล็กแบบแยกชั้น

โพลิเมอร์	ตัวทำละลายอินทรีย์ 1	ตัวทำละลายอินทรีย์ 2
Ethylcellulose	Carbon tetrachloride	Petroleum ether
Nitrocellulose	Ether	Butyl benzoate
Polystyrene	Xylene	Petroleum ether
Polyethylene	Xylene	Amyl chloride
Polyvinyl acetate	Chloroform	Petroleum ether
Polymethylmethacrylate	Chloroform	Petroleum ether

ที่มา: Chaplin; & Bucke. (1999). *Enzyme Technology*. p. 259

2.2.5 ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ

เอนไซม์ไลเปสอิสระมาใช้งานนั้นจะมีข้อจำกัดอยู่หลายข้อ เช่น เอนไซม์ไลเปสอิสระนั้นไม่มีความเสถียร, การแยกเอนไซม์ไลเปสอิสระออกจากสารผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก จึงทำให้ไม่สามารถที่จะนำเอนไซม์อิสระมาใช้ในเครื่องปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องได้และที่สำคัญคือไม่สามารถที่จะนำเอนไซม์อิสระกลับมาใช้งานใหม่ได้จึงไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน สามารถที่จะสรุปได้ใน แสดงดังตาราง 9

ตาราง 9 การเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

ข้อเปรียบเทียบ	เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ตรึงรูป
การแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์	ยาก	ง่าย
ความสามารถในการทำปฏิกิริยา	สูญเสีย	สูญเสียน้อยกว่า
การนำกลับมาใช้ใหม่	ไม่ได้	ได้
ค่าใช้จ่าย	แพง	ถูกกว่า
การควบคุมกระบวนการ	ยาก	ง่าย
ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์	มีสารปนเปื้อน	บริสุทธิ์

ที่มา: จตุพร ศรีบัณฑิตมงคล, บุศรา คุณาจิตพิมล, และ ปกิต เพชรแดง. (2547). *การตรึงตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล.* หน้า 42.

การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ แสดงดังตาราง 10

ตาราง 10 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของตัวเร่งปฏิกิริยา

ข้อเปรียบเทียบ	ตัวเร่งปฏิกิริยา	
	เอนไซม์	กรดและเบส
1.อัตราการเกิดปฏิกิริยา	ช้า	เร็วกว่าเอนไซม์
2.ความรุนแรงของปฏิกิริยา	ไม่รุนแรง	รุนแรงกว่า
3.ปริมาณของเสีย	น้อย	มากกว่า
4.%Yield	ปริมาณน้อยกว่า	ปริมาณมาก
5.ค่าใช้จ่าย	ถูกกว่า	แพงกว่า
6.การควบคุมปฏิกิริยา	ง่าย	ยาก

ที่มา: จตุพร ศรีบัณฑิตมงคล, บุศรา คุณาจิตพิมล, และ ปกิต เพชรแดง. (2547). *การตรึงตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล.* หน้า 42.

2.3 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล (Biodiesel) คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ หรือน้ำมันสัตว์มาสกัดเอายางเหนียวและสิ่งสกปรกออก (Degumming) จากนั้นนำไปผ่านกระบวน ทรานส์เอสเทอริเคชัน (Transesterification) โดยการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล หรือเมทานอลและตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น กรด, ด่างหรือเอนไซม์ไลเปส

ตาราง 11 สมบัติของน้ำมันดีเซล และเอสเทอร์ของกรดไขมัน

คุณสมบัติ	น้ำมันดีเซล	เอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน
ความหนาแน่น 15 องศาเซลเซียส (กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร)	0.849	0.888
จุดเดือดเริ่มต้น (องศาเซลเซียส)	180	307 (1 เปอร์เซ็นต์)
10 เปอร์เซ็นต์	220	319
20 เปอร์เซ็นต์	234	328
50 เปอร์เซ็นต์	263	333
จุดเดือดสุดท้าย (องศาเซลเซียส)	349	342 (95 เปอร์เซ็นต์)
อะโรมาติก (เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร)	31.5	-
คาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	86.0	77.4
ไฮโดรเจน (เปอร์เซ็นต์)	13.4	12.0
ออกซิเจน (เปอร์เซ็นต์)	0.0	11.2
ซัลเฟอร์ (เปอร์เซ็นต์)	0.3	0.03
ดัชนีซีเทน	46.1	44.6
ค่าออกเทนนัมเบอร์	46.2	58.8
อัตราส่วนของไฮโดรเจนต่อคาร์บอน	1.81	3.62
ค่าความร้อนของวาล์วสุทธิ (เมกกะจูลต่อกิโลกรัม)	42.3	31.50

ที่มา: เสาวนีย์ เหมทานนท์. (2541). *การใช้ไลเพสจาก Candida cylindracea เร่งปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสของน้ำมันหมูเพื่อผลิตโมโนกลีเซอไรด์*. หน้า 10.

เกอร์บิท ดับเบิลยู (Korbitz, W.1990) เสนอในการประชุมที่ประเทศอังกฤษ ปี ค.ศ. 1990 ของ European Commission ได้ตั้งเป้าหมายการใช้ไบโอดีเซลในสัดส่วนร้อยละ 12 ของตลาดโลกในปี ค.ศ. 2020 โดยไบโอดีเซลซึ่งมีสมบัติจุดวาบไฟที่สูงกว่าน้ำมันดีเซลจะมีความปลอดภัยกว่า และเนื่องจากในน้ำมันพืชปราศจากกำมะถันทำให้ลดการปลดปล่อยแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ร้อยละ 99 ลดการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนมอนนอกไซด์ร้อยละ 20 ลดปริมาณไฮโดรคาร์บอนร้อยละ 32 ลดควันดำลงได้ร้อยละ 50 และลดการปลดปล่อยอนุภาคของแข็ง (Particulate matter) ร้อยละ 39 โดยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนไดออกไซด์ขึ้นเล็กน้อย แต่อุปสรรคหลักในการผลิตไบโอดีเซลคือราคาวัตถุดิบที่สูง

2.3.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

วิธีการทั่วไปที่ปัจจุบันใช้ในการผลิตไบโอดีเซลที่นิยมใช้คือ กระบวนการย้ายเอสเทอร์ที่เรียกว่า ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน แต่นอกจากวิธีการนี้แล้วยังมีวิธีอื่นที่ใช้ แต่ไม่นิยมมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

2.3.1.1 การใช้โดยตรง (Direct use and Blending)

การใช้น้ำมันพืชโดยตรง หรืออาจจะใช้ผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อต้องการไปลดความหนืดของน้ำมันพืช เมื่อนำมาใช้งานจะพบว่าก่อให้เกิดปัญหาขึ้นมาถึงแม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางชนิดจะสามารถทำงานได้กับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม เช่น มียางเหนียวเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระในระหว่างการเก็บรักษาหรือปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) จากขั้นตอนการเผาไหม้ ซึ่งลักษณะการเผาผลาญพลังงานระหว่างน้ำมันพืชบริสุทธิ์ และน้ำมันดีเซลพบว่าเป็นไปในแบบเดียวกัน และมีรายงานการทดลองว่าการผสมน้ำมันพืชลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนของน้ำมันพืชต่อน้ำมันดีเซล อัตราส่วน 1:10 ถึง 2:10 สามารถนำไปใช้งานได้

2.3.1.2 ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)

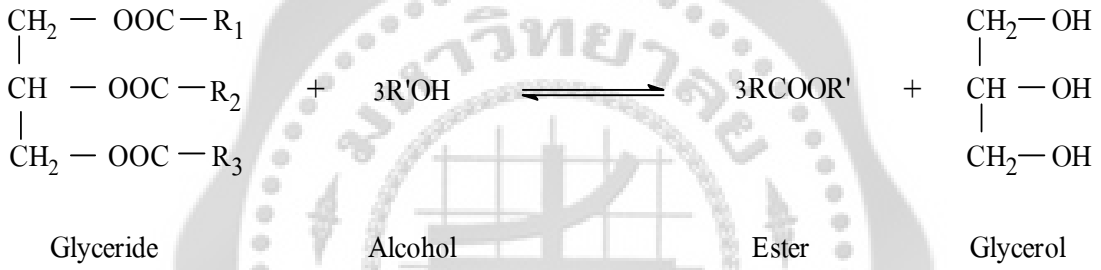
ไมโครอิมัลชันเป็นกระบวนที่ทำให้ของเหลวมีสารแขวนลอยกระจายอยู่ เช่น การผสมน้ำมันพืชกับแอลกฮอล์ ซึ่งจะทำให้อยู่ในสภาพอิมัลชัน และเมื่อนำไปใช้งานสามารถฉีดให้เป็นฝอยได้ แต่พบปัญหาจากการนำไปใช้งานคือจะมีปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

2.3.1.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (Pyrolysis)

วิธีการแตกตัวด้วยความร้อนเป็นการให้ความร้อนกับน้ำมันพืชในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน เพื่อให้น้ำมันพืชสามารถแตกตัวเป็นโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งจะทำให้มีคุณสมบัติเหมาะสมหรือใกล้เคียงนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งน้ำมันจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและโครงสร้างโดยความร้อนทำให้ไตรกลีเซอไรด์แตกออกเป็นสารประกอบอินทรีย์หลายประเภท แต่วิธีการนี้มีข้อเสีย คือ เครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการมีราคาแพง นอกจากนี้กระบวนการนี้มักจะใช้เป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเป็นแก๊สโซลีนมากกว่าการผลิตไบโอดีเซล

2.3.2 กระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (Transesterification)

กระบวนการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ เป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันกับแอลกฮอล์ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อัลคิลของกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยกระบวนการนี้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้ในการปรับปรุงเชื้อเพลิงที่มาจากพวกไตรกลีเซอร์ไรด์ให้ดีขึ้น โดยเฉพาะเป็นการลดค่าความหนืดของน้ำมัน และกระบวนการนี้ยังนิยมใช้แอลกฮอล์ที่มีสายโซ่สั้นๆ เช่น เมทานอลหรือเอทานอลในการทำปฏิกิริยา โดยเฉพาะเอทานอลมีความได้เปรียบทางการค้ามาก คือ มีราคาถูก และมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่เหมาะสม ส่วนเอทานอลเป็นแอลกฮอล์ที่มีสายสั้นที่สุดและยังมีขั้วสูงซึ่งทำให้อัตราการทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอร์ไรด์ได้มากที่สุด ดังภาพประกอบ 5 แสดงปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ระหว่างกรดไขมันกับเอทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพประกอบ 5 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

โดยทางทฤษฎีในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะใช้กรดไขมัน 1 โมเลกุลทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ 3 โมเลกุล แต่ในความเป็นจริงในปฏิกิริยานี้จะเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับดังนั้นหากต้องการให้ได้ผลิตภัณฑ์ เป็นพวกอัลคิลเอสเทอร์สูงขึ้น

แอลกอฮอล์ที่ใช้อาจเป็นแอลกอฮอล์ประเภทโมโนไฮดรอกซี (Monohydroxy) โมเลกุลเล็กๆ ที่สำคัญคือ เมทานอลและเอทานอล นิยมนำมาใช้ในปฏิกิริยามากที่สุด โดยเฉพาะเมทานอลเพราะมีราคาถูก แต่ปัญหาที่พบเมทานอลละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำมันได้น้อยกว่าเอทานอลเนื่องจากมีความเป็นขั้วมากกว่าเอทานอล แต่ถ้ามีการเติมตัวทำละลายลงไปจะทำให้เมทานอลสามารถทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้เร็วมากขึ้นนั้นเป็นเพราะแอลกอฮอล์ที่มีโซ่สั้นที่สุด ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะส่งผลให้น้ำมันพืชที่มีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลมีความหนืดลดลง

ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน คือ

1. อัตราส่วนโดยโมลของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์
2. ชนิดและปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา
3. อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา
4. ปริมาณของกรดไขมันอิสระกับน้ำในน้ำมันหรือไขมัน

5. ความเร็วรอบในการปั่นกวน

โดยทั่วไปแล้วน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ จะสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ไม่มีขั้ว และไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับแอลกอฮอล์ เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งคุณสมบัติแอลกอฮอล์คือมีขั้วและยิ่งสายโซ่สั้นมาก เช่น เมทานอล จะมีความเป็นขั้วสูงที่สุด จึงทำให้แอลกอฮอล์และน้ำมันไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดังนั้นจึงมีการเติมตัวทำละลายร่วมลงไปด้วย เช่น เฮกเซน เตตระไฮโดรฟูราล เพื่อเป็นตัวกลางละลายเอทานอลและน้ำมันให้รวมอยู่ในสถานะเดียวกัน ส่งผลให้มีปริมาณการเกิดเอสเทอร์มากขึ้น

ประเภทของตัวทำละลาย

ถ้าพิจารณาจากลักษณะของสูตรโครงสร้างของตัวทำละลายจะแบ่งเป็น

1. ชนิดโพรติก เป็นตัวทำละลายที่มีไฮโดรเจนอะตอมชนิดมีความเป็นกรดและสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น น้ำ แอลกอฮอล์ กรดคาร์บอกซิลิก จะเห็นว่าตัวทำละลายเหล่านี้มักจะมีหมู่ -OH ในโมเลกุล

2. ชนิดอะโพรติก เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีไฮโดรเจนอะตอมชนิดเป็นกรดและไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้เช่น เบนซีน ไซโคลเฮกเซน คลอโรฟอร์ม อะซิโตน ไดเอทิลอีเทอร์

แต่ถ้าพิจารณาจากคุณสมบัติทางกายภาพ คือพิจารณาจากค่าไดโพลโมเมนต์ หรือจากค่าไดอิเล็กตริกคอนสแตนท์ จะแบ่งเป็น

1. ชนิดมีขั้ว เป็นตัวทำละลายชนิดมีความเป็นขั้ว ซึ่งความมีขั้วนั้นสังเกตได้จากค่าไดโพลโมเมนต์ หรือค่าไดอิเล็กตริกคอนสแตนท์ ตัวทำละลายชนิดนี้มักจะมีค่าไดโพลโมเมนต์และค่าไดอิเล็กตริกคอนสแตนท์ค่อนข้างสูง เช่น เอทานอล เมทานอล

2. ชนิดไม่มีขั้ว เป็นตัวทำละลายชนิดไม่มีความเป็นขั้วจะดูได้จากค่าไดโพลโมเมนต์หรือค่าไดอิเล็กตริกค่อนข้างต่ำหรือเป็นศูนย์ เช่น เบนซีน คลอโรฟอร์ม

ความเป็นขั้วของตัวทำละลายเป็นสิ่งที่บอกถึงความสามารถของการเป็นตัวทำละลาย และยังบอกว่าตัวทำละลายจะอยู่ในฐานะที่เป็นตัวกลาง ซึ่งผลของความเป็นขั้วของตัวทำละลายสามารถสรุปได้ดังนี้ ถ้าการเกิดในสถานะทรานซิชันของปฏิกิริยา จะมีการแยกของประจุเกิดขึ้น เมื่อมีการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้นจะไปลดพลังงานกระตุ้นทำให้อัตราการเกิดเร็วเพิ่มขึ้น แต่ถ้าการเกิดสถานะทรานซิชันที่มีการนำสปีชีส์ที่มีประจุให้เข้าใกล้กัน ผลที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลาย จะทำให้สารตั้งต้นมีความเสถียรมากขึ้นฉะนั้นตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ เอทานอล จึงทำให้ไอออนมีความเสถียรภาพ จึงช่วยให้ปฏิกิริยาการแตกตัวเป็นไอออนเกิดขึ้นได้ง่ายโดยการลดพลังงานกระตุ้น ส่วนตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เบนซีน เฮกเซน ไอออนจะละลายได้ไม่ดี เพราะฉะนั้นปฏิกิริยาการแตกตัวเป็นไอออนจึงมีค่าพลังงานกระตุ้นสูง

2.4 การเร่งปฏิกิริยาและตัวเร่งปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ด้วย เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับได้ จึงต้องใช้แอลกอฮอล์มากเกินพอเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดไปในทางผลิตภัณฑ์ ตัวเร่งที่ใช้กันจะเป็นพวกเบสและกรด การเร่งปฏิกิริยาด้วยเบสจะต้องใช้ไตรกลีเซอไรด์ ที่เป็นแอนไฮดรัสและปราศจากกรดไขมันอิสระ เพราะว่าน้ำจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันซึ่งก่อให้เกิดสบู่ขึ้น สบู่จะลดการเกิดเอสเทอร์เนื่องจากไตรกลีเซอไรด์จะแตกตัวไปเป็นกรดไขมันอิสระ จึงการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันและลดการสิ้นเปลืองจากการทำไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์เนื่องจากจะเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและทำลายสิ่งแวดล้อม

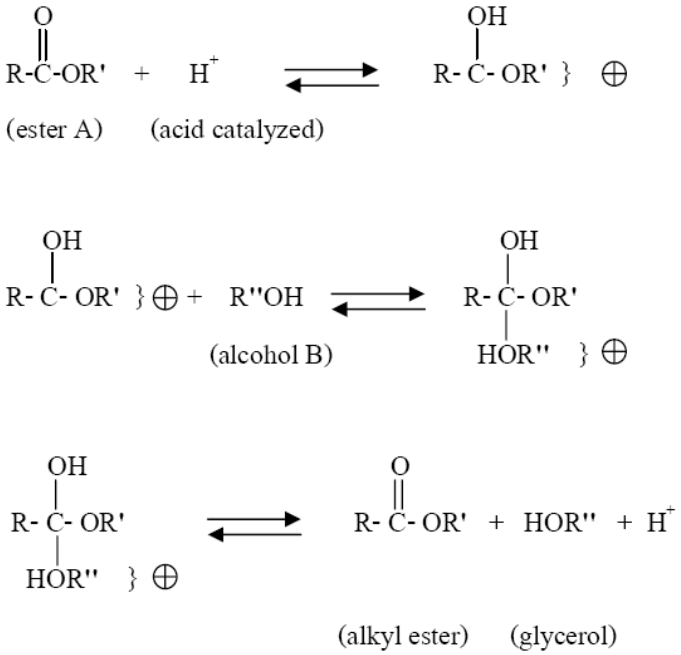
ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

เป็นกระบวนการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันหรือไขมันพืชให้เป็นสารประกอบเอสเทอร์โดยการทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ในภาวะที่ใช้หรือไม่ใช่ตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถใช้ได้ทั้งกรด, เบสหรือเอนไซม์

2.4.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดช้ากว่าปฏิกิริยาที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและต้องใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 3 ชั่วโมงถึงจะเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามถ้ากลีเซอไรด์มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิสระและน้ำอยู่มาก การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดจะดีกว่า กรดที่ใช้ควรเป็นกรดซัลฟิวริก, กรดฟอสโฟริก, กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลโฟนิกของสารอินทรีย์

กลไกของการเกิดปฏิกิริยาของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเมื่อใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแสดงดังภาพ 6 การเกิดปฏิกิริยาของโมโนกลีเซอไรด์ เริ่มจากที่ตำแหน่งคาร์บอนิลเกิดโปรโตเนชัน (Protonation) เปลี่ยนไปเป็นลักษณะของคาร์โบเคชัน (Carbocation) หลังจากนั้นแอลกอฮอล์ซึ่งมีสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์จะเข้าไปชนที่ตำแหน่ง คาร์โบเคชันเกิดการจัดโครงสร้างใหม่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล



ภาพประกอบ 6 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

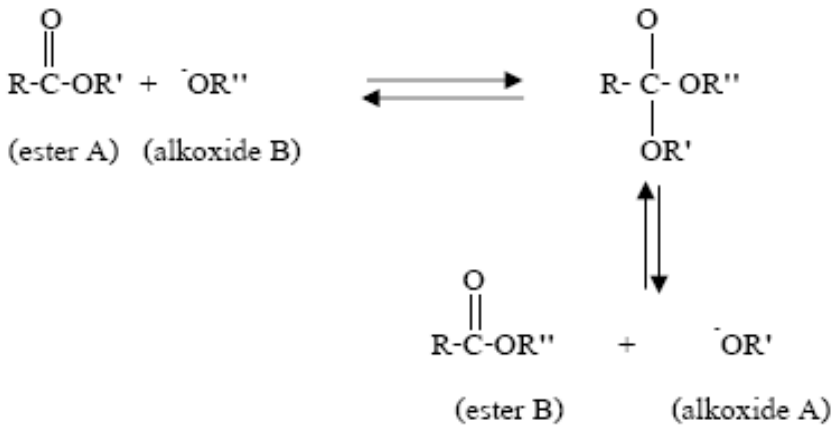
ที่มา: Ma; & Hanna. (1999). *Biodiesel Production : a Review.* Bioresource Technology 70. p.13.

ทัสทอส แอล วิดยาน และ จารา (Tshtoush; Al-Widyan; & Jarrah. 2004: 53-59) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเปลี่ยนไขสัตว์ที่ใช้แล้วไปเป็นเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์ ตัวแปรที่ศึกษาคือ เวลา (2-3 ชั่วโมง) อุณหภูมิ (50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส) และร้อยละความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่มากเกินพอ (100, 150 และ 200) โดยใช้กรดซัลฟิวริก 2.25 โมลต่อลิตร เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากการทดลองพบว่าร้อยละความเข้มข้นของเอทานอลที่มากเกินพอ สามารถเปลี่ยนไขสัตว์เป็นเอสเทอร์ได้มากกว่าใช้เมทานอลและเอทิลเอสเทอร์ที่ได้ความหนืดต่ำกว่าเมทิลเอสเทอร์ ปัจจัยอุณหภูมิไม่มีผลโดยตรงต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงของเอสเทอร์และความหนืด แต่อุณหภูมิทำให้เกิดการเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ได้เร็วขึ้น โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง และได้เอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 78 โดยน้ำหนัก

2.4.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เบสที่นิยมใช้ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์, โซเดียมเมทอกไซด์, โซเดียมเอไมด์, โซเดียมไฮดรายด์ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์, โปแทสเซียมเมทอกไซด์, โปแทสเซียมเอไมด์, โปแทสเซียมไฮดรายด์, และเนื่องจากโซเดียมไฮดรอกไซด์และโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์มีราคาถูก เกิดการกัดกร่อนน้อยกว่ากรด จึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง

กลไกการเกิดปฏิกิริยาเริ่มจากตัวเร่งปฏิกิริยาเข้าไปดึงไฮโดรเจนจากแอลกอฮอล์ เกิดเป็นนิวคลีโอไฟด์จะเข้าไปชนที่กลุ่มคาร์โบนิล (Carbonyl group) เกิดการจัดโครงสร้างเปลี่ยนไปเป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล แสดงดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา: Ma; & Hanna. (1999). *Biodiesel Production : a Review.* Bioresource Technology 70. p.15.

คาร์โมโก และ เชอยาน (Darmoko; & Cheryan. 2000: 452) ศึกษาการเตรียมเมทิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มกับเมทานอล และใช้โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส สัดส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 6:1 วิเคราะห์ส่วนประกอบของเมทานอลต่อน้ำมันปาล์มด้วยวิธี Gas chromatography และวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์, เมทิลเอสเทอร์และกลีเซอรอลโดยวิธี Gel permeation chromatography ผลการทดลองพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปจนถึง 60 องศาเซลเซียส อัตราการเกิดปฏิกิริยาของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์อยู่ในระหว่าง 0.018-0.191 ร้อยละโดยน้ำหนักต่อนาที พบว่าที่อุณหภูมิสูง ๆ จะเกิดปฏิกิริยาของโมโนกลีเซอไรด์สูงกว่าไตรกลีเซอไรด์ ค่าพลังงานกระตุ้น (Activation energy) ของไตรกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์คือ 14.7, 14.2, และ 6.4 กิโลแคลลอรี่ต่อโมล ตามลำดับ ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมคือ 1 ร้อยละโดยน้ำหนัก

เฟเดอริเกอ (Frederique; et al. 2005: 263–267) ศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จากน้ำมันเรพกับแอลกอฮอล์(Methanol, Ethanol, n-Propanol, isopropanol, n-Butanol, i-Butanol และ t-Butanol) โดยใช้โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะสามารถเกิดเฉพาะเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์ สำหรับกรดซัลฟิวริกจะสามารถเกิดโพรพิลเอสเทอร์และบิวทิลเอสเทอร์ได้เท่านั้น นอกจากนี้ที่อุณหภูมิใกล้จุดเดือดของแอลกอฮอล์การใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้ลดเวลาในการทำปฏิกิริยาและแอลกอฮอล์ชนิดโซ่กิ่ง (Branched-chain alcohols) มีส่วนทำให้เกิดปฏิกิริยาช้ากว่าแอลกอฮอล์ชนิดโซ่ตรงขณะที่ t-Butanol ไม่เกิดปฏิกิริยา

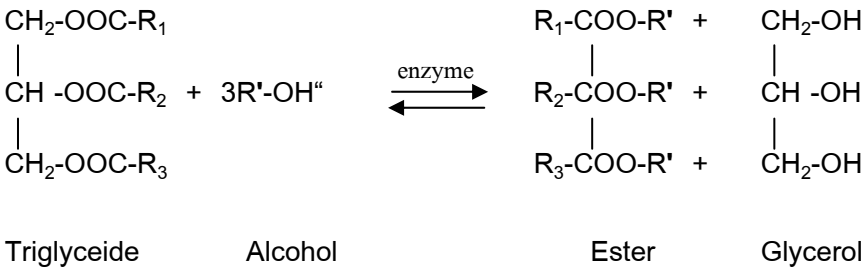
แลง และคณะ (Lang; et al. 2001: 456-459) เอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันคาโนลา น้ำมันลินซีดจากต้นแฟลกซ์ และน้ำมันดอกทานตะวัน ในรูปของเมทิลเอสเทอร์ เพียงแต่ใช้โซเดียมเมทอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเท่านั้น สภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันคือ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมกับกวนจนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ เอทิลเอสเทอร์มีโอกาสเกิดเป็นอิมัลชันได้ง่าย ดังนั้นจึงใช้น้ำเกลืออุ่นๆ (50 ถึง 60 องศาเซลเซียส) ล้างแทนการใช้น้ำเปล่าอย่างเดียวเพื่อลดการเกิดอิมัลชัน การใส่กรดแทนนิกในน้ำ (ร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก) จะช่วยล้างเบสออกได้ดีขึ้น แล้วกวนด้วยความเร็วปานกลาง สบู่และแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกไปกับน้ำ หลังจากล้างน้ำ 3 ครั้ง จึงนำไปดูดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต วิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีด้วยเอสเทอร์ด้วยเทคนิค HPLC และวิเคราะห์ส่วนประกอบกรดไขมันด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตรกราฟี

2.4.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเรชันโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ไฮโดรไลติกเอนไซม์ (Hydrolytic enzyme) นำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ แต่ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันยังใช้เอนไซม์กันไม่แพร่หลาย โดยมีปัจจัยที่ต้องทำการศึกษา เช่น ตัวทำละลาย อุณหภูมิ และชนิดของเอนไซม์ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาค่อนข้างนานและปริมาณผลผลิตที่ได้ยังให้ผลด้อยกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส

