รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัด เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

(Development of high-efficiency lipase immobilization on economic efficiency carrier for biodiesel production)

หัวหน้าโครงการ

ดร. พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 176909

สัญญาเลขที่ 33/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัด เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

(Development of high-efficiency lipase immobilization on economic efficiency carrier for biodiesel production)

หัวหน้าโครงการ

ดร. พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 33/2558

Acknowledgement

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 33/2558).

หัวข้อโครงการวิจัย การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัดเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD 003 บนแร่-มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ พบว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 0.13 ± 0.08 ยูนิตต่อกรัม ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่เวอร์มิคูไลท์ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ จึงได้นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ไปศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) พบว่า สภาวะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีที่สุด คือ การใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล เท่ากับ 1:3 ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่-มอนท์มอริลโลไนท์ ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม) หรือใช้ Crude lipase ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นเมื่อนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ดำเนินภายใต้สภาวะที่เหมาะสมไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่ามีผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นทั้งในปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์และปฏิกิริยาที่ใช้ Crude lipase แต่ไม่สามารถระบุชนิดของเมทิลเอสเทอร์ได้

คำสำคัญ: การตรึงเอนไซม์ไลเปส, แร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์, ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน, ไบโอดีเซล, *Bacillus* spp.

Research project Development of high-efficiency lipase immobilization on economic efficiency carrier for biodiesel production

Research project leader Patcharanan Amornrattanapan, PHD

ABSTRACT

This research aimed to investigate the immobilization of *Bacillus* sp. BLCD 003-derived lipase on Montmorillonite and Vermiculite via physical adsorption method. Results revealed that Montmorillonite-immobilized lipase retained its activity of 0.13 ± 0.08 U/g whereas Vermiculite-immobilized lipase showed no activity. Therefore, Montmorillonite-immobilized lipase was selected for the study on the effects of different parameters on transesterification for biodiesel or methyl esters production. It was found that optimal conditions for lipase-catalyzed transesterification were 1:3 molar ratio of palm oil and methanol, 37°C for 24 hours using either Montmorillonite-immobilized lipase with concentration of 250% (relative to the weight of palm oil) or crude lipase with concentration of 50% as catalyst. Samples obtained from the optimal conditions were analyzed by HPLC method. The results revealed that methyl esters were produced in both transesterification reactions using Montmorillonite-immobilized lipase and crude lipase. Unfortunately, methyl esters could not be identified.

Keywords: Lipase immobilization, Montmorillonite, Vermiculite, Transesterification, Biodiesel, *Bacillus* spp.