การสังเคราะห์เอสเทอร์มีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมที่สุดคือ การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและก่อปัญหาต่อเครื่องยนต์น้อยที่สุด เอสเทอร์ที่ได้เรียกตามชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ เช่น เมทิลเอสเทอร์ เอทิลเอสเทอร์ เป็นต้น ตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ นอกจากจะได้เอสเทอร์แล้ว ยังได้กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม แสดงดังภาพประกอบ 8

นอกจากนี้การใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สามารถทำปฏิกิริยาที่ความดันสูงโดยไม่ต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอลเช่นกัน



ภาพประกอบ 8 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นอร์เรดดินี (Noureddini; et .al. 2005: 769-777) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลและเอทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก*Pseudomonas cepacia* ทำการตรึงรูปโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปโดยมี Sol–gel เป็นสารห่อหุ้มใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อเมทานอล คือ 1:7.5 และอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อเอทานอลคือ 1:15.2 และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพบว่าได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์และเอทิลเอสเทอร์ 65 เปอร์เซ็นต์

2.5 จลนพลศาสตร์เคมี (Chemical kinetics)

จลนพลศาสตร์ เป็นการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาและกลไกของการเกิดปฏิกิริยา อัตราการเกิดปฏิกิริยาบอกให้ทราบว่าสารตั้งต้นของปฏิกิริยาถูกใช้ไปและมีสารผลิตผลของปฏิกิริยานั้นเกิดนั้นมากน้อยเพียงใด

การศึกษาจลนพลศาสตร์แบ่งเป็น 2 ประเภท

ปฏิกิริยาเอกพันธุ์ (Homogeneous reaction) คือ ปฏิกิริยาที่เกิดในวัฏภาคเดียวที่เป็นเนื้อเดียว

ปฏิกิริยาวิวิธพันธุ์ (Heterogeneous reaction) คือ ปฏิกิริยาที่เกิดในหลายวัฏภาคที่ไม่เป็นเนื้อเดียว

เมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาเอกพันธุ์กับปฏิกิริยาวิวิธพันธุ์แล้วพบว่าปฏิกิริยาวิวิธพันธุ์มีความซับซ้อนมากกว่าปฏิกิริยาเอกพันธุ์เนื่องจาก

1. ที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคมีการเกิดปฏิกิริยาเคมีและการถ่ายเทมวลเกิดขึ้นพร้อมกัน ดังนั้นการวิเคราะห์ปฏิกิริยาและการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ต้องรวมกระบวนการเคมีและทางกายภาพด้วย

2. ในเครื่องปฏิกรณ์แบบวิวิธพันธุ์อย่างน้อยจะต้องมีวัฏภาคซึ่งมากกว่า 2 วัฏภาคลักษณะการสัมผัสของวัฏภาคและลักษณะพลวัตของการไหล (Fluid dynamics) จะมีความซับซ้อนการหาสมการอัตราเร็วปฏิกิริยาโดยทั่วไป คือ การหาว่าความเข้มข้นของสารและอุณหภูมิมีผลอย่างไรต่ออัตราของการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆการนำผลจากการทดลองที่ได้มาหาอัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาที่นิยมใช้ศึกษา คือ

1. วิธีอินทิกรัล (Integral method) มีวิธีการหาสมการอัตราเร็วปฏิกิริยา

2. วิธีอนุพันธุ์ (Differential method) โดยจะหาสมการจลนศาสตร์ตามวิธีอนุพันธ์ ซึ่งสามารถหาได้หลายแบบต่างๆ ดังนี้

3. วิธีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เวลาเริ่มต้น (Method of initial rates)

วิธีนี้จะมีประโยชน์มากโดยเฉพาะปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยาผันกลับได้ เนื่องจากจะมีความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นปริมาณน้อยๆที่เวลาเริ่มต้นจะได้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่วัดได้เป็นปฏิกิริยาข้างหน้าอย่างเดียว ไม่มีการรบกวนจากปฏิกิริยาย้อนกลับ เช่น ปฏิกิริยา $-r_A = kC_A^{\ a} - kC_B^{\ b}$

วิธีนี้จะหาเวลาที่ทำให้สารตั้งต้นมีความเข้มข้นเหลือครึ่งหนึ่งของเวลาเริ่มต้น $C_A = C_{A0}/2$

2.5.1 จลนพลศาสตร์เบื้องต้นของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของไขมัน

2.1.5.1 จลนพลศาสตร์เบื้องต้นของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไขมัน (พัชรา วีระกะภัส. 2541: 69-71)

การศึกษาเกี่ยวกับทางด้านจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไขมันหรือน้ำมันที่ได้จากพืชและสัตว์ด้วยแอลกอฮอล์ เพื่อทำให้เกิดเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) และกลีเซอรอล ถ้าปฏิกิริยาเป็นปฏิกิริยามูลฐาน (Elementary reaction) ซึ่งจะต้องผ่านปฏิกิริยาอนุกรมย่อยๆ ทำให้เกิดสารกึ่งผลิตภัณฑ์ (Intermediate product) ขึ้นมาก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ในที่สุด ซึ่งจะทำให้เกิดความยุ่งยากมาก ดังนั้นจึงทำการศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยา โดยที่จะใช้ข้อมูลเชิงตัวเลขของออยเลอร์ รวมกับวิธีหาค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองและการคำนวณที่มีค่ายกกำลังที่น้อยที่สุด ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการวิจัยเป็นขั้นตอนต่างๆ ได้ดังนี้

จากปฏิกิริยา

$$TG + EtOH \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} DG + FAEE$$

$$DG + EtOH \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} MG + FAEE$$

$$MG + EtOH \underset{k_6}{\overset{k_5}{\rightleftharpoons}} GL$$

เมื่อ TG คือ ไตรกลีเซอไรด์

DG คือ ไดกลีเซอไรด์

MG คือ โมโนกลีเซอไรด์

FAEE คือ เอทิลเอสเทอร์

EtOH คือ เอทานอล

GL คือ กลีเซอรอล

K_1 และ K_2 คือ ค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้าปฏิกิริยาย้อนกลับของการ

สังเคราะห์ไบโอดีเซลไตรกลีเซอไรด์และเอทานอล

K_3 และ K_4 คือ ค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้าและปฏิกิริยาย้อนกลับของการสังเคราะห์ไบโอดีเซลเอทานอล

K_5 และ K_6 คือ ค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้าและปฏิกิริยาย้อนกลับของการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโมโนกลีเซอไรด์และเอทานอล

2.1.5.2 จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ตัวเร่งปฏิกิริยา

มิเคลิส-เมนเทน ได้เสนอกลไกของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งเอาไว้ว่าเอนไซม์(E) รวมตัวกับสับสเตรท (S) เกิดเป็น ES คือ เอนไซม์-สับเตรทเชิงซ้อนenzyme-substate complex ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบย้อนกลับ มีค่าคงที่ของอัตราเท่ากับ k_{+1}และ k_{-1}สำหรับปฏิกิริยาไปข้างหน้าและปฏิกิริยาย้อนหลังตามลำดับ การแยกสลายตัว ES เป็นปฏิกิริยาของการเกิดผลิตผล (P)และเอนไซม์ (E)กลับคืนมา ซึ่งปฏิกิริยาแบบไม่ย้อนกลับที่มีค่าคงที่ของอัตราเท่ากับ k_{+2}

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\longrightarrow}} ES \xrightarrow{K_{+2}} E + P \qquad (11)$$

2.1.5.3 จลนศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์ที่มีสับสเตรทหนึ่งตัว

อัตราของปฏิกิริยานี้คือ อัตราเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ (P) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ES อัตราการเปลี่ยนแปลงของ ES ต่อเวลาแสดงได้ดังนี้

$$\frac{dC}{dt} = K_{+1}\, ES - (K_{-1} + K_{+2})\, C \qquad (12)$$

โดย $e_0 = e + C$

เมื่อ e_0 คือ ความเข้มข้นทั้งหมดของเอนไซม์

e คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์

C คือ เอนไซม์-สับสเตรทคอมเพล็กซ์

ในสภาพคงตัว (Steady state) ความเข้มข้นของ ES จะเปลี่ยนแปลงด้วยอัตราช้ามากเมื่อเทียบกับของ S กับ P กล่าวคือ อัตราการเกิด ES เท่ากับอัตราการสลายตัว ($\frac{dC}{dt} = 0$) และเมื่อนำมาแทนค่า e จะได้ว่า

$$k_{+1}\,(e_0 - C)\, s - (k_{-1} + k_2)\, C = 0 \qquad (13)$$

เพราะฉะนั้นจะได้ว่า

$$C = \frac{e_0 S}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + S} \qquad (14)$$

พบว่าอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ (v) คือ

$$V = \frac{V_m S}{K_m + S} \qquad (15)$$

สมการนี้เรียกว่า Michaelis- Menten ค่า K_m เรียกว่า Michaelis constant และ $V_m=k_{+2}+e_0$ ซึ่งเป็นอัตราสูงที่สุดของปฏิกิริยา

เพราะว่า

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_s + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \qquad (16)$$

ในกรณีที่ $k_{+1} >> k_{+2}$ Michaelis constant (K_m) จะมีค่าเท่ากับ K_s หรือค่าคงที่สมดุลของการแยก ES กลับเป็น E และ S ค่า K_m มักแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพต่อสับสเตรทเพียงไร หากเอนไซม์รวมตัวกับสับสเตรทได้ดี แสดงว่ามีประสิทธิภาพสูงกล่าวคือ K_m มีค่าน้อย ดังนั้นความสัมพันธ์ของ v กับ S มีลักษณะเป็นไฮเพอร์โบลาโดยที่ K_mจะเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรทเมื่อ $v = \frac{1}{2}V_m$ เนื่องจากไม่สามารถไม่สามารถคำนวณค่า V_m ดังนั้นจึงการดัดแปลงสมการคือ

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m}\frac{1}{S} \qquad (17)$$

เรียกว่าวิธีการเขียนกราฟว่า Lineweaver–Burk plot

2.1.5.4 จลนศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์ที่มีสับสเตรทสองตัว

จากปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทตัวเดียวและเกิดผลิตภัณฑ์เพียงตัวเดียว ในความเป็นจริงแล้วปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตนั้นมักจะเป็นปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทอย่างน้อยสองตัว ดังนั้นเอนไซม์จะสามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทสองตัว แต่ถ้าให้ความเข้มข้นของสับสเตรทตัวหนึ่งคงที่โดยอยู่ที่ระดับอิ่มตัว แล้วแปรความเข้มข้นของสับสเตรทอีกตัวที่เหลือไป ก็จะทำให้ดูเหมือนว่าเอนไซม์นั้นมีสับสเตรทตัวเดียว ซึ่งเรียกว่าเป็น Pseudo single substrate reaction

ปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทและผลิตภัณฑ์อย่างละสองตัว (Two substates bi bi reaction)

$$A + B \xleftrightarrow{E} P + Q \qquad (18)$$

เป็นปฏิกิริยาที่พบมากในสิ่งมีชีวิตโดยมักจะเป็นปฏิกิริยาประเภททรานเฟอเรส(Transferase) โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการส่ง specific functional group (X), จากสับสเตรทตัวหนึ่งไปยังสับสเตรทอีกตัวหนึ่งดังนี้

$$P - X + B \xleftrightarrow{E} P + B - X \qquad (19)$$

เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidation – Reduction) ที่มีการส่งริดิวซิ่งวิวาเลนท์จากสารตั้งต้นตัวหนึ่งไปให้สับสเตรทอีกตัว

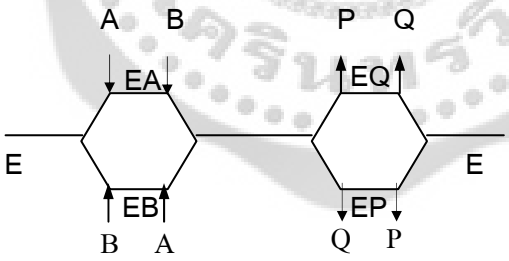
ชนิดของกลไก (Types of Two-substrate bi bi reaction)

กลไกของปฏิกิริยาเอนไซม์ประเภทการส่งหมู่จากซับเสตรทตัวหนึ่ง (group-transfer reaction) แบ่งเป็น 2 พวกใหญ่ๆคือ กลไก แบบ Sequential และกลไกแบบ Ping–pong ซึ่งเป็นแบบ non-sequential

กลไกแบบ Sequential (หรือ Single displacement reaction) หลักสำคัญของกลไกนี้คือทั้งสับสเตรท A และ B จะต้องเข้าจับกับเอนไซม์เกิดเป็น Ternary complex, (EAB) ก่อน แล้วจึงจะเกิดปฏิกิริยาต่อไปให้เป็นผลิตผลออกมาได้ ในปฏิกิริยาแบบนี้หมู่ X จะถูกส่งจาก A (หรือ P-X) ไปให้สับสเตรท Bโดยตรง เกิดเป็นผลิตผล P และ Q (หรือB-X) ขึ้น ดังนั้นจึงเรียกอีกชื่อว่าเป็น Single displacement reaction)

Sequential reaction นั้นอาจแบ่งย่อยออกไปได้ 2 แบบ คือ

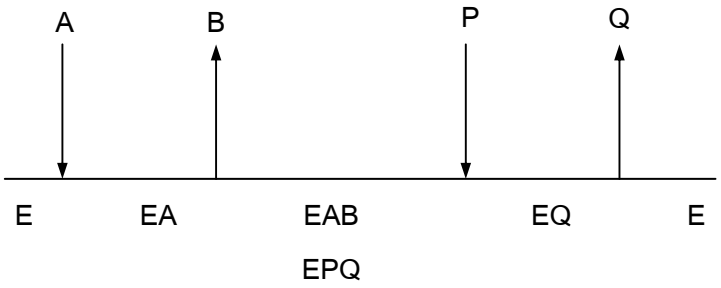
กลไกแบบ Random bi bi หรือ Random Rapid Equilibrium เป็นกลไกที่สับสเตรทตัวใดตัวหนึ่งภายในสองตัวนั้นจะเข้าจับกับเอนไซม์ก่อนก็ได้ โดยเกิดเป็น binary complex, EA หรือ EB ก่อนก็ได้ ต่อมาสับสเตรทอีกครั้ง Ternary complex, (EAB) ก่อนที่จะเกิดเป็นผลิตผล P และ Q โดยที่ P หรือ Q จะแตกตัวออกจากเอนไซม์ก่อนก็ได้ กลไกนี้ถือว่าปฏิกิริยาขั้นตอน $EAB \longrightarrow EPQ$ เกิดได้ช้าที่สุดคือเป็นปฏิกิริยาควบคุม (Rate limiting step) ปฏิกิริยารวมทั้งหมดปฏิกิริยาขั้นตอนอื่นๆ ที่เกิดก่อนขั้นตอนนี้จะอยู่ที่สภาวะสมดุลกลไกนี้ แสดงดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 กลไกแบบ Random bi bi หรือ Random rapid equilibrium

กลไกแบบ Ordered bi bi (Compulsory Order Mechanism)

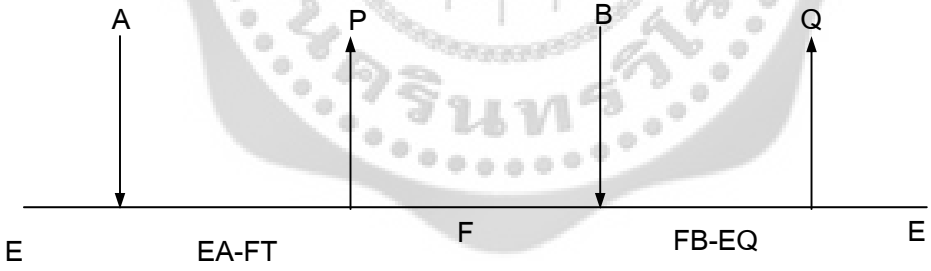
คือกลไกที่มีการเข้าจับของสับสเตรททั้งสองกับเอนไซม์อย่างมีระเบียบคือ สับสเตรท A หรือ (PX) ต้องเป็นสับสเตรทนำที่จะต้องเข้าจับกับเอนไซม์เกิดเป็น Binary complex, (EX) ก่อน แล้วต่อมาสับสเตรท B จะเป็นสับสเตรทตัวต่อมา (Following substrate) ที่จะเข้าจบ EA แล้วเกิดเป็น ternary complex, (EAB) ก่อนที่จะเกิดเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตผล Pและ Qและการแตกตัวออกมาของผลิตผลจากเอนไซม์ก็จะต้องมีลำดับ โดยที่ผลิตผล P จะต้องแตกตัวออกก่อนผลิตผล Q หรือ BX กลไกนี้ แสดงดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 กลไกแบบ Ordered Bi Bi หรือ Compulsory order mechanism

กลไกแบบ Ping-Pong (Ping-pong Bi Bi, Double Displacement Reaction)

คือกลไกที่เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทตัวแรก A(PX) เกิดเป็น binary complex, EA ก่อนแล้ว functional group X ของสับสเตรต A จะถูกส่งไปให้เอนไซม์โดยที่จะจับเอนไซม์ E ด้วยพันธะโควาเลนท์เกิดเป็น E-X ของเอนไซม์กับผลิตผล P ซึ่งก็คือสับสเตรท A ที่สูญเสียหมู่ X ผลิตผล P แตกตัวออกจากเอนไซม์ F ก่อนที่สับสเตรท B ตัวที่สองจะเข้าจับกับเอนไซม์ F แล้วเกิดการส่ง functional group X นี้จากเอนไซม์ F ไปให้กับสับสเตรท B ทำให้เกิดเป็นผลิตผล Q(B-X) พร้อมกับจะได้เอนไซม์อิสระ E กลับคืนมาเนื่องจากเอนไซม์สามารถจับกับสับสเตรทได้อีกครั้ง แสดงว่าบนเอนไซม์จะมีบริเวณจับ (Binding site) สำหรับสับสเตรทเพียงบริเวณเดียว กลไกนี้ แสดงดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 กลไกแบบ Ping-pong bi bi หรือ Double displacement reaction

2.5.2 การศึกษากลไกของปฏิกิริยาโดยการวัดอัตราเร็วเริ่มต้น (Initial velocity studies)

ปฏิกิริยาเอนไซม์ที่มีสับสเตรทสองตัวส่วนใหญ่จะมีสมการอัตราเร็วอยู่ในรูปสมการมิเคลิส-เมนเทน ถ้าให้ความเข้มข้นของสับสเตรทตัวที่หนึ่งคงที่ที่ระดับอิ่มตัวแล้วแปรความเข้มข้นของสับสเตรทตัวที่เหลือไป สำหรับปฏิกิริยาที่มีกลไกแบบ Ping-pong จะเห็นว่าปฏิกิริยาการแตกตัวของผลิตผล P ออกจากเอนไซม์ในขณะเริ่มเกิดปฏิกิริยาใหม่ ๆ นั้นจะเกิดแบบทวนกลับไม่ได้ เนื่องจากมี [P] อยู่น้อยมากจนตัดทิ้งได้ ทำให้ค่า $K_S^A = 0$ ดังนั้นเทอม $K_S^A K_M^B = 0$ ทำให้อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาในขณะไม่มีผลิตผลอยู่ด้วยจะเป็นไปตามสมการความเร็วดังนี้

$$V_0 = \frac{V_{max}\left[A_0\right]\left[B_0\right]}{K_m^B\left[A_0\right] + K_m^A\left[B_0\right] + \left[A_0\right]\left[B_0\right]} \quad (20)$$

ถ้าให้ [A] แปรไปขณะที่ [B] คงที่โดยมีค่าประมาณ K_m^B จะเขียนสมการได้ใหม่เป็น

$$V_0 \frac{V_{max}\left[A_0\right]}{K_m^A + \left[A_0\right]\left(\frac{K_m^B}{\left[B_0\right]} + 1\right)} \quad (21)$$

และเมื่อทำให้อยู่ในรูปสมการเส้นตรงแบบของไลน์วีเวอร์-เบอร์ค จะได้

$$\frac{1}{V_0} = \frac{k_m^A}{V_{max}}\left(\frac{1}{[A_0]}\right) + \left(1 + \frac{k_M^B}{[B_0]}\right)\left(\frac{1}{V_{max}}\right) \quad (22)$$

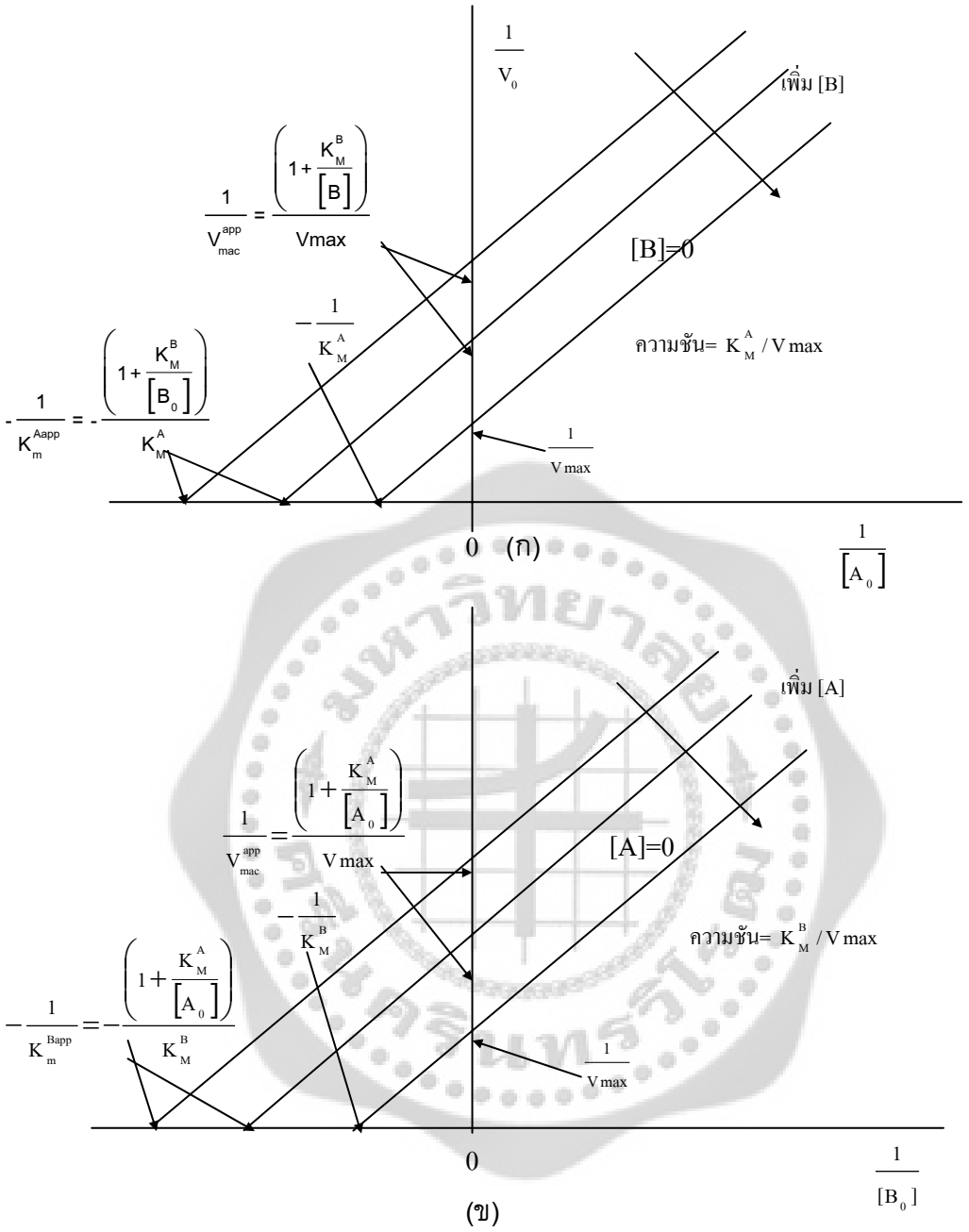
ดังนั้นเวลาทำการทดลองโดยให้ความเข้มข้นของสับสเตรท B คงที่โดยมีค่าประมาณ K_m^B และที่แต่ละความเข้มข้นของ B คงที่นี้ให้แปรความเข้มข้นของ A ไปแล้วเขียนกราฟไลน์วีเวอร์ –เบอร์ค ระหว่าง $\frac{1}{V_0}$ กับ $\frac{1}{[A_0]}$ ที่ $[B_0]$ คงที่ต่าง ๆ จะได้กราฟดังแสดงภาพ12 (ก) และในทางตรงกันข้ามถ้าให้ความเข้มข้นของสับสเตรท A คงที่แต่ไม่ใช่ระดับ แล้วแปรความเข้มข้นของ B ไป แล้วเขียนกราฟระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$ ที่ $[A_0]$ คงที่ต่างๆจะได้กราฟดังแสดงภาพ 12 (ข)

จะเห็นว่ากราฟที่ได้จากการเขียนระหว่าง $\frac{1}{V_0}$ กับ $\frac{1}{[A_0]}$ ที่ $[B_0]$คงที่ต่าง ๆจะได้เส้นตรงต่าง ๆที่ขนานกันโดยที่เส้นตรงเหล่านั้นมีค่าความชันคงที่ = $K_S^A / V\max$ ส่วนกราฟที่ได้จากการเขียนกราฟระหว่าง$\frac{1}{V_0}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$ ที่ $[A_0]$ คงที่ต่าง ๆ จะได้เส้นตรงต่าง ๆที่ขนานกันและมีความชันคงที่ = $K_m^B / V\max$ ดังนั้นถ้าเขียนกราฟไลน์วีเวอร์ –เบอร์คแล้วได้กราฟเส้นตรงต่าง ๆ ที่ขนานกัน

สำหรับค่า V_{max} , K_M^A และ K_M^B สามารถหาได้จากการทำ secondary plot ดังนี้ จาก Primary plot ระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[A_0]}$ ที่ $[B_0]$ คงที่ต่าง ๆ ค่าจุดตัดบนแกน $\frac{1}{V_0}$ มีค่าคือ $\frac{1}{v_{max}^{app}}$ ซึ่งมีค่าดังนี้

$$\frac{1}{V_{max}^{app}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m^B}{V_{max}\left[B_0\right]} \quad (23)$$

ดังนั้นการทำ Secondary plot ระหว่าง $\frac{1}{v_{max}^{app}}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$ จะได้เส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ $\frac{K_m^B}{V_{max}}$ และจุดตัดบนแกน y มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{v_{max}}$ ส่วนจุดตัดแกน X มีค่าเท่ากับ $\frac{1}{K_m^{app}}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$ จะได้เส้นตรงที่มีค่าความชันเท่ากับ $\frac{K_m^B}{K_m^A}$ และจุดตัดบนแกนนอน X มีค่าเท่ากับ $\frac{-1}{K_m^B}$

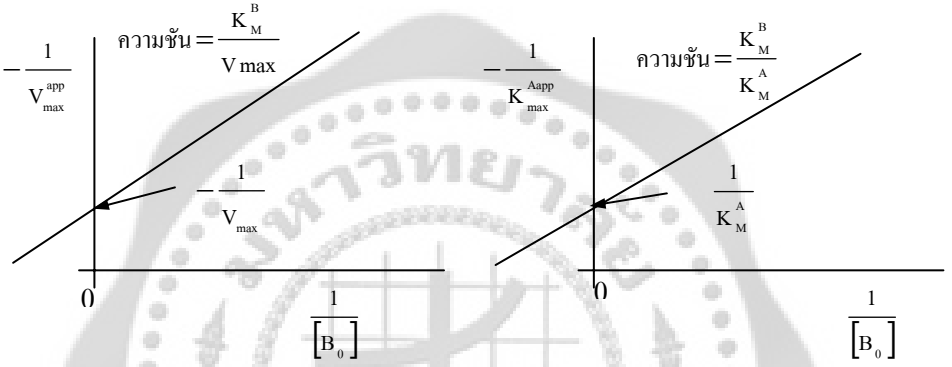


ภาพประกอบ 12 กราฟไลน์วีเวอร์-เบอร์คของปฏิกิริยาที่มีกลไกแบบ Ping-pong Bi Bi

(ก) กราฟระหว่าง $\frac{1}{V_0}$ กับ $\frac{1}{[A_0]}$ ที่ค่า $[B_0]$ คงที่ต่างๆ

(ข) กราฟระหว่าง $\frac{1}{V_0}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$ ที่ค่า $[A_0]$ คงที่ต่างๆ

ดังนั้นกลไกแบบ Ping-pong เมื่อทำ primary plot เมื่อทำ primary plot ระหว่าง $\frac{1}{V_0}$ กับ $\frac{1}{[\text{substrate}]}$ เมื่อสับสเตรทตัวที่สองมีความเข้มข้นคงที่ต่างๆ กันจะได้เส้นตรงต่างๆ ที่ขนานกัน และการทำ secondary plot จุดตัดแกน y และจุดตัดบนแกน X กับ $\frac{1}{[2^{nd}\ \text{substrate}]}$ สามารถหาค่า V_{max} k_M^A และ k_M^B ดังภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 (ก) การเขียนกราฟระหว่างค่าจุดตัดแกน $\frac{1}{V_0}$ กับ $\frac{1}{[B_0]}$ และ

(ข) การเขียนกราฟระหว่างค่าจุดตัดแกน $\frac{1}{V_0}$ กับ $\frac{1}{[A_0]}$

ที่มา: พัชรา วีระกะภัส. (2541). *เอนไซม์*. หน้า 65.

ดังนั้นจากการศึกษาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาแล้วนำผลที่ได้มาเขียนกราฟไลน์วีเวอร์ – เบอร์คจะสามารถใช้เป็นแบบจำลองในการหาจลนศาสตร์ได้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 ทิศทางของงานวิจัย

มีการศึกษาและทำการวิจัยการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยนักวิจัยส่วนใหญ่จะทำการศึกษาแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

2.6.1.1 กลุ่มที่ศึกษาปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการตรึงรูปส่วนใหญ่จะใช้วิธีห่อหุ้มด้วยเจล

เอ็นซินา และคณะ (Encinar; et. al. 2002: 443–450) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* และทำการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิส พบว่ากรณีที่ไม่มีตัวทำลายอินทรีย์จะให้ค่าคอนเวอร์ชันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันดอกทานตะวันต่อเมทานอลคือ 1:4.5 และใส่เอนไซม์ตรึงรูปลงในน้ำมันประมาณ 5 ชั่วโมงก่อนที่จะใส่เมทานอลลงไป นอกจากนี้ยังการเปรียบเทียบกับค่าคอนเวอร์ชันของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Rhizomucor miehei* ซึ่งให้ค่าคอนเวอร์ชันเพียง 80 เปอร์เซ็นต์

นอสเรดดินี และคณะ (Noureddini; et.al. 2005: 769-777) ทำการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลและเอทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Pseudomonas cepacia* ทำการตรึงรูปโดยใช้เทคนิคการตรึงรูปโดยมี Sol –gel เป็นสารห่อหุ้มใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อเมทานอล คือ 1: 7.5 และอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองต่อเอทานอลคือ 1:15.2และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพบว่าได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์และเอทิลเอสเทอร์ 65 เปอร์เซ็นต์

ไทชิ และคณะ (Taichi; et. al. 2000: 180-183) ทำการศึกษาถึงผลกระทบของการตรึงรูปเอนไซม์เอนไซม์จาก *Candida Antarctica* ในปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลโดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

เซลมิ และโทมัส (Selmi; & Thomas. 1998: 1372-1378) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันจากเมล็ดทานตะวันร่วมกับเอทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสจาก*Rhizomucor miehei* พบว่าปริมาณของเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับ 83 เปอร์เซ็นต์

เคคา และคณะ (Kaieda; et. al. 2001: 12-15) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิสของน้ำมันเมล็ดฝ้ายโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ตรึงรูปจาก *Candida Antarctica* โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของเอนไซม์ 30เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักน้ำมันอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันกับแอลกอฮอล์คือ 1:4 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมงได้ปริมาณเอสเทอร์เท่ากับ 91.5 เปอร์เซ็นต์

สรุปได้ว่า การทดลองนี้ได้มีการเลือกใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ต่างๆกัน ได้แก่ *Rhizomucor miehei, Candida Antarctica, Pseudomonas fluorescens* โดยนำมาตรึงรูปด้วยวิธีห่อหุ้มซึ่งมีการใช้สารห่อหุ้มต่างๆกันคือ Sol–gel ส่วนใหญ่พบว่าปริมาณเอสเทอร์ที่ได้อยู่ในช่วง 65-90 เปอร์เซ็นต์

1. กลุ่มที่ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปส

จลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสโดยอาศัยแบบจำลอง Ping-pong bi bi ในการอธิบายกลไกของปฏิกิริยา

โดสเสท และคณะ (Dossat; et al. 2002: 90-94) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิสของน้ำมันดอกทานตะวันโดยอาศัยเอนไซม์ตรึงรูปในสารละลายอินทรีย์ n-hexane ใช้แบบจำลอง Ping-pong Bi Bi อธิบายจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน พบว่าเมื่อใช้น้ำมันดอกทานตะวันในอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันดอกทานตะวันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 จะให้ปริมาณเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์

ยวนยวน และคณะ (Yuanyuan; et.al. 2005: 241-245) ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยนำเมธิลอะซิเตดมาใช้แทนเมทานอลในการทำปฏิกิริยาอินเทอริฟิเคชันกับไตรกลีเซอไรด์จากน้ำมันถั่วเหลืองใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปอาศัยแบบจำลอง Ping-pong bi bi ในการอธิบายปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น พบว่าปฏิกิริยาอินเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเมธิลอะซิเตดนั้นมีอันดับปฏิกิริยาเท่ากับ 2 และพบว่าค่าคงที่การเปลี่ยนแปลงจากไดกลีเซอไรด์เป็นโมโนกลีเซอไรด์ $k_{DG\text{-}MG}$(0.1124) น้อยกว่าค่าคงที่การเปลี่ยนแปลงจากโมโนกลีเซอไรด์เป็นไดอัลคิลกลีเซอรอล $k_{MG\text{-}TA}$(0.1129) ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าคงที่การเปลี่ยนแปลงจากไตรกลีเซอไรด์เป็นไดกลีเซอไรด์ $k_{TG\text{-}DG}$(0.0311) โดยใช้ขั้นตอนแรกเป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยา

เอล ราสยี และคณะ (El Rassy; et. al. 2004: 137-150) ได้ทำการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Burkholderia cepacia* โดยใช้เทคนิคการตรึงรูปแบบห่อหุ้มใช้สารห่อหุ้มคือ Sillica aerogelและทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระกับเอนไซม์ตรึงรูปและทำการศึกษาจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสทั้ง 2 แบบโดยอาศัยแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi

คามินิ และเรฟฟูจิ (Kamini; & Lefuji. 2001: 405-410) ได้ทำการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง butyne acid กับ isoamyl alcohol โดยใช้วิธีการหาค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาเทอมของมิเคลิส-เมนเทนด้วยกลไลแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi มีการยับยั้งแบบแข่งขัน พบว่า ค่าของ V_{max} =11.72 µmol/min $k_{M,acid}$ =0.00303M $k_{MAlcohol}$ =1.5 M และ $k_{i,acid}$ =0.00306 M $k_{iAlcohol}$ =1.05 M

ไซลวิค และคณะ (Sylvie; et.al. 2005: 193–203) ทำการศึกษาจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ตรึงรูปจาก *Burkholderia cepacia* ใช้วิธีการตรึงรูปเอนไซม์แบบห่อหุ้มโดยใช้ Sol-gel เป็นตัวรองรับและใช้แบบจำลอง Ping-pong Bi Bi ในการศึกษาจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา ในกรณีของเอนไซม์ไลเปสอิสระพบว่า V_{max} =5.07 mmol/min $k_{M,acid}$ =0.0243M $K_{i,Alcohol}$ =0.0815M และ $k^t = \frac{k_{M,acid}}{k_{i,alcohol}}$ = 0.499 กรณีของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปพบว่า V_{max}=0.44 mmol/min/mg $k_{M,acid}$ =0.0111 M $k_{iAlcohol}$=0.0319 M และ $k^t = \frac{k_{M,acid}}{k_{i,alcohol}}$ = 0.1370

ดังนั้น จึงสามารถกล่าวได้ว่า การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสจะใช้แบบจำลอง Ping-pong bi bi ในการอธิบายและไม่พบว่ามีการใช้แบบจำลองชนิดอื่นมาอธิบายการเกิดปฏิกิริยา

2.6.2 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน

ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล ไบโอดีเซลสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชต่าง ๆและแอลกอฮอล์โดยที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ผลผลิตตามที่ต้องการปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลให้มีคุณภาพตามที่กำหนดมีหลายปัจจัยดังนี้

2.6.2.1 น้ำมันพืชที่ใช้

มีรายงานการวิจัยการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันพืชหลายชนิดทั้งน้ำมันพืชที่ไม่ผ่านการปรุงแต่ง น้ำมันพืชกึ่งบริสุทธิ์ น้ำมันพืชบริสุทธิ์ น้ำมันพืชที่ใช้แล้ว นอกจากนี้ยังแบ่งเป็นน้ำมันพืช พวกที่บริโภคได้และน้ำมันพืชที่บริโภคไม่ได้ ตัวอย่างจากงานวิจัยได้แก่ น้ำมันดอกทานตะวันน้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันสบู่ดำ, น้ำมันจากเมล็ดเรป ,น้ำมันปาล์มดิบ, น้ำมันปาล์มแยกยางเหนียว

วันทานาบิ และคณะ (Watanabe; et. al. 2002: 151–155) ทำการศึกษาปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสระหว่างดีกัมของน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลร่วมกับคลอโรฟอร์มโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ตรึงรูปจาก *Candida antarctica* โดยมีการเติมเมทานอลเป็นขั้น ๆ ไป พบว่า ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 93.2 เปอร์เซ็นต์

ลินโก และคณะ (Linko; et. al. 1998: 41-50) ทำการศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เมล็ดเรปและแอลกอฮอล์คือ 2-Ethyl-1-hexanol มาทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *C.rugosa* พบว่ามีปริมาณของเอสเทอร์เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

วู และคณะ (Wu.; et. al. 1999: 517-521) ทำการศึกษาการนำน้ำมันที่ใช้แล้วจากภัตตาคารมาทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันกับเอทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสจาก *P.cepacia* และ *C.antarctica* พบว่าได้ปริมาณของเอสเทอร์เท่ากับ 85.4 เปอร์เซ็นต์

น้ำมันแต่ละประเภทจะยังไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับแอลกอฮอล์ได้ทันที ต้องมีการกระบวนการตัดสายโซ่ของไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เสียก่อน การตัดสายโซ่ของไตรกลีเซอไรด์จะต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาก่อนคุณสมบัติที่มีส่วนสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อคุณสมบัติของไบโอดีเซลก็คือ จำนวนพันธะคู่และพันธะเดี่ยวในโมโนกลีเซอไรด์ในกรณีที่โมโนกลีเซอไรด์นั้นมีจำนวนของพันธะคู่มากจะส่งผลต่อทำให้ไบโอดีเซลมีอุณหภูมิจุดหมอกสูงซึ่งทำให้ไบโอดีเซลไม่สามารถใช้ได้ดีในประเทศที่มีอุณหภูมิหนาวเย็น แต่ในประเทศไทยนั้นมีผลผลิตของน้ำมันปาล์มมากจึงคาดว่าปาล์มน้ำมันจะเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทย

2.6.2.2 แอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยทั่วไปแล้วจะใช้แอลกอฮอล์สายสั้นที่มีคาร์บอนในระดับ 1-4 ตัว ซึ่งอาจจะเป็น Primary alcohol, Secondary alcohol หรือ tert-alcohol ก็ได้แต่ที่นิยมมาใช้ในการทำปฏิกิริยามากที่สุดคือ เมทานอล ซึ่งได้ปริมาณของเอสเทอร์สูงไบโอดีเซลที่ได้เรียกว่า เมทิลเอสเทอร์ ซึ่งเป็นเอสเทอร์ที่มีความหนืดต่ำกว่าเอสเทอร์ที่ได้จากแอลกอฮอล์ชนิดอื่นอย่างไรก็ตามเมทานอลนั้นเป็นผลผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีทำให้มี

ปริมาณที่ข้อจำกัดอยู่ ซึ่งเอทานอลนั้นสามารถผลิตจากการหมักของเหลือใช้จึงถือได้ว่าแอลกอฮอล์นี้สามารถผลิตทดแทนได้ตลอดเวลาถึงแม้ว่าจะได้ปริมาณของเอสเทอร์ที่ต่ำกว่าเมทานอล

ไฮ และคณะ (Shieh; et.al. 2003: 103–106) ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันจากเมล็ดทานตะวันร่วมกับเมทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM-77) ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ 36.5 องศาเซลเซียส และอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันจากเมล็ดดอกทานตะวันคือ 3.4:1 พบว่าปริมาณของเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับ 92.2 เปอร์เซ็นต์

เซน และเวน (Chen; & Wen. 2003: 466-469) ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับเมทานอล, เอทานอล, n-propanol, isopropanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, tert-butanolโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *C. Antarctica* ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างคือ 1: 3 พบว่าแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือเมทานอลมีค่าคอนเวอร์ชันเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์

2.6.3 ตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริเคชันมีทั้งกรดและด่าง ซึ่งด่างที่นิยมนำมาใช้ เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์, แคลเซียมไฮดรอกไซด์ส่วนกรณีกรดที่ใช้ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก

เฟรดเดอริเกอร์ และคณะ (Frederique; et.al. 2005: 263–267) ทำการศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิสของน้ำมันทานตะวันโดยใช้ด่างที่มีการตรึงรูปด้วย Sn(3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone)2(H_2O)$_2$ และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 3 ชั่วโมงพบว่าได้ปริมาณของเอสเทอร์เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์

วิดยาน และ อาลี (Widyan; & Ali. 2002: 253–256) ทำการศึกษาการนำน้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด คือ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันพบว่าความเข้มข้น 2.28 โมลของกรดไฮโดรคลอริกทำปฏิกิริยากับเอทานอล 100เปอร์เซ็นต์สามารถสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 3 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์คือเอนไซม์ไลเปสปัจจุบันมีรายงานการวิจัยว่า ด่างจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะให้ปริมาณของไบโอดีเซลมีเปอร์เซ็นต์ที่สูงสุดและใช้เวลาการทำปฏิกิริยาน้อยที่สุด แต่ปัญหาของการใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคือ จะเกิดปฏิกิริยาการเกิดสบู่ เนื่องจากแอลกอฮอล์ทำปฏิกิริยากับด่างเกิดสบู่จึงทำให้ปริมาณของไบโอดีเซลลดต่ำลงและไบโอดีเซลจากตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดและด่างต้องมีการล้างหลายครั้งเพื่อล้างด่างและกรดที่เหลืออยู่และสิ้นเปลืองน้ำ ส่วนน้ำที่ออกจากการกระบวนการสังเคราะห์ไบโอดีเซลนั้นที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งแบบกรดและด่างนั้นจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง, เกิดสบู่, แอลกอฮอล์และน้ำมันบางส่วนติดมากับน้ำทิ้งทำให้มีน้ำเสียมีค่าบีโอดีสูงยากต่อการบำบัดและการทำปฏิกิริยาของด่างนั้นจะต้องใช้อุณหภูมิที่ 90-120 องศาเซลเซียส ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานความร้อน จึงทำให้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์ในการไบโอดีเซลมากขึ้นถึงแม้ว่าการนำเอนไซม์มาใช้ในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลจะต้องลงทุนสูงและใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานกว่า ข้อดีของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาด่างคือสามารถทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส

2.6.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสการตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทำได้โดยการไตเตรทหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาที่มีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยที่ไตรกลีเซอไรด์เป็นสับสเตรท หลังจากการบ่มและทำการหยุดปฏิกิริยาแล้ว การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไฮโดรไลซิส

ชาล และคารแลม (Charle; & Dharam. 1966: 110–113) มีการตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้อิมัลชันของ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันมะกอกกับกัมอราบิกเป็นซับสเตรท และกำหนด pH เท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการไตเตรทกับ 0.01 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.17-1.32 หน่วยต่อมิลลิกรัม

ปัจจัยที่มีผลต่อการปริมาณเอทิลเอสเทอร์โดยมีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีอยู่หลายประการ เช่น

อุณหภูมิ

ซิมาดะ (Shimada; et. al 2002: 151–155) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันพืชโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิที่ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากทำปฏิกิริยาไป 6 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิปริมาณของเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นและเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสปริมาณของเอสเทอร์ที่มากที่สุดคือ 29.9เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจะทำให้ปริมาณเอสเทอร์ที่ได้ลดลง

คามานิ และเลฟฟูจิ (Kamini; & Lefuji. 2004: 405-410) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสจากน้ำมันรำข้าวโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์ไลเปสจาก *C. antarctica* โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิที่ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของเอสเทอร์ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และเมื่อเวลา 96 ชั่วโมงอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถผลิตเอสเทอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 62.3 เปอร์เซ็นต์และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจะทำให้ปริมาณเอสเทอร์จะลดลง

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์

ซิมาดะ และคณะ (Shimada; et. al. 2002: 151–155) ทำการศึกษาปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสระหว่างน้ำมันที่เหลือใช้ทางการค้ากับเมทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ตรึงรูปจาก *C. antarctica* โดยมีการเติมเมทานอลเป็นขั้นๆไป พบว่า อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันที่เหลือใช้ทางการค้ากับเมทานอลที่เหมาะสมในการทดลองคือ 1:3

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในสังเคราะห์ไบโอดีเซล
2. เตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลองสังเคราะห์ไบโอดีเซล
3. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป
4. ศึกษาสภาวะที่ใช้สังเคราะห์ไบโอดีเซลทำการทดลองในรูปเอทิลเอสเทอร์
5. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1. วัตถุดิบ

1.1 น้ำมันปาล์มดิบแยกยางเหนียว (ผู้ผลิต: บริษัท ชุมพรอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม (มหาชน) จำกัด, ประเทศไทย)

1.2 น้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ (ผู้ผลิต: บริษัท มรกต อินดัสตรี้ (มหาชน) จำกัด, ประเทศไทย)

1.3 น้ำมันมะกอก เกรดอาหาร (ผู้ผลิต: บริษัท อิโฮส เด บาร์ดินา เอส เอ เมืองเซบียา ประเทศสเปน)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์

2.1.1 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* (ผู้ผลิต: Fluke Co.,Ltd, สมาพันธ์รัฐสวิส)

2.1.2 โซเดียมอัลจิเนต สารที่ใช้ในการตรึงรูป

2.1.3 เอทานอล (C_2H_5OH) ค่าความบริสุทธิ์ 95 เปอร์เซ็นต์ เกรดอุตสาหกรรม

2.1.4 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

2.1.5 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)

2.1.6 โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ($COOHC_4H_6COOK$)

2.1.7 กรดโอลิอิก เกรดวิเคราะห์

2.1.8 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

2.1.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

2.1.10 กัมอราบิก (Gum arabic)

2.1.11 อะซิโตน (Acetone)

2.2 สารมาตรฐานสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเอทิลเอสเทอร์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

2.2.1 เอทิลปาล์มมิเตท ($C_{18}H_{36}O_2$) ค่าความบริสุทธิ์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ผู้ผลิต: Fluka Chemika Co.,Ltd., ประเทศญี่ปุ่น) เป็นสารมาตรฐาน

2.2.2 เอทิลโอลิเอท ($C_{20}H_{38}O_2$) ค่าความบริสุทธิ์ 60 เปอร์เซ็นต์ (ผู้ผลิต: Fluka Chemie Co.,Ltd., สมาพันธ์รัฐสวิส) เป็นสารมาตรฐาน

2.2.3 เมทิลเพนตะดิคาโนเอต ($C_{16}H_{32}O_2$) เป็นสารอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (ผู้ผลิต: Fluka Chemika Co.,Ltd., สมาพันธ์รัฐสวิส)

2.2.4 เฮกเซน (C_6H_{14}) น้ำหนักโมเลกุล 86.07 กรัมต่อโมล (ผู้ผลิต: J.T. Baker Co.,Ltd., สหรัฐอเมริกา)

2.3 สารมาตรฐานสำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

2.3.1 ไตรเคปริน (1, 2,3 –Tricaproylglycerol) ผู้ผลิต: Fluka Chemie Co.,Ltd., สมาพันธ์รัฐสวิส) เกรดวิเคราะห์ สารมาตรฐานไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะแบ่งออกเป็น

1 – monooleoylglycerol (Monoolein) เป็นสารมาตรฐานโมโนกลีเซอไรด์

1, 3 – di oleoylglycerol (Diolein) เป็นสารมาตรฐานไดกลีเซอไรด์

1,2,3 – Tricaproylglycerol (Triolein) เป็นสารมาตรฐานไตรกลีเซอไรด์

2.3.2 1,2,4 – butanetriol สารมาตรฐานกลีเซอรอล(ผู้ผลิต: Fluka Chemie Co.,Ltd., สมาพันธ์รัฐสวิส)

2.3.3 N-methyl-N-trimethysilyltrifluoroacetamide (MSTFA) (ผู้ผลิต: Fluka Chemie Co.,Ltd., สมาพันธ์รัฐสวิส)เป็นสาร Derivatizing agent จะเข้าทำปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนสารกลีเซอไรด์ให้เป็นอนุพันธ์ของกลีเซอไรด์

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1 ขวดรูปชมพู่ปริมาตร 50,125, 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.2 กรวยกรอง

3.3 เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.4 เทอร์โมมิเตอร์

3.5 กรวยแยก

3.6 บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.7 เตาแม่เหล็กให้ความร้อน

3.8 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (SANYO รุ่น orbital incubator)

3.9 เครื่องวัดค่าความเป็นความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.10 หลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 20

3.11 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

4. เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์เอทิลเอสเทอร์

4.1 เครื่องแก๊สโครโตมากราฟี (Gas Chromatography): VARIAN รุ่น CP-3800 (Varian Analytical Instruments Co.,Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4.2 Capillary column: DB-5 , J&W, ประเทศสหรัฐอเมริกา

ดีเทคเตอร์แบบ Flame ionization

เฟสคงที่: 5% phenylpolydimethylsiloxane

ความยาว 30 เมตร

เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร

วิธีการ

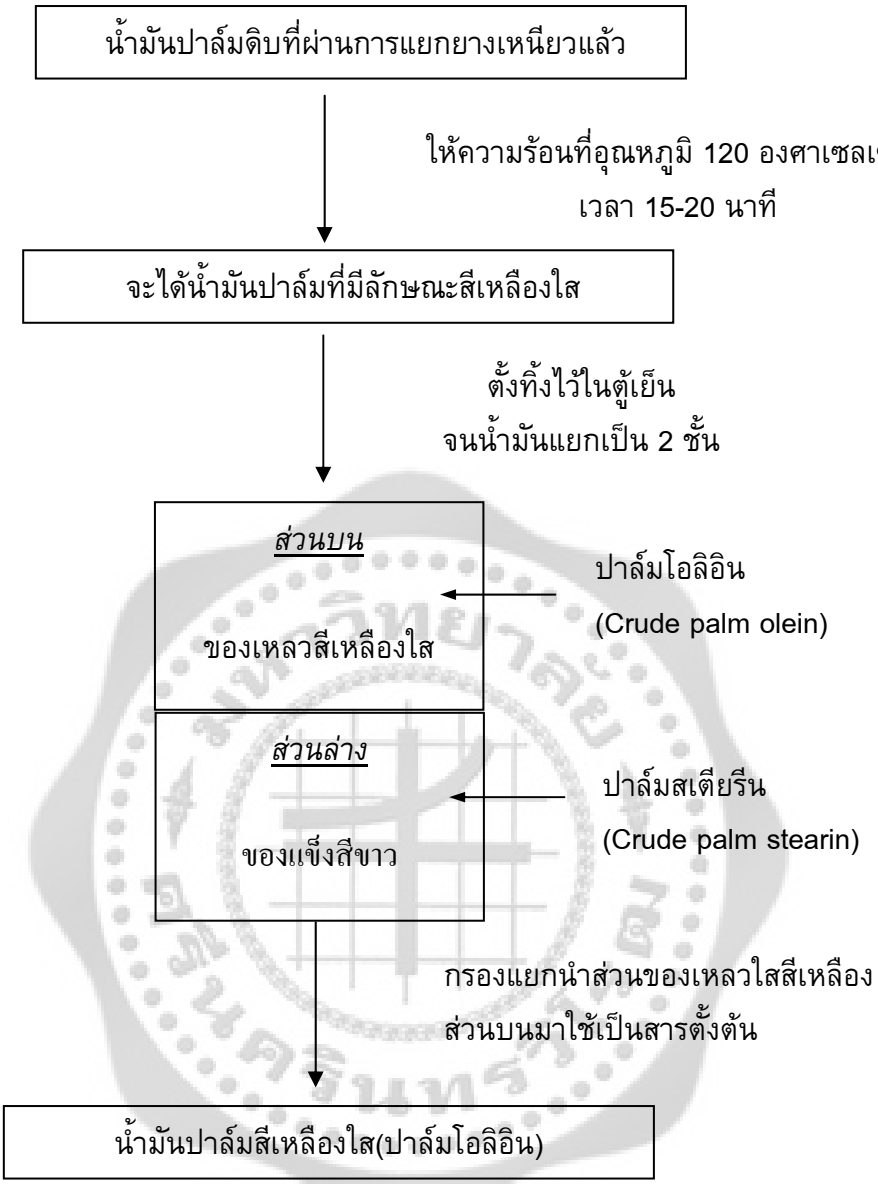
1. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป

ศึกษาความสามารถการตัดย่อยสายโมเลกุลของน้ำมันพืชให้เป็นกรดไขมันอิสระด้วยเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป ในสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันมะกอกเพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิและความเร็วรอบการเขย่า

1.1 การเตรียมวัตถุดิบ (จักรพงศ์ ไชยบุรี. 2546: 45)