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง..... ข

สารบัญรูปภาพ..... ค

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา..... 5

รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus* sp..... 5

รายละเอียดเกี่ยวกับไลเปส..... 5

รายละเอียดเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์..... 10

รายละเอียดเกี่ยวกับแร่ดินเหนียว..... 13

รายละเอียดเกี่ยวกับไบโอดีเซล..... 18

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา..... 29

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 35

วัสดุอุปกรณ์..... 35

วิธีการทดลอง..... 38

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 47

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 59

รายงานสรุปการเงิน..... 66

บรรณานุกรม..... 67

ภาคผนวก..... 75

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 75

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี..... 77

ภาคผนวก ค การเตรียมกราฟมาตรฐานของ 4-nitrophenol 79

ภาคผนวก ง รูปภาพที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง..... 81

ประวัตินักวิจัย..... 85

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับสารเคมีชนิดต่าง ๆ โดยใช้ Crude lipase และ ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา……...……..	50
2	ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา……..	51
3	ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ 1:3 โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา……...	52
4	ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:3 โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	53
5	ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา……	54
6	ปริมาตรของ 4-nitrophenol stock solution และน้ำที่ใช้สำหรับการเตรียม 4-nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ…….	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์……...…..	23
2	ภาพถ่าย SEM แสดงพื้นผิวของแร่มอนท์มอริลโลไนท์ (A) ก่อน และ (B) หลังการตรึงเอนไซม์ไลเปส (กำลังขยาย 7000X)……..……...……	48
3	ภาพถ่าย SEM แสดงพื้นผิวของแร่เวอร์มิคูไลท์ (A) ก่อน และ (B) หลังการตรึงเอนไซม์ไลเปส (กำลังขยาย 2500X)……..…….……..	49
4	ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี Thin layer chromatography…..……....	55
5	ค่า Retention factors ของสารที่มีในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี Thin layer chromatography ……..…….……..	56
6	โครมาโตแกรมของสารที่อยู่ในชุดทดสอบที่ใช้ Crude lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Test-Free lipase) เปรียบเทียบกับ F.A.M.E. mix (C8-C24) (STD และ **(A)** น้ำมันปาล์ม (PO) หรือ **(B)** ชุดควบคุมผลลบ (Control-Free lipase)…….…….....	57
7	โครมาโตแกรมของสารที่อยู่ในชุดทดสอบที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่-มอนท์มอริลโลไนท์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Test-Imm lipase) เปรียบเทียบกับ F.A.M.E. mix (C8-C24) (STD) และ **(A)** น้ำมันปาล์ม (PO) หรือ **(B)** ชุดควบคุมผลลบ (Control-IMM lipase)……..	58
8	กราฟมาตรฐานของ 4-nitrophenol ……..…….…….……..	80
9	ลักษณะโคโลนี A) รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยายรวมของภาพ 1000x) B) ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 ที่เจริญบน Trypticase soy agar หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส ……..……...	81
10	Crude lipase ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 ใน Production medium หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ..…….....	81
11	ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ ……...…	82
12	สารละลายผสมของส่วนใสชั้นบนที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและเอทานอลในอัตราส่วน 1:2 ก่อนและหลังการไตเตรท …….……..	83
13	ลักษณะของผงแร่มอนท์มอริโลไนท์	83
14	ลักษณะของแร่เวอร์มิคูไลท์	84

บทที่ 1
บทนำ

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่ผลิตได้จากธรรมชาติสามารถนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงประเภทดีเซลได้ ไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชั่น โดยนำไขมันมาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ และมีตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย สำหรับประเทศไทยมีการเพาะปลูกพืชน้ำมันอย่างน้อย 8 ชนิด เช่น ปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ละหุ่ง สบู่ดำ เป็นต้น ในบรรดาพืชดังกล่าวข้างต้นนั้นปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีราคาถูกที่สุด เมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) และมีศักยภาพมากที่สุดสำหรับการนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์ ในเดือนมกราคม-เดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำมันปาล์มดิบได้ 174,919 ตัน และมีความต้องการนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล 113,815 ตัน (กองส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร1, 2558; สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2557) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้น้ำมันปาล์มเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลในการศึกษานี้

โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลในภาคอุตสาหกรรมนิยมใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Sharma, Singha, & Upadhyay, 2008) แต่ในปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยากำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเปสจะไม่ก่อให้เกิดสบู่ มีกระบวนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน ใช้พลังงานในการผลิตต่ำ และสามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย (Pourzolfaghar, Abnisa, Daud, & Aroua, 2016) การเกิดปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอริฟิเคชันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายปัจจัย เช่น ปริมาณกรดไขมันอิสระ อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา อัตราส่วนระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เวลาในการทำปฏิกิริยา ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา และชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น (Canakci & Gerper, 1999; Leung & Guo, 2006; Pryde , Mounts, & Freedman, 1984; Tan, Lee, & Mohamed, 2010)

เอนไซม์ไลเปส (Lipase : EC 3.1.1.3) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายแบบ (Kabbashia, Mohammeda, Alama, & Mirghania, 2015) รวมไปถึงปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (López *et al.*, 2016) โดยจุลินทรีย์ถือเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีศักยภาพ มีคุณสมบัติที่หลากหลาย และมีเสถียรภาพ (Contesini *et al.*, 2010) แต่เนื่องจากไลเปสอิสระมีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลสูงไปด้วย การนำไลเปสมาตรึงรูปอาจเป็นวิธีที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ เนื่องจากการตรึงเอนไซม์จะทำให้มีความเสถียรมากขึ้น ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ (Rodriguesa, Perrierb, Lecomtec, Dubreucqb, & Ferreira-Dias, 2016)

การตรึงเอนไซม์ คือ การจำกัดขอบเขตของเอนไซม์ มีผลทำให้เอนไซม์เปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง การตรึงเอนไซม์แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆคือ การเชื่อมกับตัวพยุง การเชื่อมไขว้ และการห่อหุ้ม ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรึงเอนไซม์โดยใช้วิธีเชื่อมเอนไซม์เข้ากับตัวพยุงโดยอาศัยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน สามารถใช้กับเอนไซม์ได้ทุกชนิด วิธีนี้เป็นการดูดซับเอนไซม์ไว้บนผิวภายนอกของตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558) โดยอาศัยแรงวันเดอร์วาลส์ (Van der Waals) พันธะไอออนิก และพันธะไฮโดรเจน (Jesionowski, Zdarta, & Krajewska, 2014) ซึ่งเป็นแรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่อ่อน จึงไม่มีผลกระทบต่อโครงรูปสามมิติและกิจกรรมของเอนไซม์

โดยในการศึกษาครั้งนี้จะตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยใช้แร่มอนต์มอริลโลไนต์ (Montmoreillonite) และแร่เวอร์มิคิวไลต์ (Vermiculite) เป็นตัวพยุง เนื่องจากมีพื้นที่ผิวจำเพาะสูง มีชั้น Interlayer region และมีความสามารถสูงในการแลกเปลี่ยนประจุบวก จึงเหมาะสำหรับการดูดซับโมเลกุลเอนไซม์ด้วยแรงแบบต่างๆ (Nazir et al., 2016; Roychand, Angove, & Tisdall, 2010; White, 1987) แร่ทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นแร่ดินเหนียวชนิดซิลิเกตเคลย์ (Silicate clay) มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นแผ่นซิลิกา (Silica sheet) 2 แผ่น และมีแผ่นอลูมินา (Alumina sheet) อยู่ตรงกลาง (ดุสิต จิตตนนท์, 2546 อ้างถึงใน พุฒิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์, 2555) ในแง่ของการนำไปใช้ประโยชน์นั้นเคยมีรายงานการศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์ชนิดต่างๆบนแร่มอนต์มอริลโลไนต์ (Gopinath & Sugunan, 2007) รวมไปถึงการศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ไปตรึงบนแร่มอนต์มอริลโลไนต์ ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลด้วย (พุฒิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์, 2555) และมีการใช้แร่เวอร์มิคิวไลต์เป็นตัวพยุงในการตรึงเอนไซม์โปรติเอสและยูริเอส (Chellapandian & Sastry, 1992; Anita, Sastry, & Hashim, 1997) แต่ยังไม่มีรายงานการนำเอนไซม์ไลเปสไปตรึงบนแร่ชนิดนี้มาก่อน

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกันอย่างแพร่หลาย แต่การตรึงไลเปสด้วยแร่มอนต์มอริลโลไนต์และแร่เวอร์มิคิวไลต์ยังไม่มีการศึกษามากนัก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่ทั้งสองชนิดดังกล่าว ตลอดจนศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเพื่อหาสภาวะที่เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลได้ดีที่สุด และตรวจสอบการผลิตไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางโครมาโตกราฟี ซึ่งผลที่ได้นี้จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่อาจนำไปสู่การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อเตรียมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากแบคทีเรียบนแร่มอนต์มอริลโลไนต์และแร่เวอร์มิคิวไลต์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ

2. เพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับการใช้ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003

3. เพื่อวิเคราะห์ไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยใช้วิธี Thin layer chromatography และ High Performance Liquid Chromatography

ความสำคัญของการศึกษา

ทำให้ทราบถึงศักยภาพและความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุที่ทดสอบไปใช้เร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ไบโอดีเซล

สมมติฐานของการศึกษา

1. เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนต์มอริลโลไนต์มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างจากเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนต์มอริลโลไนต์

2. ปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของสารเคมีที่เป็นตัวรับหมู่เอซิลในปฏิกิริยา-ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน อัตราส่วนระหว่างน้ำมันปาล์มต่อแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา มีผลต่อร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์แตกต่างกัน

3. เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุที่ทดสอบสามารถเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ไบโอดีเซลได้

ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 เพื่อผลิต Crude lipase ในอาหาร Production medium จากนั้นนำเอนไซม์ไลเปสที่ได้ไปตรึงรูปบนแร่มอนต์มอริลโลไนต์และแร่เวอร์มิคิวไลต์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ จากนั้นนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและ Crude lipase มาศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ได้แก่ ชนิดของสารเคมีที่เป็นตัวรับหมู่เอซิล อัตราส่วนระหว่างน้ำมันปาล์มต่อแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Thin layer chromatography และวิธี High Performance Liquid Chromatography เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์จาก *Pseudomonas cepacia* และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของเมทิลเอสเทอร์

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา แบ่งออกเป็น 6 หัวข้อ ดังนี้

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus* sp.
2. รายละเอียดเกี่ยวกับไลเปส
3. รายละเอียดเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์
4. รายละเอียดเกี่ยวกับแร่ดินเหนียว
5. รายละเอียดเกี่ยวกับไบโอดีเซล
6. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus* sp.