การเตรียมน้ำมันปาล์มโอลิอิน โดยวิธีการตกผลึก (Crystallization) (ภาพประกอบ 14)

วิธีการตกผลึกน้ำมันปาล์มโอลิอินทำโดยการนำน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการแยกยางเหนียวแล้วมาให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นจนน้ำมันปาล์มแยกออกเป็น 2 ชั้น ทำการกรองแยกนำของเหลวใสสีเหลืองส่วนบน (น้ำมันปาล์มโอลิอิน) ไปใช้ในการทดลอง



ภาพประกอบ 14 ขั้นตอนการเตรียมน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยวิธีการตกผลึก (Crystallization)

นำน้ำมันปาล์มโอลิอินที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอลิอิน ตาราง 12 แสดงส่วนประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์มโอลิอิน

ตาราง 12 ส่วนประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์มโอลิอิน

ส่วนประกอบกรดไขมัน	ร้อยละกรดไขมัน
<u>กรดไขมันอิ่มตัว</u>	
กรดลอริก	0.2
กรดไมริสติก	0.5
กรดปาล์มิติก	42.7
กรดสเตียริก	2.3
กรดอะราคิดิก	0.2
<u>กรดไขมันไม่อิ่มตัว</u>	
กรดโอลีอิก	44.9
กรดไลโนลีอิก	8.6
กรดไลโนลีนิก	0.3
อื่น ๆ	0.3

วิเคราะห์ที่: กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

1.2 การเตรียมเอนไซม์ไลเปส

1.2.1 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสอิสระ

นำเอนไซม์ไลเปส 1 กรัมละลายใน 10 มิลลิลิตรของ 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็น

1.2.2 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

1.2.2.1 นำโซเดียมอัลจิเนต 0.2 กรัมใส่ใน 10 มิลลิลิตรของสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 ให้ความร้อนจนโซเดียมอัลจิเนตละลาย ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เนื่องจากถ้าอุณหภูมิลดลงกว่านี้จะทำให้โซเดียมอัลจิเนตจับตัวกัน

1.2.2.2 เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสโดยการเติมเอนไซม์ไลเปส 0.1 กรัม ลงในสารละลายจากข้อ 1.2.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นใส่ในหลอดฉีดยาโดยไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ภายใน

1.2.2.3 เตรียมสารละลาย 10% w/v $CaCl_2$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

1.2.2.4 เตรียมเม็ดเจลเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปโดยการหยดสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากข้อ 1.2.2.2 ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เตรียมไว้ทีละหยด แช่ทิ้งไว้ 20 นาที จะได้เม็ดเจลเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปลักษณะทรงกลม

1.2.2.5 แยกเม็ดเจลเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปออก ล้างเม็ดเจล 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 4 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำมาผึ่งให้แห้ง จะได้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป เพื่อใช้ในการทดลองหากิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 ในตู้เย็น

1.2.3 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป :

เอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปเป็นส่วนที่ได้จากการล้างเม็ดเจลจากข้อ 1.2.2.5 เพื่อทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ว่าการตรึงรูปเอนไซม์สามารถกักเอนไซม์ได้ดีหรือไม่

1.3 การเตรียมสารตั้งต้น จะมีการเตรียมสารตั้งต้นแบ่งเป็น 3 แบบ คือ น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

1.3.1 การเตรียม 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอก:

1.3.1.1 ผสม 1% w/v กัมอราบิก 10 มิลลิลิตร 1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ 19 มิลลิลิตร และ 2% แคลเซียมคลอไรด์ 11 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นตวงสารผสมมา 9 มิลลิลิตร

1.3.1.2 เติมน้ำมันมะกอก 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายจากข้อ 1.3.1.1 ปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วรอบสูง จะได้ 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอก

กรณีของอิมัลชันของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ขั้นตอนการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1

1.4 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในน้ำมันชนิดต่าง ๆ

1.4.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

1.4.1.1 นำสารละลายเอนไซม์ไลเปสอิสระ 1 มิลลิลิตรจากข้อ 1.2.1

1.4.1.2 จากนั้น เติมลงในสารละลาย 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอกจากข้อ 1.3.1 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสตัดสายโมเลกุลของน้ำมัน เติมอะซิโตน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

1.4.1.3 ไตเตรทสารละลายจากข้อ 1.4.1.1 ด้วย 0.025 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและไม่จางหายไปภายในเวลา 30 วินาทีจากนั้น คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ศึกษาจะพิจารณาในรูปของ :

ค่าหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณกรดไขมันในรูปกรดโอลีอิก 1 ไมโครโมลที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันที่ศึกษาในเวลา 1 ชั่วโมง (สมการ 24)

หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ (ไมโครโมล) = $(M - M_0) / Slope$ (24)

เมื่อ M = ปริมาณของ KOH ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดไขมันในตัวอย่างที่เติมเอนไซม์(ไมโครโมล)

= ปริมาตรของ KOH (ml) x ความเข้มข้นของ KOH (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)

M_0 = ปริมาณของ KOH ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดไขมันใน blank (ไมโครโมล)

= ปริมาตรของ KOH (ml) x ความเข้มข้นของ KOH (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)

Slope = ความชันของกราฟมาตรฐานของกรดโอลีอิกระหว่างปริมาณของ KOH (แกน x) และปริมาณของกรดโอลีอิก (แกน y)

กรณีน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอก

1.4.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

1.4.2.1 นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากข้อ 1.2.2 จำนวน 2.5 กรัม

ทำการทดลองการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 1.4.1.2 ถึง 1.4.1.3

กรณีของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอก

1.4.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

1.4.3.1 นำเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปจากข้อ 1.2.3 จำนวน 1 มิลลิลิตร

ทำการทดลองการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 1.4.1.2 ถึง 1.4.1.3

กรณีของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอก

2. การศึกษาสภาวะที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป

สภาวะที่ศึกษามี 2 ปัจจัย คือ

(1) ความเร็วรอบการเขย่า ที่ 0, 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที

(2) อุณหภูมิ ที่ 30, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส

2.1. การศึกษาผลของความเร็วรอบการเขย่าที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป

2.1.1 การศึกษาผลของความเร็วรอบการเขย่าที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอิน และน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

2.1.1.1 นำสารละลายเอนไซม์ไลเปสอิสระ 1 มิลลิลิตรจากข้อ 1.2.1

2.1.1.2 เติมลงในสารละลาย 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอกจากข้อ 1.3.1 ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เติมอะซิโตน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

2.1.1.3 ไตเตรทสารละลายจากข้อ 2.1.1.2 ด้วย 0.025 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและไม่จางหายไปภายในเวลา 30 วินาที คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2.1.1.4 ทำการทดลองเช่นเดิมตาม 2.1.1.1 ถึง 2.1.1.3 แต่เปลี่ยนค่าความเร็วรอบการเขย่าเป็น 0, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

กรณีของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถศึกษากิจกรรมและคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอกตาม 2.1.1.1 ถึง 2.1.1.4

2.1.2 การศึกษาผลของความเร็วรอบการเขย่าที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอิน และน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

2.1.2.1 นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 500 มิลลิกรัมจากข้อ 1.2.2

2.1.2.2 เติมลงในสารละลาย 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอกจากข้อ 1.3.1 ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เติม อะซิโตน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

2.1.2.3 ไตเตรทสารละลายจากข้อ 2.1.2.2ด้วย 0.025 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและไม่จางหายไปภายในเวลา 30 วินาที คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2.1.2.4 ทำการทดลองเช่นเดิมตาม 2.1.2.1 ถึง 2.1.2.3 แต่เปลี่ยนค่าความเร็วรอบการเขย่าเป็น 0, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

กรณีของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถศึกษากิจกรรมและคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอกตาม 2.1.2.1 ถึง 2.1.2.4

2.1.3 การศึกษาผลของความเร็วรอบการเขย่าที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอิน และน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

2.1.3.1 นำน้ำล้างเม็ดเจลเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากข้อ 1.2.3 จำนวน 1 มิลลิลิตร

2.1.3.2 เติมลงในสารละลาย 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอกจากข้อ 1.3.1 ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เติม อะซิโตน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

2.1.3.3 ไตเตรทสารละลายจากข้อ 2.1.3.1 ด้วย 0.025 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและไม่จางหายไปภายในเวลา 30 วินาที คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2.1.3.4 ทำการทดลองเช่นเดิมตาม 2.1.3.1 ถึง 2.1.3.3 แต่เปลี่ยนค่าความเร็วรอบการเขย่าเป็น 0, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

กรณีของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถศึกษากิจกรรมและคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอกตาม 2.1.3.1 ถึง 2.1.3.4

2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป

2.2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอิน และน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

2.2.1.1 นำสารละลายเอนไซม์ไลเปสอิสระ 1 มิลลิลิตรจากข้อ 1.2.1

2.2.1.2 เติมลงในสารละลาย 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอกจากข้อ 1.3.1 ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เติมอะซิโตน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

2.2.1.3 ไตเตรทสารละลายจากข้อ 2.2.1.2 ด้วย 0.025 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและไม่จางหายไปภายในเวลา 30 วินาที คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2.2.1.4 ทำการทดลองเช่นเดิมตาม 2.2.1.1 ถึง 2.1.1.3 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

กรณีของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถศึกษากิจกรรมและคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอกตาม 2.2.1.1 ถึง 2.1.1.4

2.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอิน และน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

2.2.2.1 นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 500 มิลลิกรัมจากข้อ 1.2.2

2.2.2.2 เติมลงในสารละลาย 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอกจากข้อ 1.3.1 ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เติม อะซิโตน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

2.2.2.3 ไตเตรทสารละลายจากข้อ 2.2.2.2 ด้วย 0.025 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและไม่จางหายไปภายในเวลา 30 วินาที คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2.2.2.4 ทำการทดลองเช่นเดิมตาม 2.2.2.1 ถึง 2.2.2.3 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

กรณีของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถศึกษากิจกรรมและคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอกตาม 2.2.2.1 ถึง 2.2.2.4

2.2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอิน และน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์

2.2.3.1 นำน้ำล้างเม็ดเจลเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากข้อ 1.2.3 จำนวน 1 มิลลิลิตร

2.2.3.2 เติมลงในสารละลาย 10 % อิมัลชันของน้ำมันมะกอกจากข้อ 1.3.1 ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เติมอะซิโตน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาทันที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

2.2.3.3 ไตเตรทสารละลายจากข้อ 2.2.3.1ด้วย 0.025 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและไม่จางหายไปภายในเวลา 30 วินาที คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2.2.3.4 ทำการทดลองเช่นเดิมตาม 2.2.3.1 ถึง 2.2.3.3 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

กรณีของน้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ สามารถศึกษากิจกรรมและคำนวณหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับกรณีของน้ำมันมะกอกตาม 2.2.3.1 ถึง 2.2.3.4

3. การศึกษาสภาวะการสังเคราะห์ไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

สภาวะที่ศึกษาคือ:

สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล

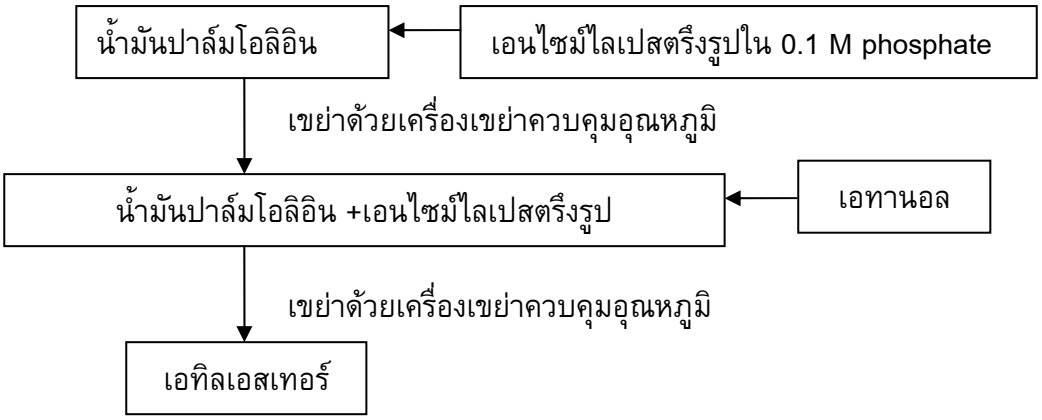
อุณหภูมิ

ความเร็วรอบการเขย่า

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส

ที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จากการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลโดยมีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามขั้นตอนต่างๆ ในภาพประกอบ 15 สภาวะที่มีผลต่อในการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์คือ สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันกับแอลกอฮอล์ อุณหภูมิ ความเร็วรอบการเขย่า และ pH



ภาพประกอบ 15 ขั้นตอนการสังเคราะห์ไบโอดีเซลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอล ที่มีเอนไซม์ตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.1 อัตราส่วนโมลน้ำมันปาล์มโอลิอินต่อเอทานอลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.1.1 คำนวณปริมาตรของน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอลที่สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล 1:1 ให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร (น้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอลเท่ากับ 840 และ 46 กรัมต่อโมล ตามลำดับ)

3.1.2 เติมน้ำมันปาล์มโอลิอินตามปริมาตรที่คำนวณไว้ใน 3.1.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 2.5 กรัมจากข้อ 1.2.2 ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอิน ปิดจุกให้แน่น ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาตัดสายไตรกลีเซอไรด์

3.1.3 เติมเอทานอลตามปริมาตรที่คำนวณไว้ใน 3.1.1 ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอินที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก 3.1.2 ปิดจุกให้แน่น ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาในการทดลองทั้งหมด 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 24, 27, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง เติมอะซิโตน 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาตามเวลาที่กำหนด

3.1.4 วิเคราะห์หาปริมาณเอทิลเอสเทอร์ซึ่งเอทิลเอสเทอร์ที่ศึกษาจะอยู่ในรูปของเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทด้วยเทคนิคแก๊สโครโตมากราฟี

3.1.5 ทำการทดลองซ้ำตาม 3.1.1 ถึง 3.1.4 และทำการเปลี่ยนสัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลเป็น 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 ตามลำดับ

3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.2.1 คำนวณหาปริมาตรของน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร

3.2.2 เติมน้ำมันปาล์มโอลิอินตามปริมาตรที่คำนวณไว้ใน 3.2.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 2.5 กรัมจากข้อ 1.2.2 ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอิน ปิดจุกให้แน่น ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาในการทดลองทั้งหมด 72 ชั่วโมง เวลา 15 นาที เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาตัดสายไตรกลีเซอไรด์

3.2.3 เติมเอทานอลตามปริมาตรที่คำนวณไว้ใน 3.2.1 ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอินที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก 3.2.2 ปิดจุกให้แน่น ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลาในการทดลองทั้งหมด 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 24, 27, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง เติมอะซิโตน 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาตามเวลาที่กำหนด

3.2.4 วิเคราะห์หาปริมาณเอทิลเอสเทอร์

3.2.5 ทำการทดลองซ้ำตาม 3.2.1 ถึง 3.2.4 และทำการเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.3 การศึกษาความเร็วรอบการเขย่าที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอส-เทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.3.1 คำนวณหาปริมาตรของน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอลที่สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร

3.3.2 เติมน้ำมันปาล์มโอลิอินตามปริมาตรที่คำนวณไว้ใน 3.3.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 2.5 กรัมจากข้อ 1.2.2 ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอิน ปิดจุกให้แน่น ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาตัดสายไตรกลีเซอไรด์

3.3.3 เติมเอทานอลตามปริมาตรที่คำนวณไว้ใน 3.3.1 ลงในสารผสมน้ำมันปาล์มโอลิอินที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก 3.3.2 ปิดจุกให้แน่น เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อุณหภูมิที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.2 ที่ความเร็วรอบการเขย่า 100 รอบต่อนาที เวลาในการทดลองทั้งหมด 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 24, 27, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง เติมอะซิโตน 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาตามเวลาที่กำหนด

3.3.4 วิเคราะห์หาปริมาณเอทิลเอสเทอร์

3.3.5 ทำการทดลองซ้ำตาม 3.3.1 ถึง 3.3.4 และทำการเปลี่ยนความเร็วรอบการเขย่าเป็น 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ตามลำดับ

3.4 การศึกษา pH ในการตรึงรูปที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริ-ฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.4.1 คำนวณหาปริมาตรของน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอลที่สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ให้ได้ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร

3.4.2 เติมน้ำมันปาล์มโอลิอินตามปริมาตรที่คำนวณไว้ใน 3.4.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด125 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 2.5 กรัมจากข้อ 1.2.2 ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอิน ปิดจุกให้แน่น ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาตัดสายไตรกลีเซอไรด์

3.4.3 เติมเอทานอลตามปริมาตรที่คำนวณไว้ใน 3.4.2 ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอินที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก 3.4.2 ปิดจุกให้แน่น เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อุณหภูมิที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.2 และความเร็วรอบการเขย่าที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.3 เวลาในการทดลองทั้งหมด 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 24, 27, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง เติมอะซิโตน 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาตามเวลาที่กำหนด

3.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณเอทิลเอสเทอร์

3.4.5 ทำการทดลองซ้ำตาม 3.4.1 ถึง 3.4.4แต่ทำการเปลี่ยนวิธีการเตรียมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เตรียมตามข้อ 1.2.2 โดยใช้สารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 5.0, 7.0 และ 9.0 ตามลำดับ

3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณเอทิลเอสเทอร์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตรกราฟี

เตรียมสารตัวอย่าง 25 มิลลิกรัม เติมสารมาตรฐานอ้างอิงคือ 1.14 M เมทิลเพนตะดิคาโนเอต 25 ไมโครลิตร ที่ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนได้ปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟโดยใช้ VARIAN รุ่น CP 3800 ดีเทคเตอร์เป็นแบบ Flame Ionization (FID) คอลัมน์ Capillary column รุ่น DB-5 ของ J&W Co.,Ltd. กำหนดอุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียส ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซพา อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ Injection 275 องศาเซลเซียส ที่สภาวะอุณหภูมิกำหนด 3 ขั้นตอน คือ ที่ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 2 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 270 องศาเซลเซียสคงที่นาน 5 นาที

การหาปริมาณเอทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นจริง สามารถคำนวณได้จากโครมาโตแกรมของแก๊สโครมาโตกราฟี โดยการนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอทิลปาล์มมิเตทและเอทิลโอลิเอท

4. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

4.1 คำนวณหาปริมาตรของน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอลให้ได้ปริมาตรรวม 25 มิลลิลิตร ที่สัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลต่าง ๆ (ตาราง 13)

ตาราง 13 อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอิน [CPO] กับเอทานอล [EtOH] ปริมาตรรวม 25 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง

[CPO] = 4 mM			[CPO] = 6 mM			[CPO] = 8 mM		
[EtOH] 4 mM	[EtOH] 6 mM	[EtOH] 8 mM	[EtOH] 4 mM	[EtOH] 6 mM	[EtOH] 8 mM	[EtOH] 4 mM	[EtOH] 6 mM	[EtOH] 8 mM

4.2 เติมน้ำมันปาล์มโอลิอินตามปริมาตรที่คำนวณไว้ในข้อ 3.3.1 ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 2.5 กรัมจากข้อ 1.2.2 ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอิน ปิดจุกให้แน่น ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาตัดสายไตรกลีเซอไรด์

4.3 เติมเอทานอลตามปริมาตรที่คำนวณไว้ในข้อ 3.3.2 ลงในสารผสมน้ำมันปาล์มโอลิอินที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากข้อ 3.1.1.2 ปิดจุกให้แน่น เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทดลองทั้งหมด 12 ชั่วโมง เนื่องจากปฏิกิริยาดำเนินได้อย่างรวดเร็ว จากนั้น เก็บตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 4, 8 และ 12 ชั่วโมง เติมอะซิโตน 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาตามเวลาที่กำหนด

4.4 วิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลา ด้วยเทคนิคแก๊สโครโตมากราฟี

4.5 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 4.1 ถึง 4.4 และทำการเปลี่ยนสัดส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลตามตาราง 13

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

รายงานการวิจัยนี้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในรูปของเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi ในการอธิบายจลนพลศาสตร์มีผลการทดลองดังนี้

4.1 ลักษณะของเอนไซม์ตรึงรูป

ผลการศึกษารูปร่างของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยวิธีแบบห่อหุ้ม (entrapping) โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตเป็นสารห่อหุ้ม พบว่า มีลักษณะเป็นทรงกลมมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.0 - 3.0 มิลลิเมตรและมีมวลของเอนไซม์ตรึงรูปประมาณ 1.0 - 2.0 กรัม หลังจากขั้นตอนการล้างเม็ดเจลเอนไซม์ตรึงไลเปสรูปด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ใช้ในขั้นตอนการล้างเม็ดเจลเอนไซม์ตรึงไลเปสรูปด้วยวิธี Lowry เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่หลุดออกมาจากการตรึงรูป และพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่อยู่ในน้ำล้างคิดเป็น 3.92 เปอร์เซ็นต์ และการตรึงรูปเอนไซม์ในรูปเม็ดเจลสามารถกักเก็บ คิดเป็น 96.08 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการห่อหุ้มโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตเป็นสารห่อหุ้ม สามารถตรึงเอนไซม์ไลเปสได้

4.2 ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารตั้งต้นแต่ละชนิด

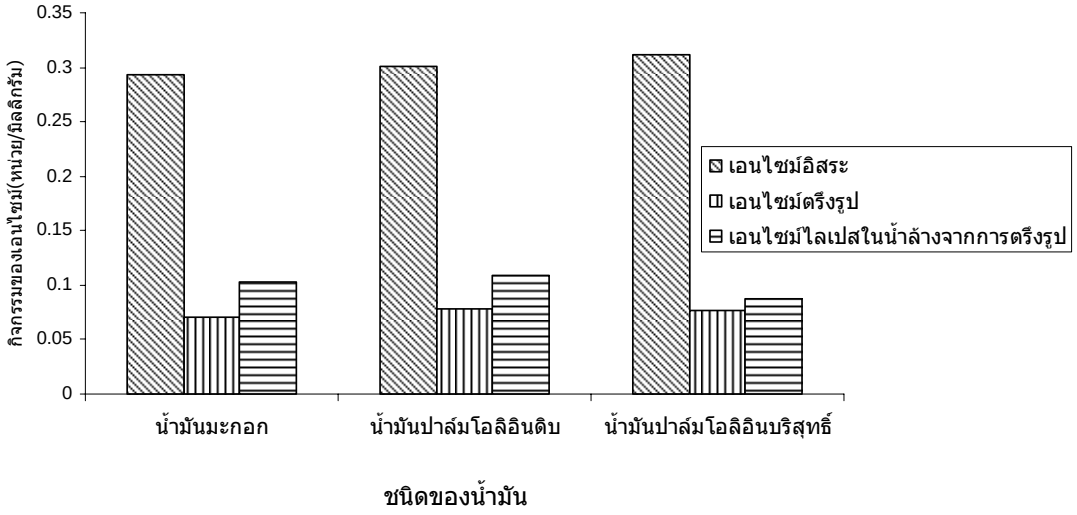
ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในน้ำมันปาล์มชนิดต่างๆ โดยใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปเติมลงในสารตั้งต้นของน้ำมันแต่ละชนิดจากนั้นไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปโดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ 1 หน่วย คำนวณจาก ปริมาณกรดไขมัน 1 ไมโครโมลที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาการย่อยของน้ำมันที่ศึกษาในเวลา 1 ชั่วโมงโดยหาค่ากิจกรรมด้วยวิธี Routine measurement of microbial lipase เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 แบบ รวมทั้งเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารตั้งต้นอื่นๆได้แก่ น้ำมันปาล์มโอลิอินน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์และน้ำมันมะกอกผลที่ได้แสดงดังภาพ 16 พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยน้ำมันปาล์มโอลิอินได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์และน้ำมันมะกอก จึงทำให้เมื่อคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ที่มีต่อน้ำมันปาล์มโอลิอินแล้วจะได้กิจกรรมที่สูงกว่า โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเอนไซม์อิสร, เอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคือ 0.301, 0.079, 0.110 หน่วยต่อมิลลิกรัม สูงกว่าน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์และน้ำมันมะกอกเมื่อใช้เวลาในการย่อย 15 นาทีเท่ากัน

ความสามารถของเอนไซม์อิสระในการย่อยน้ำมันปาล์มโอลิอินดีกว่าน้ำมันปาล์มน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์และน้ำมันมะกอกโดยย่อยน้ำมันปาล์มโอลิอินได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ 1.32 เปอร์เซ็นต์และน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ได้ดีกว่าน้ำมันมะกอก 4.91 เปอร์เซ็นต์ กรณีความสามารถของเอนไซม์ตรึงรูปในการย่อยมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเอนไซม์อิสระคือ น้ำมันปาล์มโอลิอินได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ 2.53 เปอร์เซ็นต์และน้ำมันปาล์มโอลิอินได้ดีกว่าน้ำมันมะกอก 12.53 เปอร์เซ็นต์

ความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในการย่อยน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบดีกว่าน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ 20.06 เปอร์เซ็นต์และดีกว่าน้ำมันมะกอก 10.09 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ พบว่าเอนไซม์อิสระมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าเอนไซม์ตรึงรูปอยู่ 0.297 หน่วยต่อมิลลิกรัมเอนไซม์หรือคิดเป็น 74.10 เปอร์เซ็นต์ ในการตรึงรูปเอนไซม์จะใช้เอนไซม์อิสระ 1.15 กรัมนั้น เอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปมีเอนไซม์อิสระหลุดออกมาจากการตรึงรูปอยู่ 38.87 มิลลิกรัมและเอนไซม์ที่ตรึงรูปอยู่ 1.14 กรัม จะเห็นว่าการตรึงรูปแบบห่อหุ้มด้วยเจล หรือ (Gel entrapping) จะทำให้เอนไซม์อิสระหลุดออกจากการตรึงรูปคิดเป็น 3.92เปอร์เซ็นต์และการตรึงรูปสามารถกักเอนไซม์ได้ 96.08 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในรูปของเอนไซม์ไลเปสอิสระในน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระมีความสามารถในการย่อยน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์เท่ากับ 0.293, 0.301 และ 0.312 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมีความสามารถในการย่อยน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์เท่ากับ 0.071, 0.079 และ 0.077 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปมีความสามารถในการย่อยน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์เท่ากับ 0.102, 0.103 และ 0.089 หน่วยต่อมิลลิกรัม จะเห็นว่า เอนไซม์ไลเปสอิสระมีความสามารถในการย่อยน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอลิอินและน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ได้มากกว่าเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป เนื่องจาก เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างเต็มที่ แต่ในทางกลับกันสารโพลิเมอร์สำหรับห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ภายในจะมีผลกระทบต่อเสถียรภาพของโปรตีนโดยตรง



ภาพประกอบ 16 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารตั้งต้นน้ำมันแต่ละชนิด

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่มีผลกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ, เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในสารตั้งต้นของน้ำมันชนิดต่าง ๆ

สภาวะที่ทำการทดลองคือ:

ความเร็วรอบการเขย่า

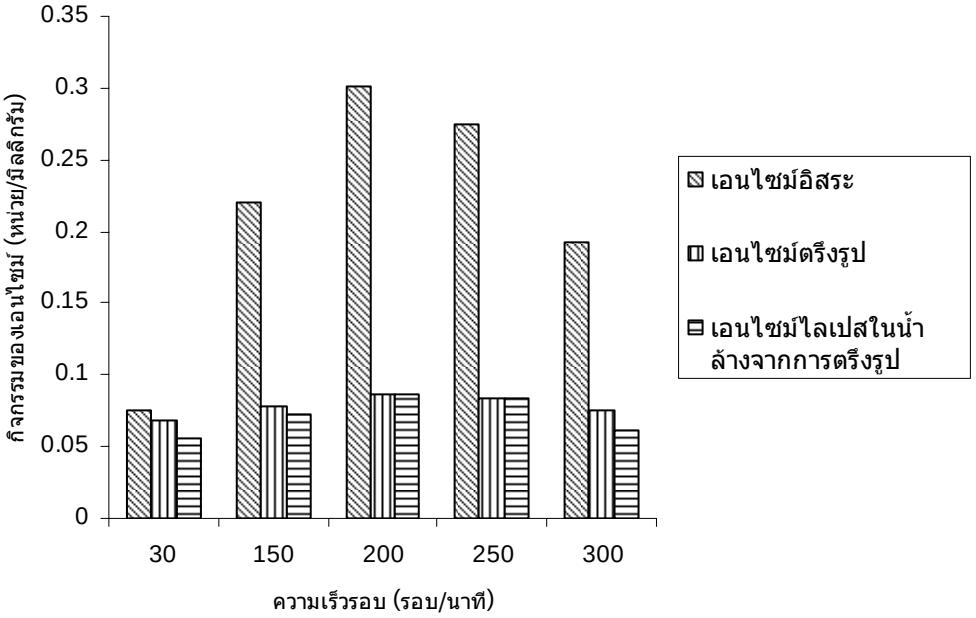
อุณหภูมิ

ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปมีผลการทดลองดังนี้

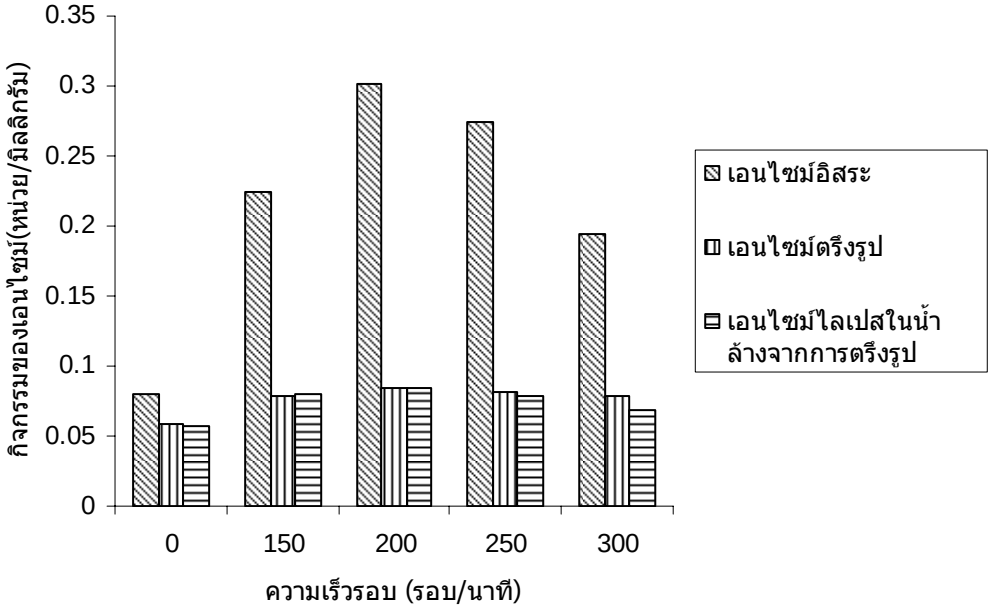
4.3.1 ผลของความเร็วรอบการเขย่า

ผลการศึกษาความเร็วรอบการเขย่าที่มีผลต่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำมันชนิดต่าง ๆ โดยศึกษาความเร็วรอบที่ 0,150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้น หากิจกรรมของเอนไซม์ ผลที่ได้แสดงดังภาพ 17 พบว่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที นั้นมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าความเร็วรอบในการเขย่าอื่นๆ ทั้งในเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มโอลิอิน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามลำดับดังนี้ 0.301, 0.089, 0.090 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เอนไซม์ในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ 0.309, 0.098, 0.097 หน่วยต่อมิลลิกรัมตามลำดับ

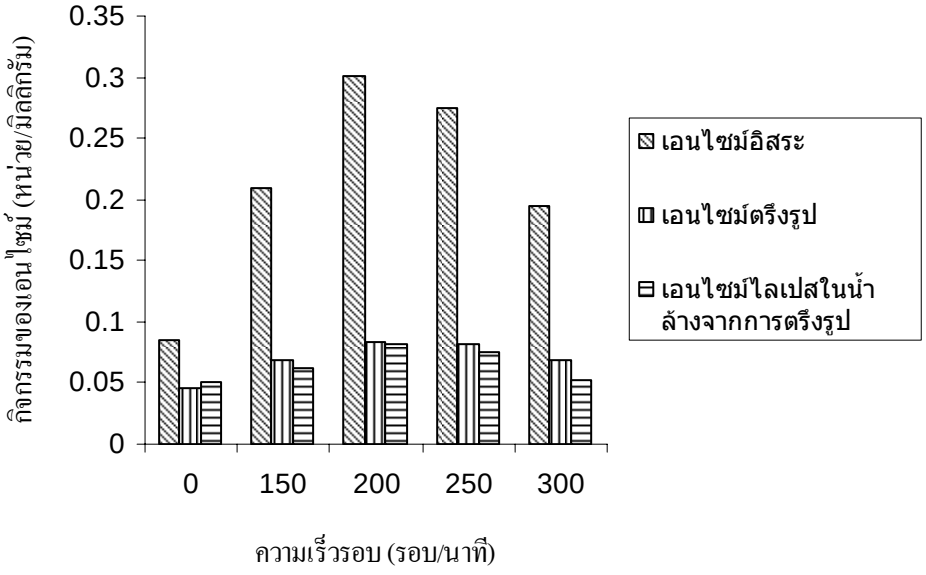
เอนไซม์ในสารตั้งต้นของน้ำมันมะกอกมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามลำดับดังนี้ 0.301, 0.085, 0.095 หน่วยต่อมิลลิกรัม กิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเร็วรอบการเขย่าต่างๆ มีผลต่อการกระจายตัวและการถ่ายเทมวลสาร (Mass transfer) พบว่าความเร็วรอบในการเขย่าที่ 100 และ 150 รอบต่อนาทีนั้นจะทำให้มีการกระจายตัวของสารน้อยและมีการถ่ายเทมวลสารน้อยด้วย ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 250 และ 300 รอบต่อนาที ที่ความเร็วรอบการเขย่าที่สูงเกินไปจึงจะทำให้อากาศเข้าไปในสารละลายไลเปสระหว่างการดำเนินปฏิกิริยาได้ง่ายทำให้เอนไซม์เกิดการออกซิเดชันได้ และพบว่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิดที่ความเร็วรอบต่างๆ ไปทางเดียวกัน ในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มโอลิอิน, น้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์และน้ำมันมะกอก



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพประกอบ17 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบและกิจกรรมของเอนไซม์ (ก) น้ำมันปาล์มโอลิอิน (ข) น้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ (ค) น้ำมันมะกอก

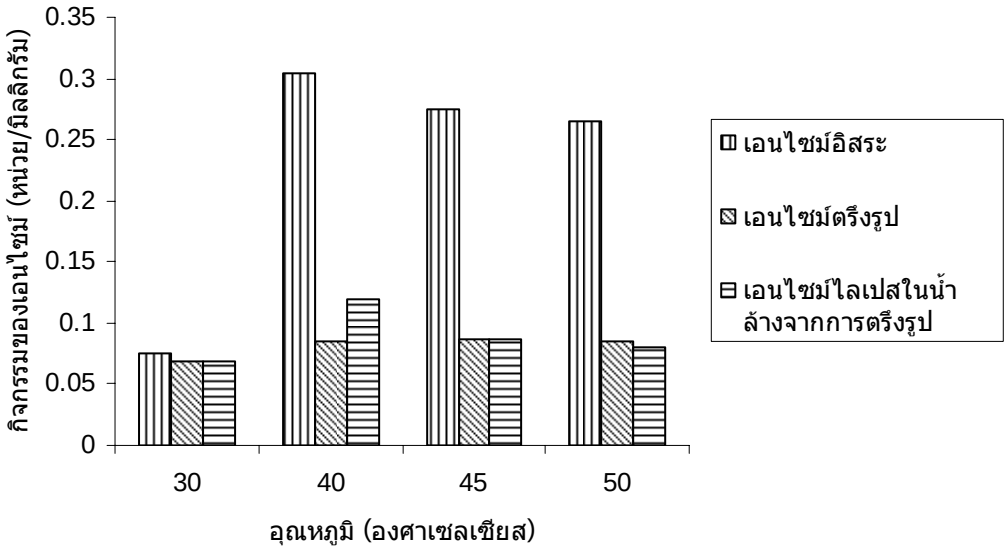
4.3.2 ผลของอุณหภูมิ

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันชนิดต่าง ๆโดยใช้อุณหภูมิคือ 30, 40, 45, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นหากิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถทนต่ออุณหภูมิไม่เท่ากันเช่นเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส (Chen Jech Wi; et.al.2001) ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 – 45 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลง โดยเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* จะมีประสิทธิภาพการทำงานลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นแต่ไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส (Shimada; et.al. 2002) เนื่องจากที่อุณหภูมิสูง เอนไซม์ไลเปสซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งจะเกิดการเสียสภาพได้ ประสิทธิภาพการทำงานจึงต่ำลง

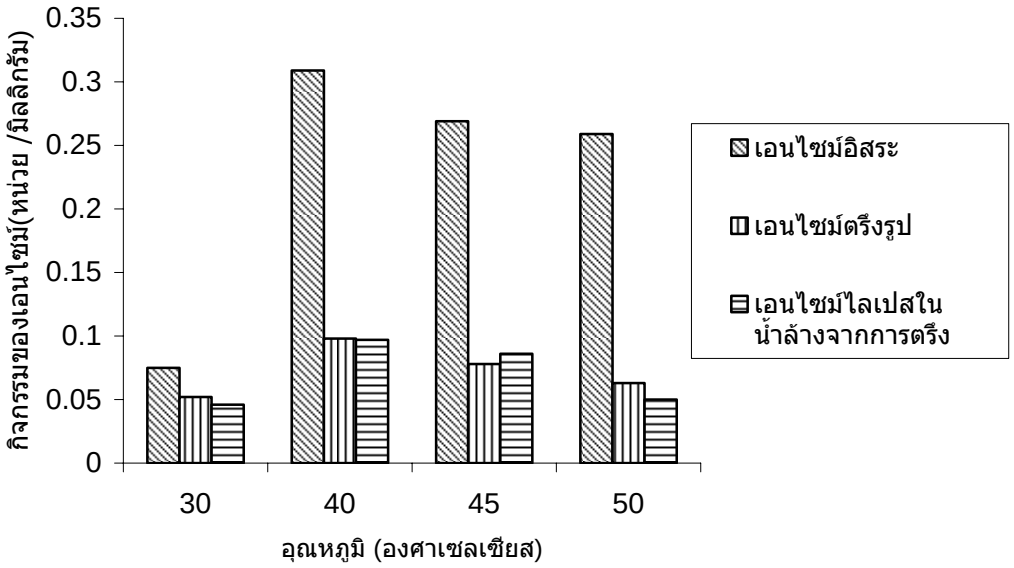
จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูปในสารตั้งต้นน้ำมันปาล์มโอลิอินมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามลำดับดังนี้ 0.305, 0.085, 0.123 หน่วยต่อมิลลิกรัม

เอนไซม์ในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามลำดับดังนี้ 0.309, 0.098, 0.097 หน่วยต่อมิลลิกรัม

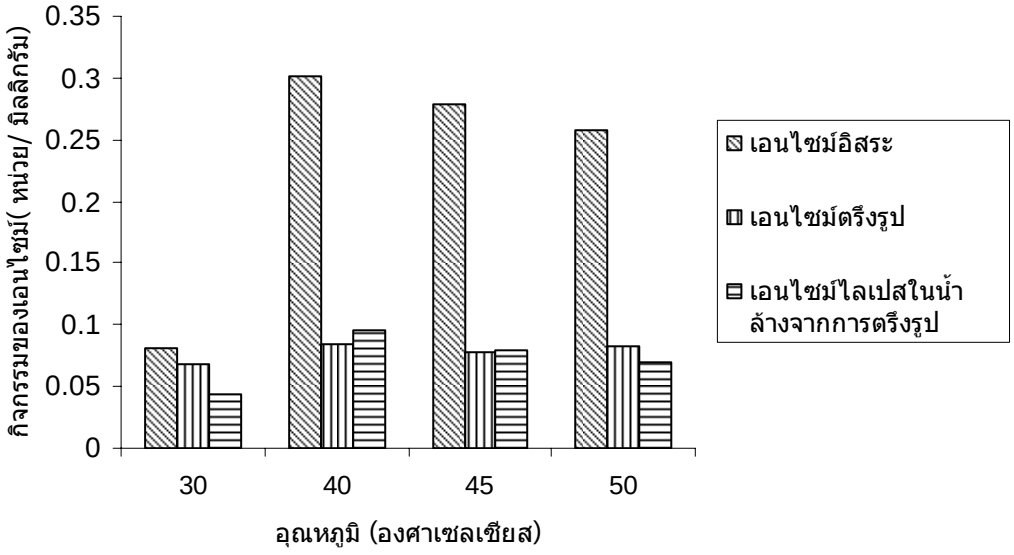
เอนไซม์ในสารตั้งต้นของน้ำมันมะกอกมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามลำดับดังนี้ 0.301, 0.085, 0.095 หน่วยต่อมิลลิกรัม พบว่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ ไปทางเดียวกันในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์และน้ำมันมะกอก (ภาพประกอบ 18)



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพประกอบ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันชนิดต่าง ๆ (ก) น้ำมันปาล์มโอลิอิน (ข) น้ำมันปาล์มโอลิอินบริสุทธิ์ (ค) น้ำมันมะกอก

4.4 ผลการศึกษาสภาวะการสังเคราะห์ไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

สภาวะที่ทำการทดลองคือ:

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล

อุณหภูมิ

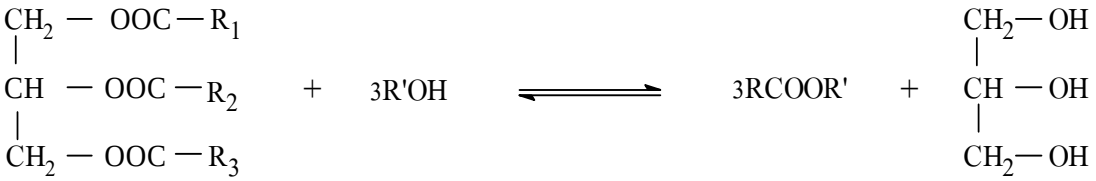
ความเร็วรอบการเขย่า

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส

ที่มีต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยเทคนิคแก๊สโครโตมากราฟี

4.4.1 <u>ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล</u>

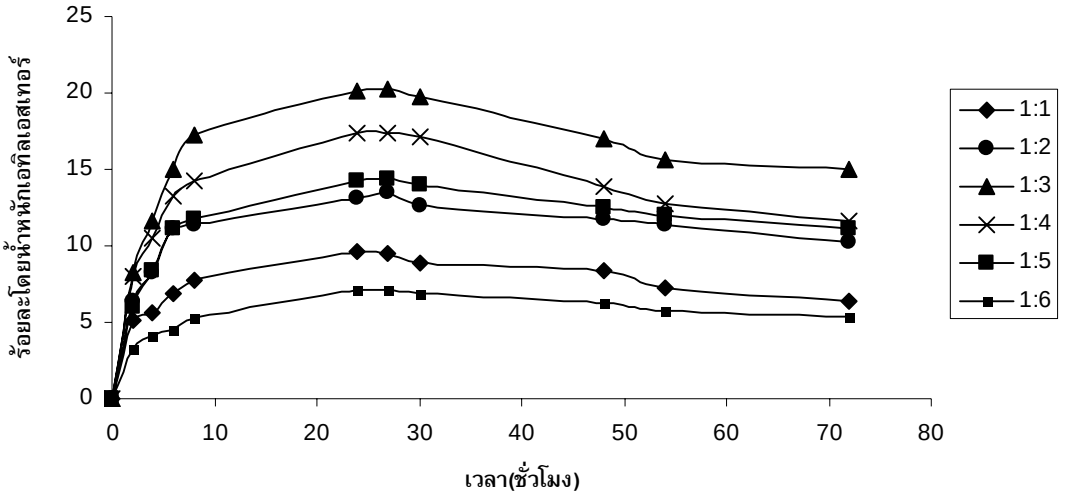
ผลการศึกษาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่มีต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยเทคนิคแก๊สโครโตมากราฟี การเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วที่เวลา 8 ชั่วโมงและจะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง จากการทำการทดลองโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล คือ1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ1:6 พบว่า อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันโอลิอินกับเอทานอล 1:3 จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 20.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 13.76 และ 6.67 โดยน้ำหนักตามลำดับ เนื่องจากเป็นไปตามสมดุลโมลระหว่างน้ำมันกับแอลกอฮอล์ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน



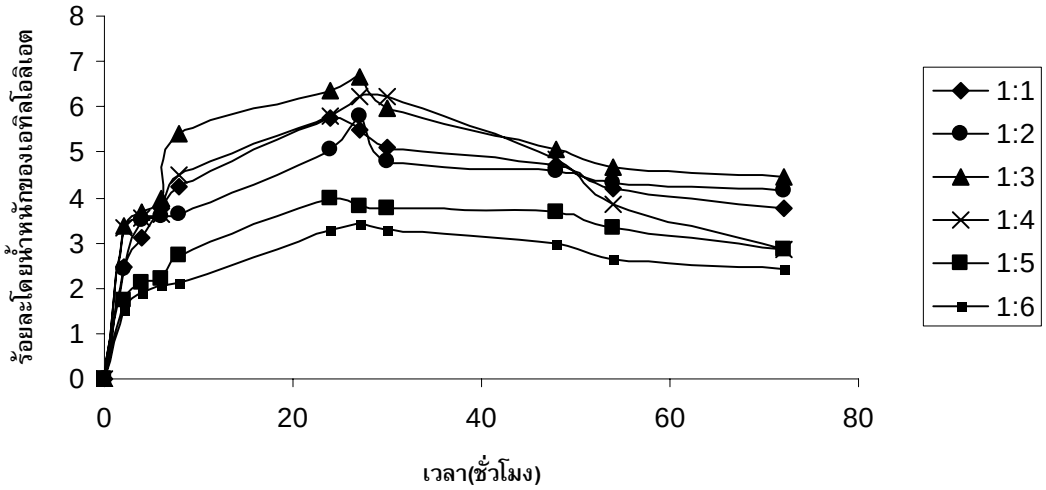
น้ำมัน แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ กลีเซอรอล

และพบว่า ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันโอลิอินกับเอทานอล 1:1 และ 1:2 จะมีเจลสีขาวของน้ำมันอยู่ทางด้านล่าง เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสนั้นสามารถตัดสายโซ่ของไตรกลีเซอไรด์ได้ดี แต่ไม่สามารถที่จะทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ทันทีจึงทำให้กรดไขมันอิสระนั้นเกิดเป็นเจลสีขาว

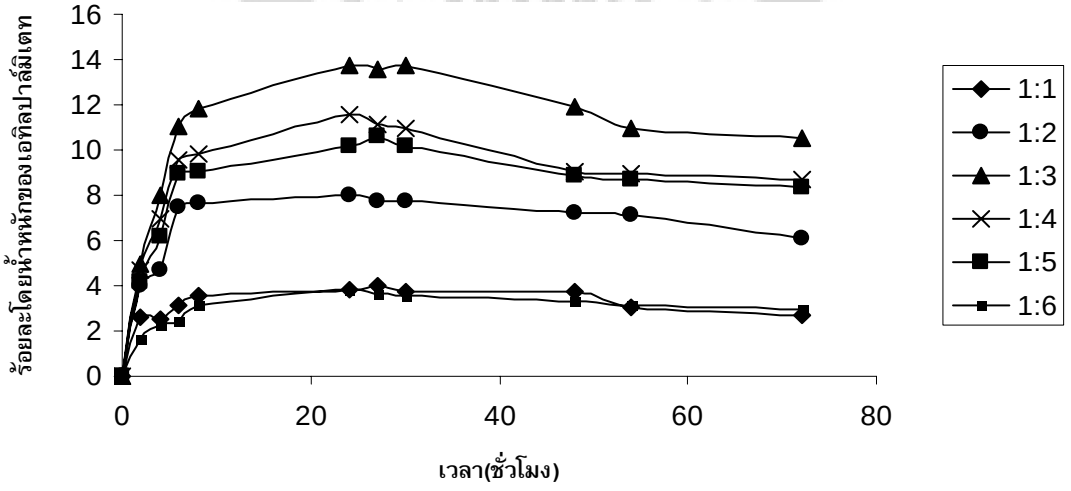
ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล 1:4 จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 18.26 แบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 11.05 และ 7.21 ตามลำดับ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างโอลิอินกับเอทานอล 1:5 จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 15.29 แบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 9.05 และ 6.24 ตามลำดับ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล 1:6 จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 8.19 โดยแบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 4.05 และ 4.14 ตามลำดับ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล 1:2 จะมีร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 14.05 แบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 7.09 และ 6.69 ตามลำดับ น้อยกว่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล1:3 เนื่องจากไม่ถูกต้องตามสมดุลโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับแอลกอฮอล์ ดังภาพประกอบ 19



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพประกอบ 19 ความสัมพันธ์ของร้อยละโดยน้ำหนักของ (ก) เอทิลเอสเทอร์ (ข) เอทิลปาล์มิเตท (ค) เอทิลโอลิเอทและเวลาที่ค่าต่าง ๆ ของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอล

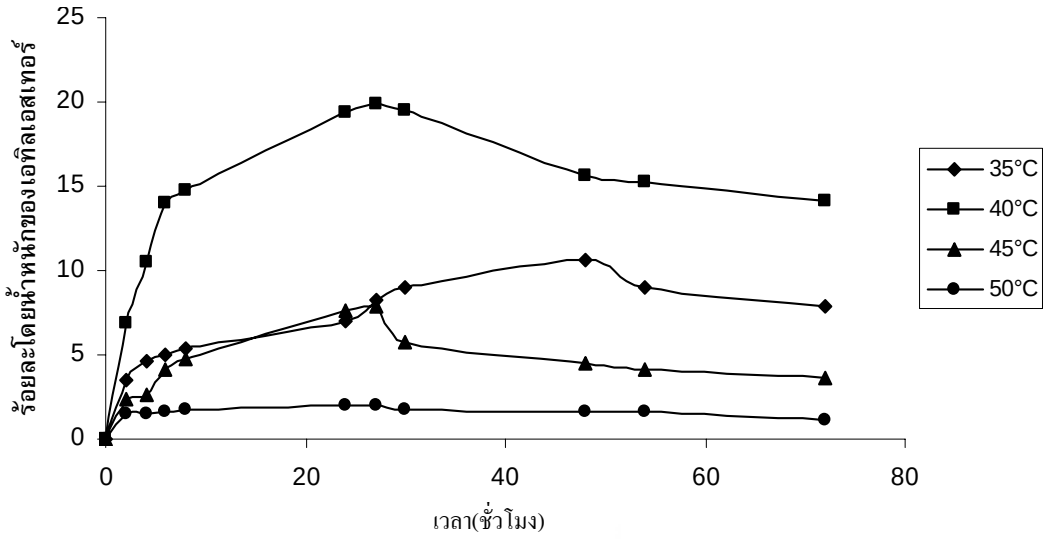
4.4.2 ผลของอุณหภูมิ

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 60 องศาเซลเซียสและจะทำงานได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียสและเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* สามารถทนความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะมีประสิทธิภาพการทำงานลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างตติยภูมิเรียงตัวกันในทิศทางที่จะต้องจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา(Active site) ดังนั้น ถ้ามีอุณหภูมิสูงกว่าสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์มีพลังงานมากเกินไปจะเกิดการสูญเสียของพันธะโควาเลนท์ ส่งผลทำให้เกิดแรงตึงผิวระหว่างอากาศกับน้ำไปทำลายโครงสร้างตติยภูมิของไลเปสทำให้เอนไซม์ไลเปสเสียสภาพตามธรรมชาติและสูญเสียค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไป แต่ถ้ามีอุณหภูมิต่ำกว่าสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะทำให้มีพลังงานที่ต่ำทำให้เอนไซม์นั้นไม่สามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาได้เต็มที่

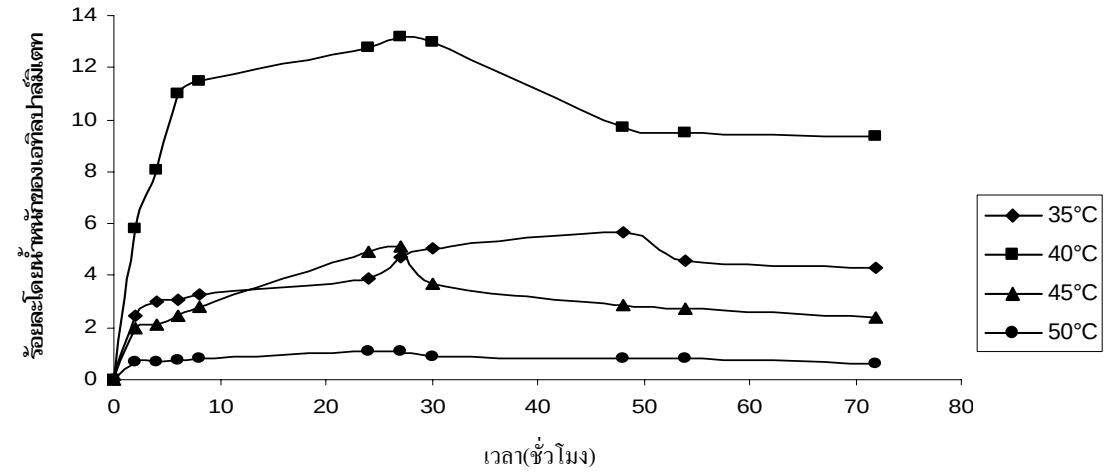
คามินิ และเลฟฟูจิ (Kamini; & Lefuji. 2001) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสจากน้ำมันรำข้าวโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิที่ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณของเอสเทอร์ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

จากภาพประกอบ 20 พบว่าเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลา 27 ชั่วโมง จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 20.15 แบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 15.05 และ 5.10 ตามลำดับ และพบว่าที่เวลา 8 ชั่วโมงปฏิกิริยามีอัตราการเกิดเอทิลเอสเทอร์ สูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสจะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 12.98 แบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 6.12 และ 6.86 ตามลำดับ เนื่องจากอุณหภูมิต่ำกว่าสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะทำให้มีพลังงานที่ต่ำทำให้เอนไซม์นั้นไม่สามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาได้เต็มที่