Bacillus เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ มีลักษณะสะท้อนแสง ไม่สามารถย้อมสีด้วยวิธีธรรมดา ต้องย้อมด้วยวิธีย้อมแบบพิเศษ เอนโดสปอร์ทำให้แบคทีเรียในจีนัสนี้ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น สภาวะขาดแคลนสารอาหาร เอนโดสปอร์มีคุณสมบัติทนต่อความร้อน ความแห้ง รังสี UV กรด และสารเคมีต่างๆ รวมทั้งสารฆ่าเชื้อ เป็น Aerobe หรือ Facultative anaerobe ซึ่งส่วนมากสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทางด้านชีวเคมี สรีรวิทยา และมีความต้องการสารอาหารที่หลากหลาย สามารถย่อยสลายสารจากพืชหรือสัตว์ เช่น เซลลูโลส แป้ง เพคติน และอื่นๆ บางชนิดสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ บางชนิดสามารถเกิดกระบวนการไนตริฟิเคชัน ดีไนตริฟิเคชัน หรือสามารถตรึงไนโตรเจน มีทั้งชนิดที่เป็น Acidophile, Alkalophile, Psychrophile หรือ Thermophile (สิรินันท์ ชมภูแสง, 2550)

2. รายละเอียดเกี่ยวกับไลเปส

2.1 ไลเปส

ไลเปส (lipase; EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล นอกจากนี้ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิ-

เคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อย หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้ถูกสกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญ เนื่องจากง่ายในการผลิต การเก็บเกี่ยว และการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ ด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทนต่อค่าความเป็นกรด – ด่าง อุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และยา (ณกัญภัทร จินดา, 2547)

2.2 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์สำคัญในเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของไขมันซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตจึงพบในทั้ง สัตว์ และจุลินทรีย์ (ณกัญภัทร จินดา, 2547)

2.2.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (Animal lipases)

เอนไซม์ไลเปสจากตับ (Pancreatic lipase) เป็นชนิดแรกที่พบ ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายโมเลกุลไขมันในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์ประเภทเอนไซม์เนื้อเยื่อ (Tissue lipases) นี้มีบทบาทและความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการรักษาโรคและในทางการแพทย์ จึงมีความพยายามเสาะหาแหล่งเอนไซม์ประเภทนี้จากแหล่งใหม่ๆ อยู่ตลอดเวลา Steiner and William (2002) พบว่า ไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์ตระกูล *Canine* (สุนัข) เป็นแหล่งของไลเปสที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันเอนไซม์ไลเปสในตับอ่อนของสัตว์สายพันธุ์อื่นๆ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ให้ความสำคัญไลเปสจากสัตว์ตระกูล *Canine* มากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้เป็นสารทดแทนไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์ได้

แมลงเป็นแหล่งของไลเปสอีกแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะ *Cephaloleia presignis* ซึ่งผลิตไลเปสชนิดใหม่ที่ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง (Neutral lipase) ซึ่งได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นสารทดแทนของ Pregastric lipase ที่ถูกใช้เป็นยารักษาน้ำหนักเกิน (Obesity) และการทำงานผิดปกติของกระบวนการย่อยและสังเคราะห์สารต่างๆในมนุษย์ (Roberto, Arreguin, & Gonzalez, 2000)

2.2.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช (Plant lipases)

ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อสับเสตรทสูง และมีสมบัติเฉพาะ ซึ่งจะไม่พบในไลเปสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม น้ำนม และจุลินทรีย์ (Huang, Lin, & Wang, 1988) ซึ่งแหล่งสำคัญของเอนไซม์ไลเปสจากพืชได้แก่ ปาล์มน้ำมัน เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน มะกอก ข้าวสาลี และข้าวเจ้า เป็นต้น

2.2.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (Microbial lipases)