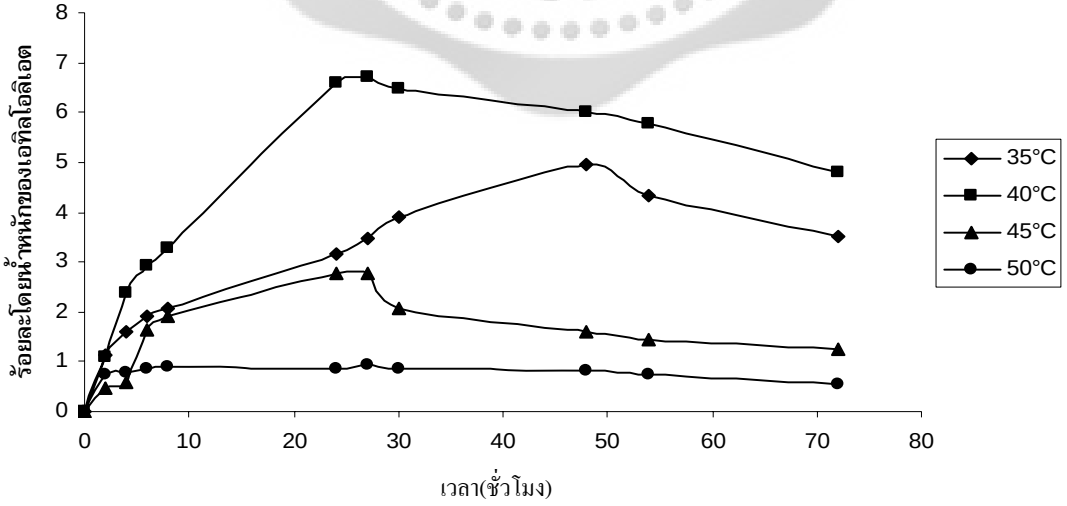
ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์ลดลงถึง 2 เท่าและ 8 เท่า ตามลำดับ เนื่องจาก เอนไซม์มีพลังงานมากเกินไปทำให้เอนไซม์ไลเปสเสียสภาพตามธรรมชาติและสูญเสียค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไป



(ก)



(ข)

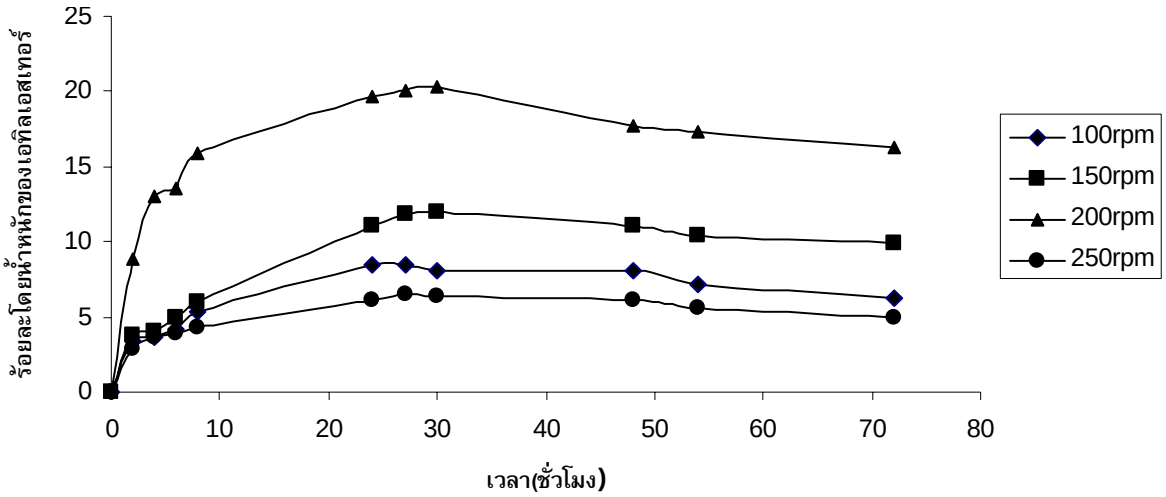


(ค)

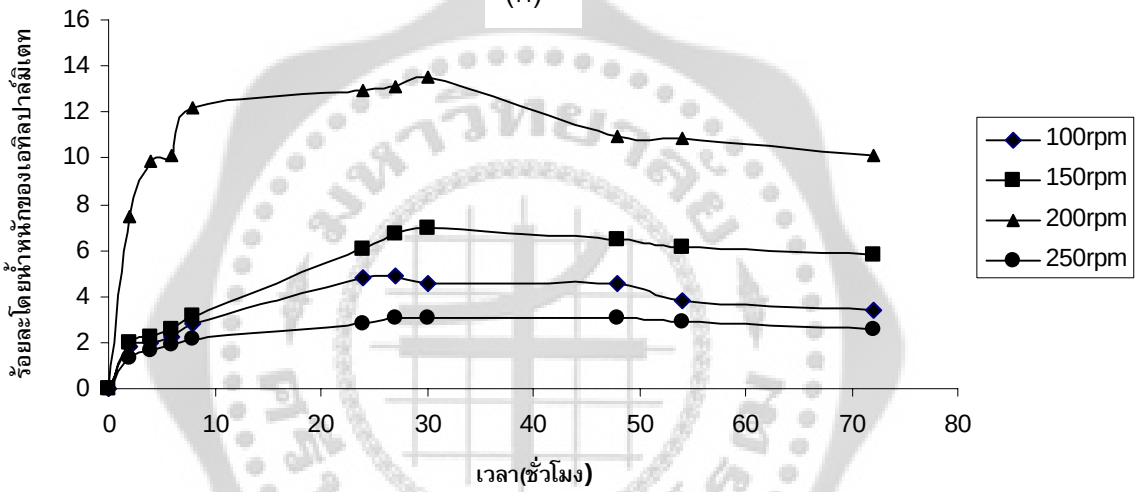
ภาพประกอบ 20 ความสัมพันธ์ของร้อยละโดยน้ำหนักของ (ก) เอทิลเอสเทอร์ (ข) เอทิลปาล์มิเตท (ค) เอทิลโอลิเอทและเวลาที่อุณหภูมิต่างๆ

4.4.3. ผลของความเร็วรอบการเขย่า

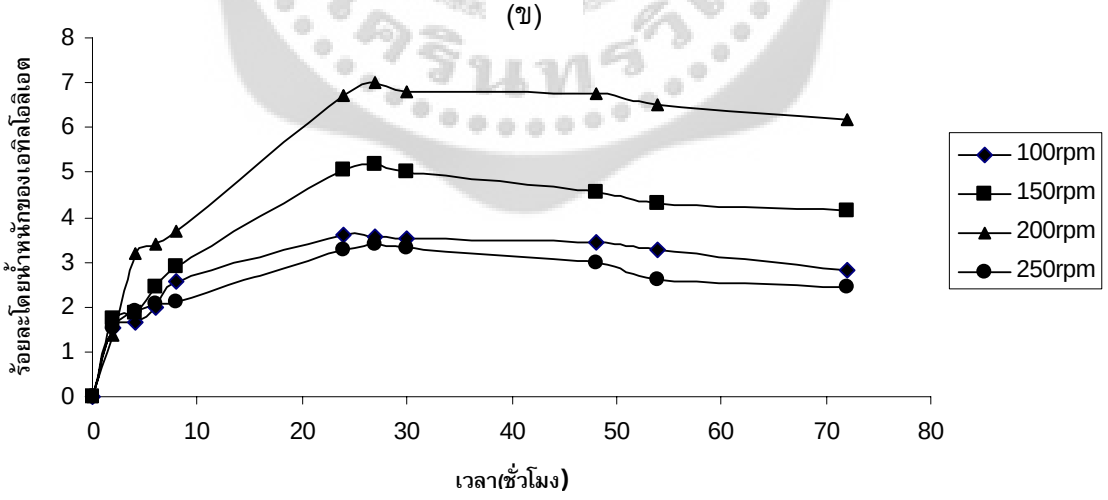
ผลการศึกษาความเร็วรอบการเขย่ามีผลต่อการถ่ายเทมวลสารระหว่างเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกับน้ำมันปาล์มโอลิอิน โดยจะส่งถ่ายมวลสารจากด้านนอกของเม็ดเอนไซม์ ที่อัตราเร็วปฏิกิริยาอาจถูกจำกัดด้วยการถ่ายเทมวลสารจากด้านนอกหรือด้านในก็ได้ และพบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจะละลายอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำ จึงไม่สามารถละลายเข้าไปในน้ำมันได้ ถ้าไม่มีการเขย่า เอนไซม์ตรึงรูปจะตกอยู่ก้นภาชนะและทำให้เอนไซม์จะย่อยไตรกลีเซอไรด์จะมีเฉพาะบริเวณพื้นที่ผิวรอบหยดที่สัมผัสกับน้ำมันเท่านั้น ดังนั้น ความเร็วรอบการเขย่าจึงมีผลโดยตรงกับค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสาร (Mass transfer coefficient) ถ้าปฏิกิริยาถูกควบคุมด้วยการถ่ายเทมวลสารจากด้านนอก ความเร็วรอบการเขย่าที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความปั่นป่วนมากขึ้น สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลจึงเพิ่มสูงขึ้น จากภาพ 22 พบว่าที่ความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 20.33 แบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 11.24 และ 9.09 ตามลำดับ ที่ความเร็วรอบการเขย่า 250 รอบต่อนาที จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 7.68 เนื่องจากสารตั้งต้นและเอนไซม์ไลเปสจะถูกเหวี่ยงรอบผิวในของภาชนะในลักษณะไหลตามกัน (Vertex) ทำให้การกระจายตัวของสารเกิดได้ไม่ดี และยังทำให้เกิดฟองอากาศเข้าไปทำปฏิกิริยาและที่ความเร็วรอบการเขย่า 100 และ 150 รอบต่อนาที จะส่งผลทำให้มีการถ่ายเทมวลสารจะน้อยและค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีประสิทธิภาพต่ำลงจะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 8.75 และ 12.36 ตามลำดับ



(ก)



(ข)



(ค)

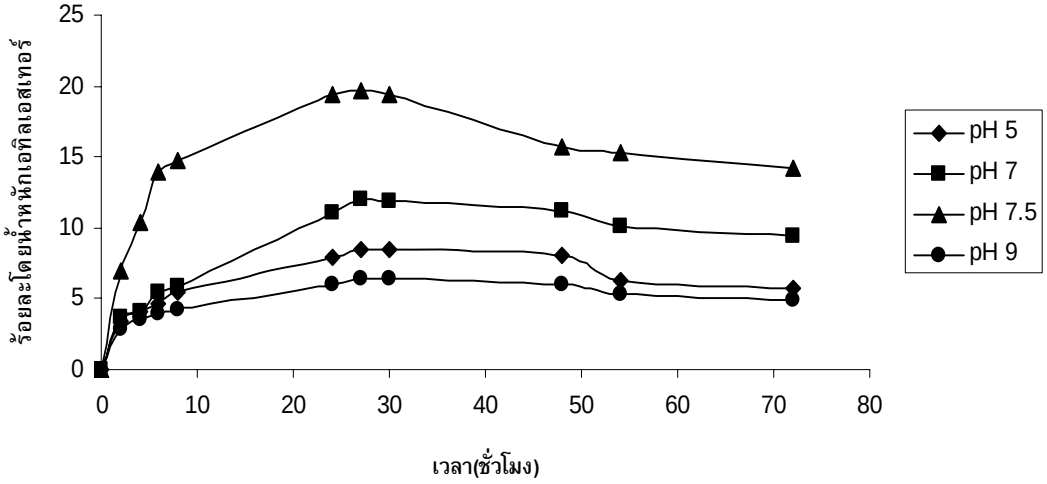
ภาพประกอบ 21 ความสัมพันธ์ของร้อยละโดยน้ำหนักของ (ก) เอทิลเอสเทอร์ (ข) เอทิลปาล์มิเตท (ค) เอทิลโอลิเอทและเวลาที่ความเร็วรอบต่างๆ

4.4.4. ผลจากค่า pH ในการตรึงรูปเอนไซม์

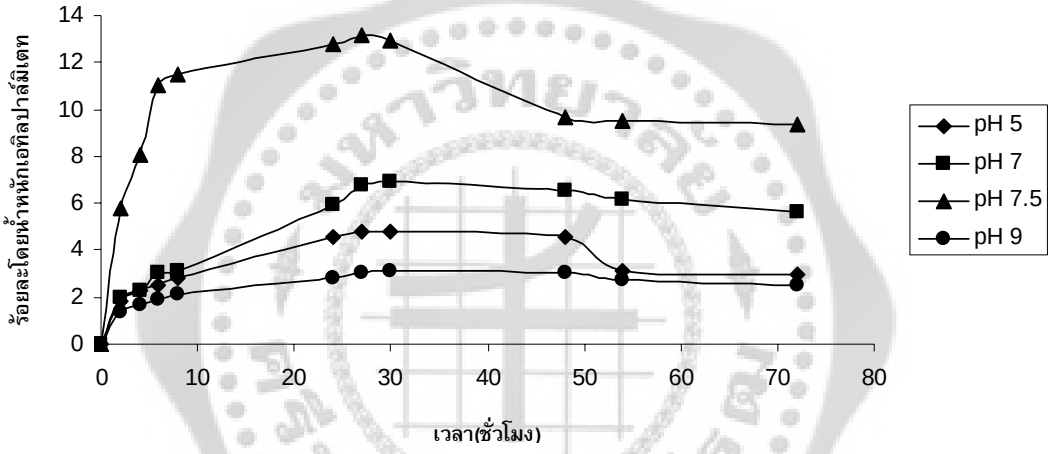
ผลการศึกษาค่า pH ในการตรึงรูปเอนไซม์พบว่าการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน [H^+] โดยจะมีการเร่งปฏิกิริยาที่ pH ช่วง 4 ถึง 10 ถ้า pH ต่ำกว่า 4 หรือสูงกว่า 10 จะส่งผลทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวร เนื่องจากเอนไซม์จะเสียสภาพและโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลาย ที่ pH ช่วงหนึ่งที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีจะเป็นช่วงที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาย้อนกลับ ซึ่งจะได้กราฟรูประฆังคว่ำ ทำให้มีการแตกตัวของหมู่แขนงข้าง R ที่กรดอะมิโนบริเวณเร่งปฏิกิริยา(Active site)

จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เตรียมในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 จะให้ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักเอทิลเอสเทอร์เท่ากับ 20.21 แบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 11.11 และ 10.10 ตามลำดับ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เตรียมในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 จะให้ปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 19.66 แบ่งเป็นเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอทร้อยละ 11.41 และ 9.25 ตามลำดับ

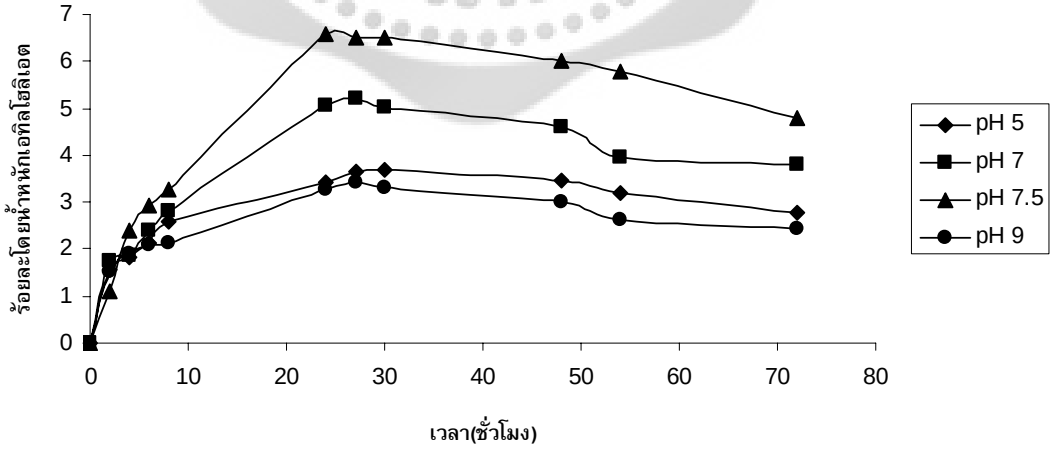
ในการศึกษาค่า pH ในการตรึงรูปช่วง 7.0 ถึง 7.5 เนื่องจากคาดว่าเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในช่วงนี้ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เตรียมในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 9 และ pH 5 จะให้ปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์ลดลงกว่า 4 เท่า ดังภาพประกอบ 22



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพประกอบ 22 ความสัมพันธ์ของร้อยละโดยน้ำหนักของ (ก) เอทิลเอสเทอร์ (ข) เอทิลปาล์มิเตท (ค) เอทิลโอลิเอทและเวลาที่ pH ในการตรึงรูปต่างๆ

4.5 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มโอลิอินที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi

การศึกษาค่าคงที่ปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จลนพลศาสตร์การผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นจะเห็นได้ว่าสารตั้งต้น 2 ชนิดคือ ไตรกลีเซอไรด์และเอทานอล ดังนั้นการศึกษา ปฏิกิริยานี้มีสับสเตรท 2 ตัว (Kinetics of two substrates) จึงใช้แบบจำลอง Ping-pong Bi Bi มาช่วยในการอธิบายกลไกปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้

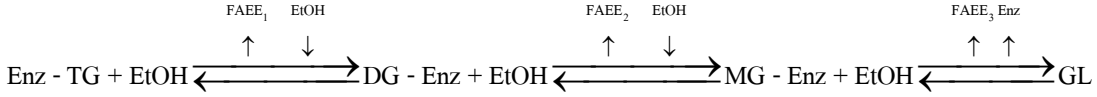
ดังนั้น ทำการศึกษาโดยให้ความเข้มข้นของสับสเตรทตัวหนึ่งคือ ไตรกลีเซอไรด์มีค่าความเข้มข้นคงที่ที่มากเกินพอแล้วแปรความเข้มข้นของสับสเตรทตัวที่สองคือเอทานอลจะทำให้ดูเหมือนว่าเอนไซม์นั้นมีสับสเตรทตัวเดียว (Pseudo single substrates) แม้ว่าในความจริงเอนไซม์ไลเปสจะไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นทั้งสองชนิดพร้อมกัน แต่เอนไซม์ไลเปสจะทำการตัดสายโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันปาล์มโอลิอินให้กลายเป็นไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ตามลำดับ จากนั้นเอทานอลจะเข้าทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ถึงแม้ว่าเอนไซม์ไลเปสนั้นจะไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นทั้งสองชนิดพร้อมกัน แต่ในกรณีนี้เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันปาล์มโอลิอิน จากนั้นเอทานอลทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับน้ำมันสอดคล้องกับงานวิจัยของ

เอล รัสซี; เอเลน เปอร์ราด และเอเลน (El Rassy; Alain Perrard; & Alain. 2004: 137-150) ได้ทำการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก Burkholderia cepacia โดยใช้เทคนิคการตรึงรูปแบบห่อหุ้มใช้สารห่อหุ้มคือ Sillica aerogelและทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระกับเอนไซม์ตรึงรูปและทำการศึกษาจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปส

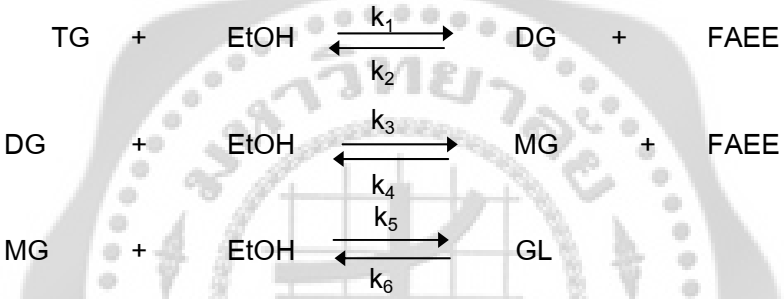
โดสเสด และคอมเบส (Dossat; & Combes 2002: 90-94) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอไลซิสของน้ำมันดอกทานตะวันโดยอาศัยเอนไซม์ตรึงรูปในสารละลายอินทรีย์ n-hexane ใช้แบบจำลอง Ping-Pong Bi Bi อธิบายจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน พบว่าเมื่อใช้น้ำมันดอกทานตะวันในอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันดอกทานตะวันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 จะให้ปริมาณเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์

สำหรับแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi อธิบายการเกิดปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ ภาพประกอบ 23 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi



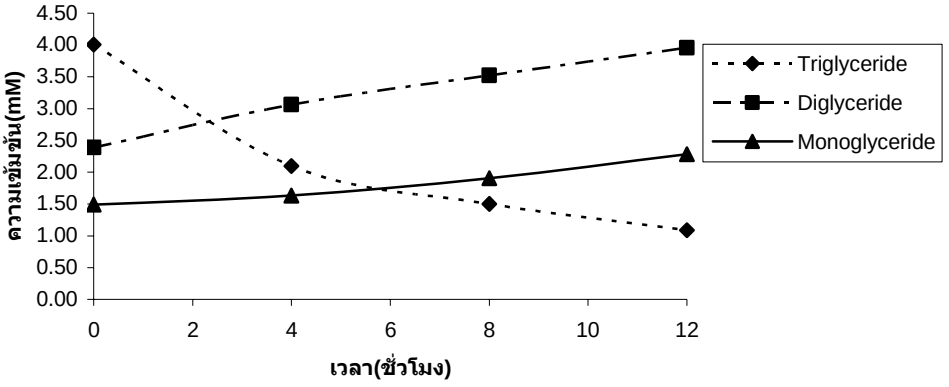
ภาพประกอบ 23 กลไกปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยอาศัยแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi

อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (Rate limiting step) การสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ดูจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไตรกลีเซอไรด์หลักเนื่องจากเป็นขั้นตอนที่มีการเปลี่ยนแปลงที่ช้าที่สุด จึงกำหนดให้การเปลี่ยนแปลงของไตรกลีเซอไรด์เป็นไดกลีเซอไรด์เป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยา (Yuanyuan Xu; & Wei Du. 2005: 241-245)

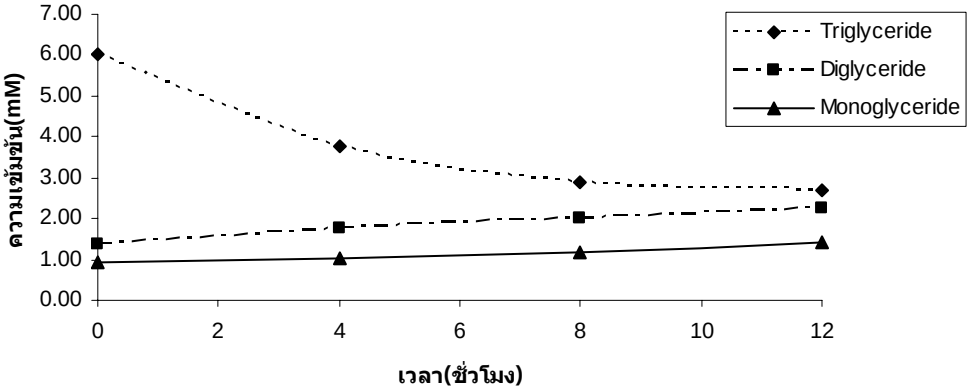


ทำการทดลองโดยออกแบบการทดลองทั้งหมด 9 การทดลอง โดยกำหนดให้มีค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ [TG] คงที่และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] 3 ค่า จากนั้นจะทำการแปรค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์อีก 2 ค่า จากวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และ โมโนกลีเซอไรด์ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลา ด้วยเทคนิคแก๊สโครโตมากราฟี

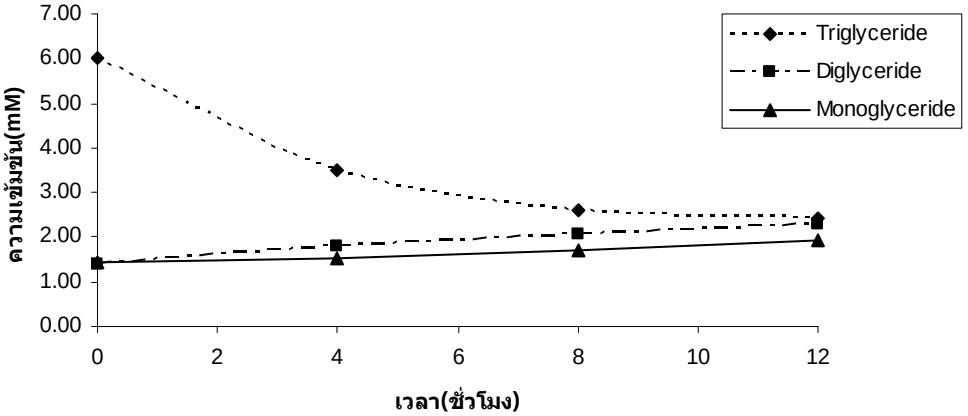
พบว่า ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 4 mM กับความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] 4 mM มีปริมาณของไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา12 ชั่วโมงเท่ากับ 3.95 mM และ 2.23 mM ดังภาพ 24 ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 6 mM มีการเปลี่ยนแปลงของไตกลีเซอไรด์ต่ำกว่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 4 mM 2 เท่าและปริมาณของไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์เกิดขึ้นน้อยกว่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 4 mM ดังภาพประกอบ 25 ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 8 mM มีการเปลี่ยนแปลงของไตกลีเซอไรด์ต่ำกว่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 4 mM และ 6 mM 3 เท่าและ 2 เท่า ตามลำดับ และปริมาณของไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์เกิดขึ้นน้อยกว่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 4 mM และ 6 mM ดังภาพประกอบ 26



(ก)

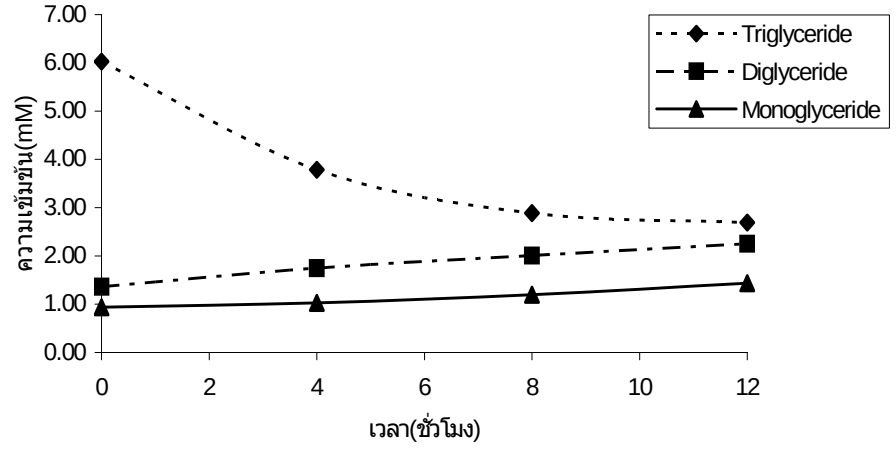


(ข)