เนื่องจากไลเปสจากพืชถูกพบในเนื้อเยื่อที่ให้พลังงาน (Energy tissue) ส่วนไลเปสจากสัตว์ มักเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของเมตาบอลิซึมของไขมัน (Lipid metabolism)ได้แก่ กระบวนการย่อยสลายไขมัน การดูดซึมไขมัน และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไขมันและโปรตีน (Lipoprotien metabolism) ทำให้เกิดความซับซ้อนในการสกัดอันเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้แหล่งไลเปสทั้งสองจึงยังไม่ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย ต่างกับจุลินทรีย์โดยเฉพาะรา ยีสต์ และแบคทีเรีย เป็นแหล่งของไลเปสที่ถูกนำไปใช้อย่างมากในอุตสาหกรรมด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ทั้งนี้ Jaeger และ Reetz (1998) ได้อธิบายว่า เป็นเพราะไลเปสจากแหล่งนี้มีคุณสมบัติเฉพาะที่สำคัญ 4 ประการ คือ มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ในการทำงานไม่ต้องการ Cofactors มีความจำเพาะต่อสับเสตรทหลายชนิด และมีความสามารถในการคัดเลือกไอโซเมอร์เฉพาะชนิดของเอนไซม์ (Enantioselectivity) สูง

ในระยะเวลาที่ผ่านมาพบว่างานวิจัยส่วนมากจะมุ่งเน้นไปที่เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มากกว่าจากพืชและสัตว์และพบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เท่านั้นที่ถูกนำมาผลิตทางการค้าและมีความสำคัญอย่างมากในด้านอุตสาหกรรมหลายๆด้าน โดยข้อได้เปรียบเอนไซม์ ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์คือ ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีความเสถียรค่อนข้างสูงกว่าไลเปสที่ได้จากพืชและสัตว์ และจุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งมีการผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูง นอกจากนั้น ขั้นตอนในการเลี้ยงไม่ยุ่งยากและใช้พื้นที่น้อย รวมทั้งง่ายต่อการควบคุมจัดการและพัฒนาสายพันธุ์ให้ดีขึ้นได้ (จุฑากานต์ บุญมี , 2552)

2.3 ชนิดของไลเปสจากจุลินทรีย์

Macrae (1983) ได้แบ่งไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่หนึ่ง เป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ โดยเอนไซม์พวกนี้จะสามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอล และกรดไขมัน แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารประกอบในระหว่างการเกิด ปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของไลเปสในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindraceae*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

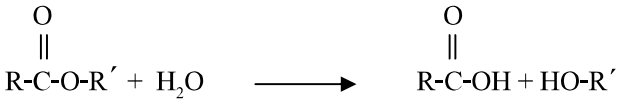
กลุ่มที่สอง เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1,2(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride แต่โมเลกุลทั้งสองชนิดนี้จะไม่คงตัว ถ้าบ่มไว้เป็นเวลานานก็จะเกิด Acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ไลเปสในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจาก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และ *Rhizopus* อีกหลายสปีชีส์

กลุ่มที่สาม เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลี-เซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์บางพวก เช่น *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มี Cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มี Double bond ตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545)

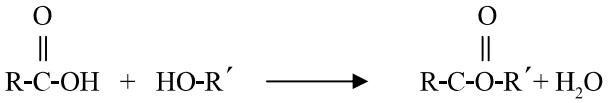
2.4 การทำงานของไลเปส

Gandhi (1997) ได้แบ่งการทำงานของไลเปสเป็น 2 กลุ่ม คือ การย่อยสลายเอสเทอร์ และการสังเคราะห์เอสเทอร์ ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์สามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ Esterification, Acidolysis, Interesterification และ Alcoholysis และสามปฏิกิริยาหลังนี้ได้มีการจัดไว้ในกลุ่มที่ชื่อว่า Transesterification แต่ Yamane (1987) ได้จัดให้ปฏิกิริยา Aminolysis อยู่ในกลุ่ม Transesterification ด้วย ดังนี้

2.4.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

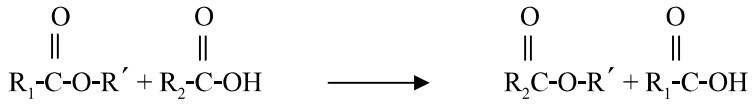


2.4.2 ปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (Synthesis)

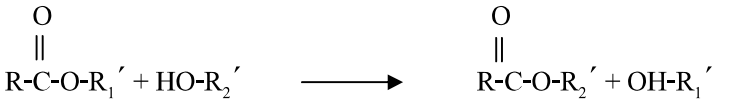


2.4.3 Transesterification

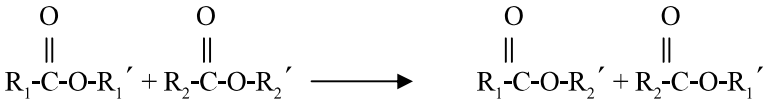
2.4.3.1 Acidolysis



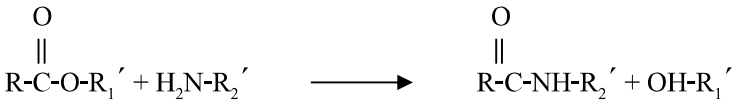
2.4.3.2 Alcoholysis



2.4.3.3 Interesterification



2.4.3.4 Aminolysis



2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัว และกิจกรรมของไลเปส

ลักษณะการทำงาน และความคงตัวของไลเปสมีผลมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.5.1 พีเอช

ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นมีทั้งที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะต่างๆ กัน เช่น ไลเปสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* 168 (Lessuisse, Schanck, & Colson, 1993) และ *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert, Cornish, & Jones, 1991) ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ส่วนใหญ่ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียทนร้อนมักจะเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง และค่อนไปทางด่าง ส่วนความคงตัวต่อพีเอชของไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นพบว่า ส่วนใหญ่จะมีความคงตัวในช่วงพีเอชที่กว้าง เช่น ไลเปสจาก *Bacillus* sp. 398 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-11.0 (Kim, Sung, Kim, & Oh, 1994)

2.5.2 อุณหภูมิ

ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติในการทำงาน และความคงตัวต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น ไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Lee & Rhee, 1993)

2.5.3 ตัวทำละลายอินทรีย์

นอกจากไลเปสจะสามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไขมัน และน้ำมันในสภาวะที่มีน้ำ แต่ไลเปสยังสามารถทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์ใน

สภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์เป็นปฏิกิริยาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมต่างๆ เพราะจะสามารถสังเคราะห์โมเลกุลชีวรูปที่มีคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพตามที่ต้องการได้ โดยการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำนั้นจะมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มาเกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงาน และความคงตัวของเอนไซม์ ส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์มักจะลดความยืดหยุ่นในโมเลกุลของเอนไซม์ และจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ นอกจากตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ไลเปสมีความคงตัวลดลง แต่ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดก็สามารถเพิ่มความคงตัวของไลเปสได้

2.5.4 ไอออนของโลหะ และสารเคมี

ไอออนของโลหะบางชนิดอาจมีผลต่อการทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย เช่น Ca^{2+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Sr^{2+} จัดเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของไลเปสส่วนใหญ่ Ca^{2+} มักจะเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยไอออนของแคลเซียมจะช่วยในการเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นโดยเพิ่มการดูดซึมของไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน (Oil-water interface) และยังช่วยขจัดกรดไขมันออกจากผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน (Wang, Sheu, Wang, & Shaw, 1988) และนอกจากไอออนของโลหะแล้วสารเคมีบางชนิดก็มีผลยับยั้งการทำงานของไลเปสด้วย เช่น Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)

2.5.5 การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ปัจจุบันการปรับปรุงสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตเป็นที่สนใจ เพราะสามารถเพิ่มผลผลิตทางด้านทรัพยากรธรรมชาติให้เพียงพอต่อประชากรมนุษย์ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก ซึ่งข้อดีของการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย คือ ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้นกว่าวิธีดั้งเดิม ได้ผลผลิตที่ถูกต้องตรงตามที่ต้องการ ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียนั้นทำได้หลายวิธี (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545)

3. รายละเอียดเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

เนื่องจากเอนไซม์อิสระมีขีดจำกัดของการใช้งาน ไม่ว่าจะเป็น ความไม่เสถียร การใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ได้ครั้งเดียว และมีต้นทุนการใช้งานสูง เป็นต้น ด้วยขีดจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ จึงนำไปสู่การแก้ปัญหาด้วยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ ข้อดีของเอนไซม์ตรึงรูปคือ มีโอกาสเพิ่มแอกทิวิตีและเสถียรภาพของเอนไซม์ ถ้าใช้วิธีที่เหมาะสม สามารถนำ