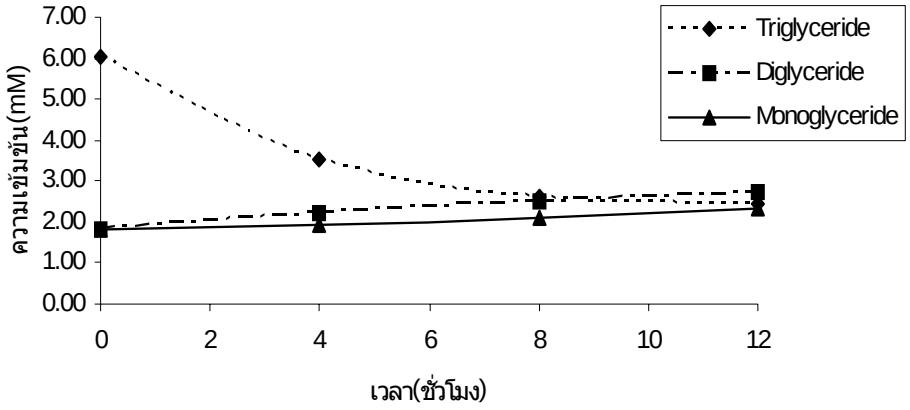


(ค)

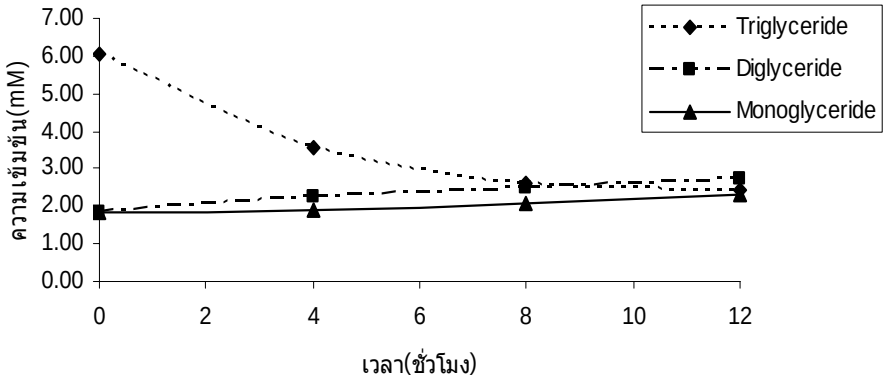
ภาพประกอบ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์[TG] 4 mM และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] (ก) [EtOH] = 4 mM (ข) [EtOH] = 6 mM (ค) [EtOH] = 8mM



(ก)

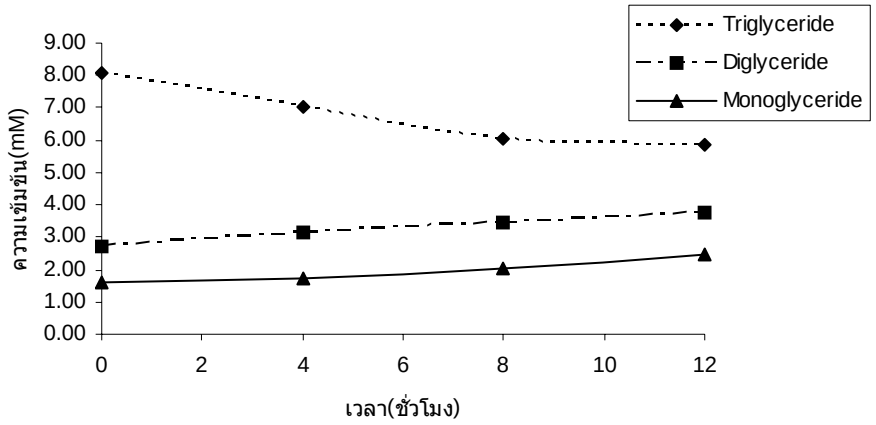


(ข)

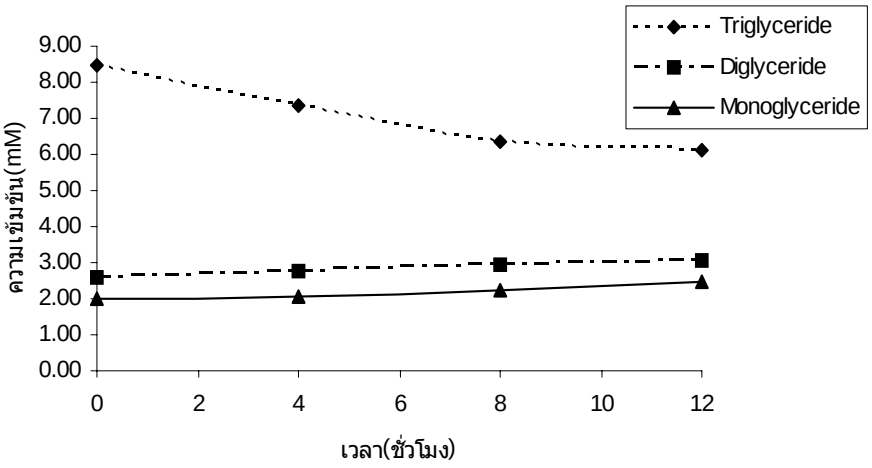


(ค)

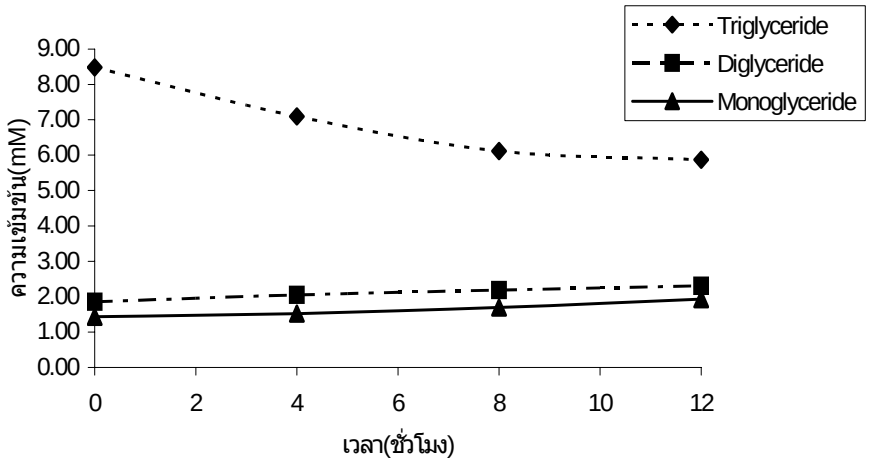
ภาพประกอบ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์[TG] 6 mM และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] (ก) [EtOH] = 4 mM (ข) [EtOH] = 6 mM (ค) [EtOH] = 8 mM



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพประกอบ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ [TG] 8 mM และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] (ก) [EtOH] =4 mM (ข) [EtOH] = 6 mM (ค) [EtOH] = 8 mM

อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาของการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ดูจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไตรกลีเซอไรด์หลักเนื่องจากเป็นขั้นตอนที่มีการเปลี่ยนแปลงที่ช้าที่สุด จึงกำหนดให้การเปลี่ยนแปลงของไตรกลีเซอไรด์เป็นไดกลีเซอไรด์เป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยา

จากรายงานการวิจัยของ Kamini & H. Lefuii.;2001:405-410 การใช้วิธีการหาค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาเทอมของมิเคลิส-เมนเทนด้วยกลไลแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi มีการยับยั้งแบบแข่งขัน พบว่า ค่าของ V_{max} =11.72 µmol/min $K_{M,acid}$ =0.00303M $K_{M,AIcohol}$ =1.5 M และ $K_{i,acid}$ =0.00306 M $K_{i,AIcohol}$ =1.05 M จะหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์จะพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไตรกลีเซอไรด์เป็นไดกลีเซอไรด์เป็นหลัก เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่มีการเปลี่ยนแปลงช้าที่สุด หรือการเปลี่ยนแปลงจากไตรกลีเซอไรด์เป็นไดกลีเซอไรด์เป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยา (Rate limiting step)

จากการหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทต่างๆ กัน โดยจัดรูป Differentiated from

$$v_o = \frac{[TG]_1 - [TG]_0}{t_1 - t_0} \qquad (25)$$

จากนั้น หาอัตราเร็วของปฏิกิริยา โดยทำการทดลองโดยออกแบบการทดลองทั้งหมด 9 การทดลอง โดยกำหนดให้มีค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ [TG] คงที่ และแปรความเข้มข้นของเอทานอล [EtOH] 3 ค่า ตามภาคผนวก ข จากนั้นจะทำการแปรค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์อีก 2 ค่าเพื่อ ที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์และเอทานอลต่าง ๆ ดังตาราง 14

ตาราง 14 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่อใช้ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ [TG] คงที่และแปรความเข้มข้นของสับสเตรทเอทานอล [EtOH]

ค่าความเข้มข้นของซับสเตรท		v_o (mM/min.)	$1/v_o$ (min./mM)
[TG] = 4 mM	[EtOH] = 4 mM	0.008	128.98
	[EtOH] = 6 mM	0.011	100.20
	[EtOH] = 8 mM	0.012	83.00
[TG] = 6 mM	[EtOH] = 4 mM	0.010	98.56
	[EtOH] = 6 mM	0.013	77.90
	[EtOH] = 8 mM	0.015	67.20
[TG] = 8 mM	[EtOH] = 4 mM	0.012	81.00
	[EtOH] = 6 mM	0.015	67.30
	[EtOH] = 8 mM	0.017	57.90

จลนศาสตร์การผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น จะเห็นได้ว่าสารตั้งต้น 2 ชนิดคือ ไตรกลีเซอไรด์และเอทานอล ดังนั้นการศึกษา ปฏิกิริยานี้มีสับสเตรท 2 ตัว (Kinetics of two substrates) จึงใช้แบบจำลอง Ping-pong Bi Bi มาช่วยในการอธิบายกลไกปฏิกิริยาการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้สามารถเขียนแผนผังของปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทสองตัวที่เกิดขึ้นได้ดังนี้

$$E+A \rightleftharpoons EA \qquad K_m^A=\frac{[E][A]}{[EA]} \tag{26}$$

$$E+B \rightleftharpoons EB \qquad K_m^B=\frac{[E][B]}{[EB]} \tag{27}$$

$$EA+B \rightleftharpoons EAB \qquad K_s^B=\frac{[EA][B]}{[EAB]} \tag{28}$$

$$EA+B \rightleftharpoons EAB \qquad K_s^A=\frac{[EB][A]}{[EAB]} \tag{29}$$

$$EAB \xrightarrow{K} E+P \qquad V=k[EAB] \tag{30}$$

จาก $v_0=k[EAB]$ (31)

เมื่อ $[E_t]=[E]+[EA]+[EB]+[EAB]$ (32)

จากนั้น นำสมการที่(32) หารด้วยสมการที่ (31) จะได้

$$\frac{v_0}{[E_t]}=\frac{k[EAB]}{[E]+[EA]+[EB]+[EAB]} \tag{33}$$

จากกลไกปฏิกิริยาในสมการที่ (28) จะได้

$$[EA]=\frac{[B][EAB]}{K_S^B} \tag{34}$$

จากกลไกปฏิกิริยาในสมการที่ (29) จะได้

$$[EB]=\frac{[A][EAB]}{K_S^A} \tag{35}$$

จากนั้นนำกลไกปฏิกิริยาในสมการที่ (28) และ (29) แทนลงในสมการที่ (32) จะได้

$$V_0 = \frac{V_{max}[A][B]}{K_s^A K_m^B + K_m^B[A] + K_m^A[B] + [A][B]} \quad (36)$$

โดยที่ V_{max} คือ อัตราเร็วเริ่มต้นสูงสุดเมื่อทั้ง A และ B มีค่าสูงมากโดยที่อยู่ในระดับอิ่มตัว

K_m^A คือ ความเข้มข้นของ A ที่ทำให้ $V_0 = v_{max}/2$ เมื่อความเข้มข้นของ B อิ่มตัว

K_m^B คือ ความเข้มข้นของ B ที่ทำให้ $V_0 = v_{max}/2$ เมื่อความเข้มข้นของ A อิ่มตัว

K_S^A คือ ค่าคงที่ของการแตกตัวของ A จาก EA

ส่วนค่า K_m^B ไม่มีในสมการที่ (35) เนื่องจากสับสเตรท B ไม่จับกับเอนไซม์

ดังนั้น ปฏิกิริยาแบบ Ping – pong Bi Bi จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาการแตกตัวของผลิตผลออกจากเอนไซม์ในขณะเริ่มเกิดปฏิกิริยา นั้นจะไม่เกิดการทวนกลับของปฏิกิริยาเนื่องจากมีความเข้มข้นของผลิตผลน้อยมากจนตัดทิ้งได้ ทำให้ค่า $K_S^A = 0$ ทำให้เทอมของ $K_S^A K_m^B = 0$

กำหนดให้ [A] คือความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์และ [B] คือความเข้มข้นของเอทานอล ซึ่งจะได้สมการอัตราเร็วของปฏิกิริยา เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของไตรกลีเซอไรด์กับเวลาที่เปลี่ยนแปลง โดยสมการของอัตราเร็วเริ่มต้นแสดงได้ดังนี้

$$v_0 = \frac{V_{max}[TG][EtOH]}{K_m^{TG}[EtOH] + K_m^{EtOH}[TG] + [TG][EtOH]} \quad (37)$$

จัดรูปสมการของอัตราเร็วเริ่มต้นใหม่

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m^{TG}[EtOH]}{V_{max}[TG][EtOH]} + \frac{K_m^{EtOH}[TG]}{V_{max}[TG][EtOH]} + \frac{[TG][EtOH]}{V_{max}[TG][EtOH]} \quad (38)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m^{TG}}{V_{max}[TG]} + \frac{K_m^{EtOH}}{V_{max}[EtOH]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (39)$$

และให้ [TG] แปรไปในขณะที่ [EtOH] คงที่โดยให้ค่าความเข้มข้นนี้มีค่าประมาณ $K_{M[EtOH]}^B$ จะเขียนสมการได้ใหม่เป็น

$$v = \frac{V_{max}[TG]}{k_{mTG}^A + [TG]\left(\frac{k_{mEtOH}^B}{k_{mEtOH}} + 1\right)} \quad (40)$$

และเมื่อทำให้อยู่ในรูปของสมการเส้นตรงของไลน์วีเวอร์-เบอร์ค เขียนกราฟของไลน์วีเวอร์-เบอร์ค โดยทำการสร้างกราฟระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[TG]}$ ดังสมการ

$$\frac{1}{v} = \frac{k^{A}_{mTG}}{V_{max}}\left(\frac{1}{[TG]}\right)+\left(1+\frac{k^{B}_{mEtOH}}{[B_0]}\right)\left(\frac{1}{V_{max}}\right) \qquad (41)$$

การหาค่าคงที่ของอัตราเร็วทำได้โดยการตั้งสมมุติฐานดังต่อไปนี้

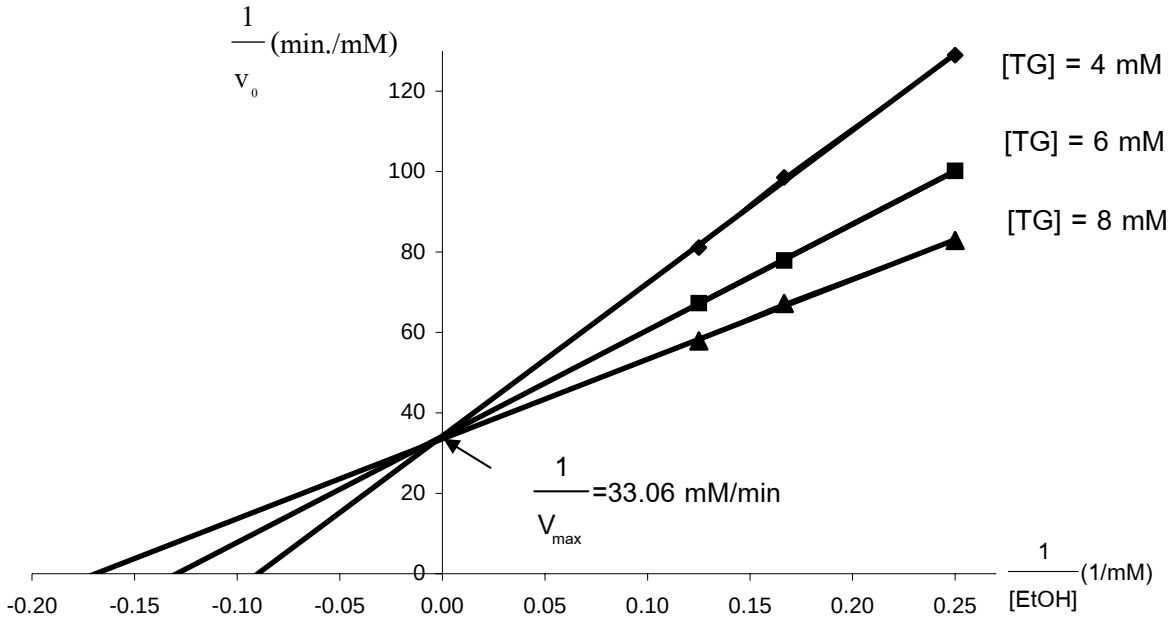
1) กำหนดให้ $[TG] >> K^{TG}_{m}$ ทำให้ $\frac{K^{TG}_{m}}{V_{max}[TG]}$ เข้าใกล้ 0 เมื่อเทียบกับเทอมอื่นฉะนั้น v_0 ที่ได้จะเป็น V_{max} ของไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอทานอลเพียงค่าเดียวจากสมการ (37)

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K^{TG}_{m}}{V_{max}[TG]}+\frac{K^{EtOH}_{m}}{V_{max}[EtOH]}+\frac{1}{V_{max}} \qquad (42)$$

เมื่อ $\frac{K^{TG}_{m}}{V_{max}[TG]}$ เข้าใกล้ 0 จะได้

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K^{EtOH}_{m}}{V_{max}[EtOH]}+\frac{1}{V_{max}} \qquad (43)$$

หรือจะเห็นว่าเมื่อ [TG] มีค่าสูงมากในระดับที่อิ่มตัว ขณะที่ [EtOH] มีค่าปานกลาง จะทำให้เทอมที่มีค่า [TG] จากสมการ (40) มีค่าน้อยจนสามารถตัดทิ้งได้ จะได้สมการ (43)



ภาพประกอบ 27 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[EtOH]}$ ในรูปแบบของไลน์วีเวอร์-เบอร์คของปฏิกิริยาเมื่อค่าความเข้มข้นของเอทานอลคงที่ใน 3 การทดลอง

พบว่า จุดตัดบนแกน $\frac{1}{v_0}$ ที่จุดเดียวกันมีค่าเท่ากับ 33.06 นาทีต่อมิลลิโมล เพราะฉะนั้น v_{max} มีค่าเท่ากับ 0.0301 มิลลิโมลต่อนาที (ภาพ 27)

จากสมการไลน์วีเวอร์-เบอร์ค $\frac{1}{v_0}=\frac{K_M^{EtOH}}{v_{max}}$ เพราะฉะนั้น $K_M^{EtOH}=\frac{1}{v_0}v_{max}$ เนื่องจากความชันของทั้ง 3 การทดลองมีค่าไม่เท่ากัน แสดงว่าค่า K_M^{EtOH} ขึ้นกับความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ และจะให้ค่า K_M^{EtOH} ที่แตกต่างกัน ดังตาราง 15 ที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ต่างๆ

ตาราง 15 ค่า K_m^{EtOH} ที่ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ต่าง ๆ กัน

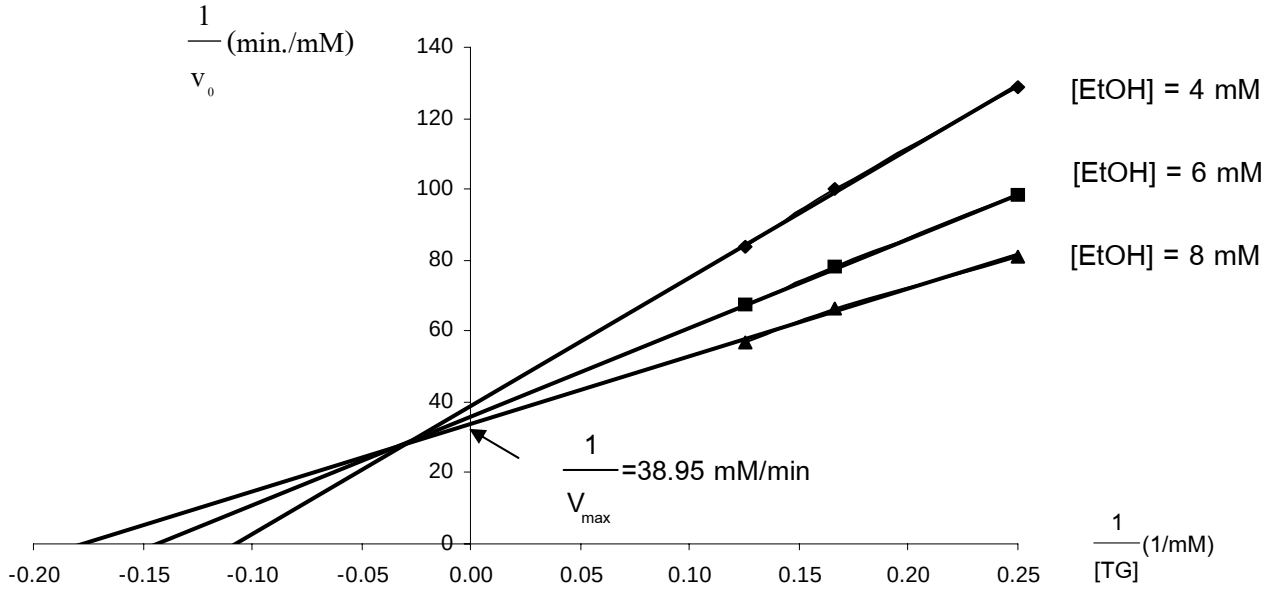
ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์(mM)	k_M^{EtOH} (mM)
4 mM	11.50
6 mM	7.96
8 mM	6.01

2) กำหนดให้ [EtOH] $>> K_m^{EtOH}$ ทำให้ $\frac{K_m^{EtOH}}{V_{max}[EtOH]}$ เข้าใกล้ 0 เมื่อเทียบกับเทอมอื่น ฉะนั้น v_0 ที่ได้จะเป็น V_{max} ของเอทานอล ดังนั้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์เพียงค่าเดียวเท่านั้นจากสมการ (31)

$$\frac{1}{v_0} = \frac{k_m^{TG}}{v_{max}[TG]} + \frac{k_m^{EtOH}}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max}} \qquad (44)$$

เมื่อ $\frac{K_m^{EtOH}}{V_{max}[EtOH]}$ เข้าใกล้ 0 จะได้

$$\frac{1}{v_0} = \frac{k_m^{TG}}{v_{max}[TG]} + \frac{1}{v_{max}} \qquad (45)$$



ภาพประกอบ 28 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[TG]}$ ในรูปแบบของไลน์วีเวอร์-เบอร์คของปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ที่มีกลไกแบบ Ping-pong Bi Bi เมื่อค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์คงที่ใน 3 ชุดการทดลอง

พบว่า ที่ค่าความเข้มข้นของเอทานอลต่าง ๆ ทั้ง 3 ชุดการทดลอง จะได้จุดแกน $\frac{1}{v_0}$ ไม่เท่ากัน ทำให้ค่าที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{v_0}$ กับ $\frac{1}{[TG]}$ จะทำให้สมมุติฐานที่ตั้งไว้ไม่เป็นจริง จะเห็นว่า ค่า V_{max} ของความเข้มข้นเอทานอลทั้ง 3 มีค่าไม่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นของเอทานอลยังมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา จึงเลือกกราฟที่ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดมาคำนวณหาค่า V_{max} เท่ากับ 0.0256 มิลลิโมลต่อนาที ซึ่งพบว่ามีค่าต่ำกว่า V_{max} ในกรณีแรกที่มีค่าเท่ากับ 0.0301 มิลลิโมลต่อนาที เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ค่า V_{max} ของปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 0.0301 มิลลิโมลต่อนาที

เมื่อทำการหาค่า K_m^{TG} โดยใช้ข้อมูลจากการทดลองทั้ง 9 การทดลองและค่า K_m^{EtOH} จากตาราง 16 มาแทนค่าลงในสมการที่ 36 จะได้ผลการคำนวณดังตาราง 16 แสดง K_m^{TG} ของปฏิกิริยาที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์และเอทานอลต่าง ๆ

ตาราง 16 K_m^{TG} ของปฏิกิริยาที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์และเอทานอลต่าง ๆ

[TG](mM)	4			6			8		
[EtOH](mM)	4	6	8	4	6	8	4	6	8
v_o(mM/min.)	0.008	0.011	0.012	0.01	0.013	0.015	0.012	0.015	0.017
V_{max}(mM/min.)	0.030								
$k_m^{EtOH}[TG]$	45.991	45.991	45.991	47.752	47.752	47.752	48.072	48.072	48.072
$\left\|k_m^{TG}\right\|$(mM)	0.444	0.375	0.294	0.322	0.285	0.145	0.485	0.175	0.123

จากตาราง 16 เมื่อนำค่า K_m^{TG} ของแต่ละชุดการทดลองมาทำการหาค่าเฉลี่ยพบว่า K_m^{TG} ของปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 0.294 มิลลิโมล

จากนั้นทำการหาค่า K_m^{EtOH} ของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้ค่า K_m^{TG} ของปฏิกิริยาซึ่งเท่ากับ 0.294 มิลลิโมล มาใช้ในการคำนวณหา K_m^{EtOH} ได้ผลการคำนวณแสดงดังตาราง 17

ตาราง 17 K_m^{EtOH} ของปฏิกิริยาที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์และเอทานอลต่าง ๆ

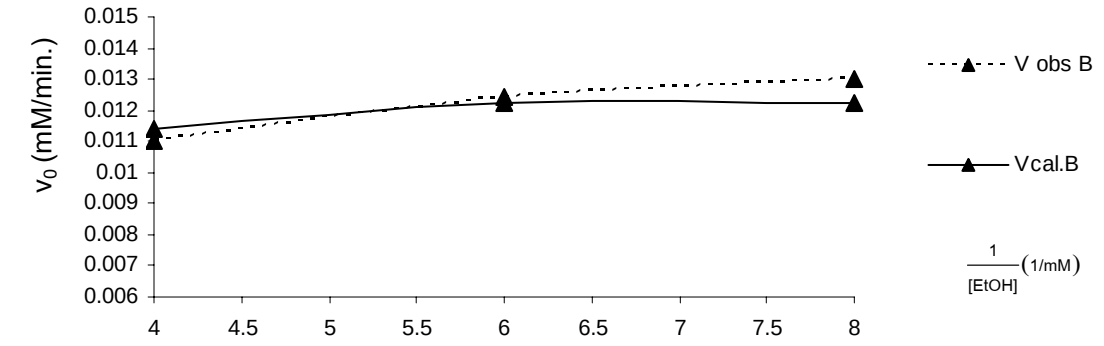
[TG](mM)	4			6			8		
[EtOH](mM)	4	6	8	4	6	8	4	6	8
v_o(mM/min.)	0.008	0.011	0.012	0.01	0.013	0.015	0.012	0.015	0.017
V_{max}(mM/min.)					0.030				
k_m^{TG}[EtOH]	1.177	1.177	1.177	1.765	1.765	1.765	2.354	2.354	2.354
$\left\|k_m^{EtOH}\right\|$(mM)	10.765	11.632	11.485	9.564	9.253	9.012	7.756	7.523	7.012

จากตาราง 17 เมื่อนำค่า K_m^{EtOH} ของแต่ละชุดการทดลองมาทำการหาค่าเฉลี่ยจะได้ K_m^{EtOH} ของปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 9.335 มิลลิโมล ตาราง 18 แสดงค่าคงที่ต่าง ๆ ของปฏิกิริยาของการผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

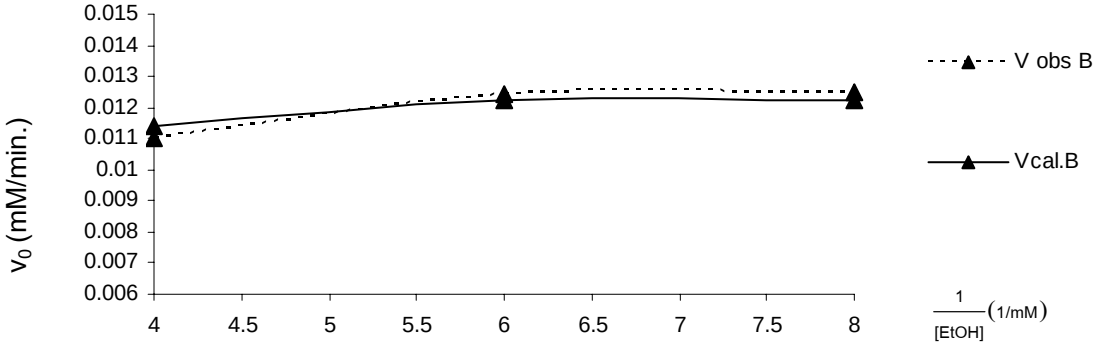
ตาราง 18 ค่าคงที่ต่าง ๆ ของปฏิกิริยาของการผลิตเอทิลเอสเทอร์ที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ค่าคงที่ของปฏิกิริยา	
อัตราเร็วเริ่มต้นสูงสุดของปฏิกิริยา (v_{max})	0.030 มิลลิโมลต่อนาที
ค่าคงที่ของเอทานอล (K_m^{EtOH})	9.335 มิลลิโมล
ค่าคงที่ของไตรกลีเซอไรด์ (K_m^{TG})	0.294 มิลลิโมล

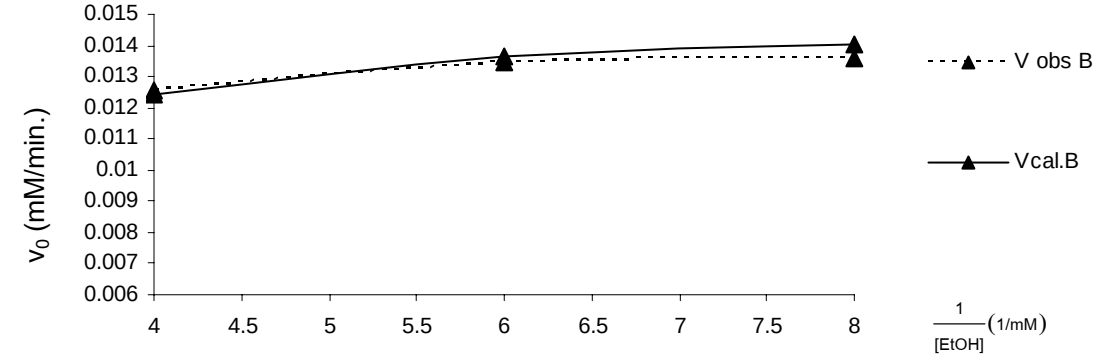
จากนั้นนำค่าคงที่ของปฏิกิริยาจากตาราง 18 ที่ได้มาแทนลงในสมการ (37) เพื่อทำการเปรียบเทียบอัตราเร็วเริ่มต้นจากการทดลองจริง (V_{obs}) กับอัตราเร็วเริ่มต้นที่ได้จากการคำนวณ(V_{cal}) พบว่าทั้งสองค่ามีค่าใกล้เคียงกัน (ภาพ 27) แสดงให้เห็นว่าเราสามารถใช้แบบPing -pong Bi Bi มาอธิบายการเกิดปฏิกิริยานี้ได้และการใช้สารตั้งต้นที่เป็นเอทาทานอลในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองจะไม่เกิดการยับยั้งปฏิกิริยา จึงกล่าวได้ว่าเอทานอลเป็นสารตั้งต้นที่ดีกว่ากรดบิวทิริก (Kamini,N.R.; & Lefuji. 2001: 405-410)



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพประกอบ 29 การเปรียบเทียบอัตราเร็วเริ่มต้นจากการทดลองจริงกับอัตราเร็วเริ่มต้นที่ได้จากการคำนวณที่ค่าความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ที่แตกต่างกัน (ก) [TG] = 4 mM (ข) [TG] = 6 mM และ (ค) [TG] = 8 mM

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า

ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพื่อทำการย่อยไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันชนิดต่างๆ ให้เป็นกรดไขมัน มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซลชนิดอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน การใช้เอนไซม์ในลักษณะต่างกันส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้แตกต่างกันออกไป พบว่า เอนไซม์อิสระมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์ตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสในน้ำล้างจากการตรึงรูป 3-4 เท่า และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส คือ ความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาทีเนื่องจากอัตราเร็วที่ใช้ในการเขย่ามีผลต่อการกระจายตัวและการถ่ายเทมวลสาร(Mass transfer) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยที่ในช่วงการเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการเพิ่มสูง เรียกช่วงนี้ว่า Temperature Activation สอดคล้องตาม Arrhenius Equation แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นอีก ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะค่อยๆ ลดลง เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง จะเริ่มสูญเสียสภาพธรรมชาติเมื่อถูกความร้อน (Thermal denaturation) ทำให้อัตราของปฏิกิริยาลดลง

การสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินและเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำการศึกษาปัจจัยหลักที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันทั้งหมด 5 ปัจจัยคือ สัดส่วนโดยโมลระหว่างปาล์มโอลิอินและ เอทานอล, อุณหภูมิ, ความเร็วรอบการเขย่า, pH ในการตรึงรูปเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา จากการศึกษาพบว่าองค์ประกอบหลักของเอทิลเอสเทอร์ คือเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอท และปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักเอทิลเอสเทอร์ สูงสุดที่ผลิตได้คือ 20.43 ที่สภาวะดังนี้: สัดส่วนโดยโมลที่ 1 ต่อ 3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และ pH ในการตรึงรูป 7.5 ที่เวลาประมาณ 27 ชั่วโมง

ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลจะประกอบด้วยสารตั้งต้น 2 ชนิดคือ เอทานอลและไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้นต้องอาศัยแบบจำลอง Ping-pong Bi Bi อธิบายการเกิดปฏิกิริยา ทำการศึกษาโดยให้ความเข้มข้นของสับสเตรทตัวหนึ่งคือ ไตรกลีเซอไรด์มีค่าความเข้มข้นคงที่แล้วแปรความเข้มข้นของสับสเตรทตัวที่สองคือเอทานอลโดยให้ขั้นการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาจากไตรกลีเซอไรด์เป็นไดกลีเซอไรด์เป็นขั้นกำหนดปฏิกิริยา พบว่าอัตราเริ่มต้นสูงสุดของปฏิกิริยา (v_{max}) เท่ากับ 0.030 มิลลิโมลต่อนาที ค่าคงที่ของเอทานอล (k_m^{EtOH}) เท่ากับ 9.335 มิลลิโมล และค่าคงที่ของไตรกลีเซอไรด์(k_m^{TG})เท่ากับ 0.294 มิลลิโมล

ข้อเสนอแนะ

1. จากปริญญานิพนธ์นี้ เป็นงานวิจัยทางวิศวกรรมศาสตร์ในระดับห้องปฏิบัติการโดยมีลักษณะการทดลองแบบกะ (Batch process) มีขั้นตอนการทำงานที่ยุ่งยากและพบว่าให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์มีค่าต่ำ ซึ่งถ้านำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมนั้นทำให้การสิ้นเปลือง ควรจะนำข้อมูลมาพัฒนาให้สามารถทำปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง (Continous process) ซึ่งอาจจะทำให้ลดการสิ้นเปลือง และอาจจะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์สูงขึ้น

2. ปัจจุบันนี้ พบว่าราคาน้ำมันดีเซลมีราคาต่ำลง แต่ราคาของน้ำมันปาล์มมีราคาสูงและมีความต้องการของตลาดสูงขึ้นจึงไม่มีความคุ้มค่าทางด้านเศรษฐศาสตร์ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้น้ำมันที่มีราคาต่ำกว่า เช่น น้ำมันพืชที่ผ่านการใช้งานแล้ว

3. จากการทดลองสามารถนำข้อมูลมาสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะต่างๆ เพื่อทำนายปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักเอทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้และสะดวกในการนำไปใช้ในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จักรพงศ์ ไชยบุรี. (2546). จลนศาสตร์ของการสังเคราะห์น้ำมันดีเซลชีวภาพจากน้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย. วิทยานิพนธ์ วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. ถ่ายเอกสาร.

จตุพร วิทยาคุณ; และนุรักษ์ กฤษดานุรักษ์. (2547). *การเร่งปฏิกิริยาพื้นฐานและการประยุกต์.* กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

จตุพร ศรีบัณฑิตมงคล; บุศรา คุณาจิตพิมล; และปกิต เพชรแดง. (2547). *การตรึงตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล*. โครงงานวิศวกรรมเคมี. มหาวิทาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ไตรทศ วงษาภักดี. (2545). *การทดสอบการติดของกัมเมื่อใช้น้ำมันไบโอดีเซลที่ได้จากปาล์มสเตอรินผสมน้ำมันดีเซล*. รายงานการวิจัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2543). *เอนไซม์ทางอาหาร.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรา วีระกะภัส. (2541). *เอนไซม์.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล. (2544). ไบโอดีเซล พลังงานทางเลือก. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 16(3): 5-7

ภาวิณี คณาสวัสดิ์; และด้วง พุธศุกร์. (2540). การสังเคราะห์เมทิลและเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยวิธีทางเคมีและทางเอนไซม์. เชียงใหม่: โครงการวิจัยทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รำไพ สิริมนกุล. (2543). *เคมีอินทรีย์เบื้องต้น.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

เสาวนีย์ เหมทานนท์. (2541). การใช้ไลเพสจาก *Candida cylindracea* เร่งปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสของน้ำมันหมูเพื่อผลิตโมโนกลีเซอไรด์. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

อภิชาต สุขสำราญ. (2545). *เคมีอินทรีย์ขั้นสูง.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

Chaplin, M.F.; & Bucke, C. (1999). *Enzyme Technology.* Cambridge: Cambridge University Press.

Charles, L.S.; & Dharam, V.V. (1966). Instrumental Assay of Microbial Lipase at Constant pH. *Applied Microbiol.* 15(1):110–113.

Chen, Jech Wi.; & Wen, Teng Wu. (2003). Regeneration of Immobilized *Candida Antarctica* Lipase for Transesterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 95(5): 466-469.

Darmoko, D.H; & Cheryan, M.T. (2000). Kinetics of Palm Oil Transesterification in a Batch Reactor. *JAOCS.* 77: 1263–1267.

Dossat, V.F; & Combes. D. (2002). Lipase – catalyzed Transesterification of high oleic sunflower oil. *Journal Enzyme microbial Technology.* 30: 90-94.

El Rassy. H; Alain. P; & Alain C.Pierre. (2004). Application of lipase encapsulated in Silica aerogel to a tranesterification reaction in hydrophobic Solvent :Bi Bi Ping-pong kinetics. *Journal of Molecular Catalysis : Enzymatic.* (30): 137-150.

Encinar, J.M.; Gonzalez, J.F.; & Rodrigvez, J.J., (2002). Tejedor. A Biodiesel Fuels from Vegetable Oils : Transesterification of *Cynara carcluncules L*. Oil with Ethanol. Energy & Fuels. 16: 443–450.

Frederique R. A; Melquizedeque B. A; Caio C.S. M; Luiz F. Z; & Paulo A.Z. (2005). New multi-phase catalytic systems based on tin compounds active for vegetable oil transesterificaton reaction. *Journal of Molecular Catalysis.* 227: 263–267.

Garcia T.Y; Piyush S.L. Garcia, T.; Coteron, A.; Martinez, M. ; & Aracil, J. (2006). Kinetic modelling of esterification reactions catalysed by immobilized lipases. *Chemical Engineering Science.* 51: 2841-2846.

Gonzalez,J.M; & Rodrigvez. T. (2002). A Biodiesel Fuels from Vegetable Oils : Transesterification of *Cynara carcluncules L*. Oil with Ethanol. Energy & Fuels 16: 443–450.

Kaieda. M; Taichi. S; Akihiko. K; & Hideki. F. (2001). Effect of Methanol and Water Contents on Production of Biodiesel Fuel from Plant Oil Catalyzed by Various Lipases in a Free System. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 91(1): 12-15.

Kamini,N.R., Lefuji H. (2001). Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by Cryptococcus spp. *S-2 Process Biochemistry.* 37: 405-410.

Korbitz, W. (1990). Dependence of Biodiesel Fuel Properties on the Structure of Fatty Acid Alkyl Esters. *Fuel Processing Technology.* 86: 1039–1070.

Lang, X.; Dalai, Bakhashi A.K.; Reaney, M.J.; & Hertz, P.B. (2001). Preparation and Characterization of Biodiesel from Various Biodiesel. *Bioresource Technology.* 80: 456-459.

Linko, L.M.; Wu,X., & Uosukainen,W. (1998). Biodegradable products by lipase. Biocatalysis. *Journal. Biotechnology.* 66:41-50.

Malcata, Knezevic Zorica, Aleksandra. (1990). Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oil : a Review. *JAOCS.* 67(2): 890-910.

Ma, F, Hanna, M.A. (1999). Biodiesel Production : a Review. *Bioresource Technology.* 70:1–15.

Noureddini, H.; Gao, X.; & Philkana, R.S. (2005). Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Soybean Oil. *Bioresource Technology.* 96: 769–777.

Smith, K. W. (2001). *Crystallization of Palm Oil and Its Fraction.* pp. 357-361.

Selmi Sei.B; & Thomas, D. (1998). Immobilized lipase-catalyed ethanolysis of sunflower in solvent-free medium oils. *Journal of Fuel.* 66:1372-1378.

Shieh C.J.;Liao H. F; Lee C.C. (2003). Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology.* 88: 103–106.

Shimada. Y; Yomi. W; Akio. S; & Yoshio. T. (1999). Enzymatic Alcoholysis for Biodiesel Fuel Producion and Application of the Reaction to Oil Processing. *Journal. of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 17: 133-142

----------. (2002). Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 17: 151–155.

Sylvie Maury; Paulette Buisson; Alain Perrard; & Alain C. Pierre, (2005). Compared esterification kinetics of the lipase from *Burkholderia cepacia* either free or encapsulated in a silica aerogel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 32:193–203.

Taichi, S.; M. Kaieda; T. Matsumoto; K. Ban; & A. Kondo. (2000). Pretreatment of Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Plant Oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 90(2) : 180-183.

Tashtoush, G.M., Al-Widyan, M.J., A.J. Jarrah, M.M. (2004). Experimental Study on Evaluation and Optimization of Conversion of Waste Animal Fat into Biodiesel. *Energy Conversion and Management.* 45: 2697–2711.

Torres Carlos; Louis P; Lessard; & Charles G. Hill. (2005). Lipase-mediated transesterification of menhaden oil with the ethyl ester of conjugated linoleic acid: multi-response kinetics. *Biochemical Engineering Journal.* 23:107–116.

Widyan Mohamad; & Ali O. Al Shyoukh. (2002). Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresource Technology.* 85: 253–256.

Wu,W.H.; Foglia H.; &T.A.Marmer. (1999). Optimizing production of ethyl esters of grease using 95%ethanol by response surface methodology *JAOCS.* 76:517-521

Yuanyuan Xu; & Wei Du. (2005). Study on the Kinetics of Enzymatic Interesterification of Triglycerides for Biodiesel Production with Methyl Acetate as the Acyl acceptor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 32: 241-245

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การหาน้ำหนักมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์มโอลิอิน

1. การหาน้ำหนักมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์มโอลิอิน

ตารางผนวกที่ ก1 ส่วนประกอบกรดไขมันและปริมาณที่มีอยู่จริงในน้ำมันปาล์มโอลิอิน

ส่วนประกอบกรดไขมัน	มวลโมเลกุล	ร้อยละ กรดไขมัน	ปริมาณที่มีอยู่จริง
กรดไขมันอิ่มตัว:			
กรดลอริก	638	0.2	1.27
กรดไมริสติก	722	0.5	3.61
กรดปาล์มิติก	806	42.7	344.16
กรดสเตียริก	890	2.3	20.47
กรดอะราคิดิก	974	0.2	1.95
กรดไขมันไม่อิ่มตัว:			
กรดโอลีอิก	884	44.9	396.91
กรดไลโนลีอิก	878	8.6	75.50
กรดไลโนลีนิก	872	0.3	2.616
อื่น ๆ		0.3	
น้ำหนักมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์มโอลิอินเท่ากับ 840.50 กรัมต่อโมล			

ภาคผนวก ข
การหาปริมาณของเอทิลเอสเทอร์และการหาอัตราเร็วเริ่มต้น

1. การหาชนิดของเอทิลเอสเทอร์

เอทิลเอสเทอร์แต่ละชนิดจะมี Retention time ไม่เท่ากัน เอทิลเอสเทอร์ชนิดเดียวกันจะมี retention time ที่เท่ากันเสมอ จึงใช้หลักการนี้ในการพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้เป็นเอทิลเอสเทอร์ชนิดใด โดยเทียบกับเอทิลเอสเทอร์มาตรฐาน ซึ่งในการทดลองนี้เอทิลเอสเทอร์ที่ศึกษาคือ เอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอท เนื่องจากองค์ประกอบกรดไขมันส่วนใหญ่ในน้ำมันปาล์มโอลิอินอยู่ในรูปของกรดโอลิอิกและกรดปาล์มิติก

2. การวิเคราะห์หาปริมาณเอทิลเอสเทอร์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโตรกราฟี

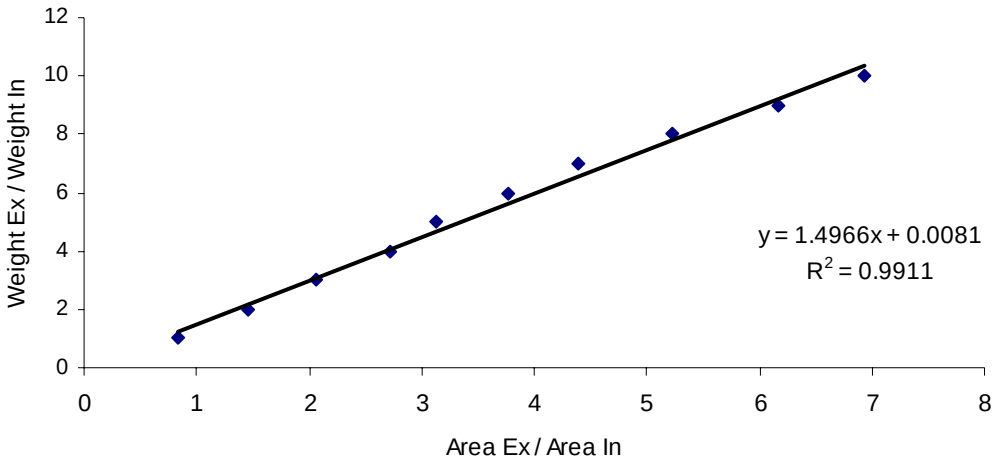
ชั่งสารตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม เติมสารมาตรฐานอ้างอิง 1.14 M เมทิลเพนตะดิคาโนเอต 50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนได้ปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี VARIAN รุ่น CP 3800 ดีเทคเตอร์เป็นแบบ Flame Ionization Detector (FID) คอลัมน์ Capillary column รุ่น DB-5 ของ J&W Co.,Ltd. กำหนดอุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียส ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซพา อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิช่องฉีดสาร (Injector) 275 องศาเซลเซียส ที่ภาวะอุณหภูมิกำหนด 3 ขั้นตอน คือ ที่ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 2 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 270 องศาเซลเซียสคงที่นาน 5 นาที

ร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นเป็นการบอกถึงปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันว่าเกิดขึ้นมากหรือน้อย ถ้าเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมากจะส่งผลให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเอทิลเอสเทอร์มาก การหาปริมาณเอทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นจริง สามารถคำนวณได้จากโครมาโตแกรมของแก๊สโครมาโตกราฟี โดยการนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอลิเอท ซึ่งมีสารอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดเป็นตัวยืนยัน ดังตารางภาคผนวกที่ ข1 และ ข2 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลปาล์มิเตท และสารมาตรฐาน เอทิลโอลิเอท ตามลำดับภาพผนวกที่ ข1 และ ข2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลปาล์มิเตท และสารมาตรฐานเอทิลโอลิเอท ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ ข1 ข้อมูลที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลปาล์มิเตท

Area $_{Ex}$ / Area $_{In}$				Weight $_{Ex}$ / Weight $_{In}$
X_1	X_2	X_3	$\overline{X}$	
0.736	0.879	0.899	0.837	1
1.378	1.833	1.769	1.461	2
2.092	1.990	2.090	2.053	3
2.761	2.932	2.769	2.710	4
2.863	2.948	3.282	3.139	5
3.684	3.710	3.802	3.775	6
4.353	4.600	3.996	4.395	7
4.706	5.260	5.710	5.253	8
6.006	6.262	6.540	6.163	9
7.519	5.831	7.431	6.970	10

กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลปาล์มิเตท

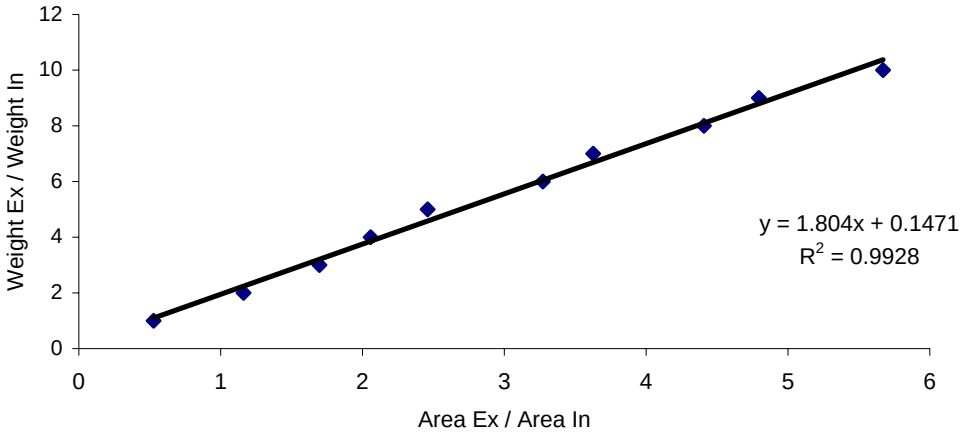


ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลปาล์มิเตท

ตารางผนวกที่ ข2 ข้อมูลที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลโอลิเอท

Area $_{Ex}$ / Area $_{In}$				Weight $_{Ex}$ / Weight $_{In}$
X_1	X_2	X_3	$\overline{X}$	
0.596	0.753	0.233	0.527	1
1.173	1.175	1.165	1.161	2
1.676	1.623	1.818	1.696	3
1.873	2.365	1.937	2.058	4
1.936	3.007	2.478	2.459	5
2.297	3.834	3.684	3.272	6
3.544	3.682	3.653	3.626	7
4.465	3.930	4.830	4.408	8
4.863	4.699	4.823	4.795	9
4.986	5.976	6.064	5.670	10

กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลโอลิเอท



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเอทิลโอลิเอท

3. การหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยใช้เอน ไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

จากการศึกษาอัตราเร็วเริ่มต้น จะทำการศึกษาปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับเวลา จึงใช้หลักการนี้ในการพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟที่ได้เป็นไตรกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ โดยเทียบกับสารมาตรฐานไตรเคปริน ซึ่งในการทดลองนี้คือ

1 – Monooleoylglycerol (Monoolein) เป็นสารมาตรฐานโมโนกลีเซอไรด์

1, 3 – Dioleoylglycerol (Diolein) เป็นสารมาตรฐานไดกลีเซอไรด์

1,2,3 – Tricaproylglycerol (Triolein) เป็นสารมาตรฐานไตรกลีเซอไรด์

ดังตัวอย่างของการอัตราเร็วเริ่มต้น โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ 4 mM และความเข้มข้นของเอทานอล 4 mM เช่นเดียวกันพบว่ามีการเปลี่ยนดังตารางผนวกที่ ข3

ตารางผนวกที่ ข3 ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปเทียบกับเวลาต่างๆ

เวลาในการปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์(mM)
0	4.005
4	2.094
8	1.503
12	1.089

ดังนั้น อัตราเร็วเริ่มต้นเท่ากับ

$$v_o = \frac{[TG]_1 - [TG]_0}{t_1 - t_0} \qquad (47)$$

อธิธานศัพท์

คำย่อ	ความหมาย
P	ปาล์มมิติก
O	โอลิอิก
St	สเตียริก
L	ไลโนลิอิก
S	กรดไขมันอิ่มตัว
TG	ไตรกลีเซอไรด์
DG	ไดกลีเซอไรด์
MG	โมโนกลีเซอไรด์
TAG	ไตรเอซิลกลีเซอรอล
FAEE	เอทิลเอสเทอร์
EtOH	เอทานอล
GL	กลีเซอรอล
E	เอนไซม์
S	สับสเตรท
ES	เอนไซม์-สับเตรทเชิงซ้อน
e_0	ความเข้มข้นทั้งหมดของเอนไซม์
e	ความเข้มข้นของเอนไซม์
C	เอนไซม์-สับสเตรทคอมเพล็กซ์
K_m	ค่าคงที่ของมิเคลิส
K_s^A	ค่าคงที่ของการแตกตัวของ A จาก EA
V_0	อัตราเร็วเริ่มต้น
V_{max}	อัตราเร็วเริ่มต้นสูงสุด

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม
วันเดือนปีเกิด	26 พฤษภาคม 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	1669/538 แขวงสีกัน เขตดอนเมือง กรุงเทพฯ โทร. 081-6497837
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	วิศวกรควบคุมคุณภาพ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท ไทยลามิเนต เมนูแฟคเจอเรอร์ จำกัด

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2541	มัธยมศึกษา จาก โรงเรียนเทพศิรินทร์
พ.ศ. 2547	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จาก สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลธัญญบุรี
พ.ศ. 2552	วิศวกรรมศาสวตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