กลับมาใช้ซ้ำได้ และใช้ได้อย่างต่อเนื่อง เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำบริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดีเหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดหรือรูปร่างของเอนไซม์ และวิธีการที่ใช้ในการตรึงรูป

3.1 ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

3.1.1 มีโอกาสเพิ่มแอกทิวิตีและเสถียรภาพของเอนไซม์ ถ้าใช้วิธีที่เหมาะสมในการตรึง

3.1.2 ใช้กับระบบเอนไซม์หลายชนิด ในลักษณะ *in vitro*

3.1.3 ใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่อง ใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ได้

3.1.4ใช้ภาวการณ์ทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์เดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของตัวพยุงและวิธีการตรึงรูป

3.1.5 ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวพยุงและซับสเตรต

3.1.6 เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำบริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดี เหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดหรือรูปร่างของเอนไซม์ และวิธีการที่ใช้ในการตรึงรูป

3.2 วิธีการตรึงรูป แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ คือ การเชื่อมกับตัวพยุง การเชื่อมขวาง และการห่อหุ้ม ดังรายละเอียดดังนี้

3.2.1 การเชื่อมกับตัวพยุง (Carrier binding)

หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ และอาจจะไม่ละลายในตัวทำละลายบางชนิดด้วย

3.2.1.1 วิธีการดูดซับทางกายภาพ การดูดซับของเอนไซม์บนผิวภายนอกของตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ วิธีการนี้จะไม่มีผลกระทบต่อโครงรูปสามมิติและแอกทิวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากไม่มีพันธะเคมีและแรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงอ่อนมาก ดังนั้นการนำตัวพยุงมาใช้ซ้ำทำได้ง่าย เหมาะกับตัวพยุงราคาแพง วิธีนี้อาจมีผลต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์บ้างในลักษณะของการหมุนตัวของเอนไซม์เพื่อจับกับซับสเตรต (Stereospecific effect) นิยมใช้วิธีนี้ร่วมกับวิธีอื่น เช่น ร่วมกับวิธีการห่อหุ้ม วิธีนี้ใช้กับเอนไซม์ที่ถูกกระทบได้ง่ายต่อวิธีการเชื่อมพันธะเคมี เช่น อินเวอร์เทส เนื่องจากกรรมวิธีไม่ซับซ้อนและไม่รุนแรง เป็นกรรมวิธีที่ใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิด และใช้หลักการเดียวกับกรณีการทำการดูดซับทางกายภาพประเภทโปรตีนอื่นๆ ข้อเสียของวิธีนี้ก็คือ เอนไซม์อาจหลุดออกจากสารดูดซับได้ง่ายระหว่างการใช้งาน เนื่องจากใช้พันธะชนิดไม่แข็งแรง โดยปัจจัยที่ทำให้เอนไซม์กับสารดูดซับหลุดออกจากกัน ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช Ionic strength อุณหภูมิ ความเข้มข้นของ

เอนไซม์และสารดูดซับ และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ นอกจากนี้สารดูดซับที่ใช้อาจมีคุณสมบัติในการจับสารอื่นนอกเหนือจากเอนไซม์ได้ด้วย เช่น สับสเตรตหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

3.2.1.2 วิธีการเชื่อมด้วยพันธะไอออน หมายถึง การเชื่อมระหว่างโปรตีนของเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายในสารละลายปฏิกิริยาโดยใชพันธะไอออน ลักษณะที่สำคัญของการตรึงรูป วิธีเชื่อมพันธะไอออนก็คือ มีผลต่อแอกทิวิตีและโครงรูปสามมิติน้อย ดังนั้นแอกทิวิตีอาจจะคงเดิม แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงอ่อน เอนไซม์หลุดง่ายที่ความเข้มข้นของไอออนสูงหรือแรงเกาะกันจะลดลงเมื่อเปลี่ยนพีเอช

3.2.1.3 วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง ด้วยพันธะโคเวเลนต์ เป็นการตรึงเอนไซม์กับ Carrier ด้วยพันธะโควาเลนท์ ซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรง จึงเสี่ยงต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้คือ หมู่ฟังก์ชั่น (Functional group) ของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการจับแบบโควาเลนท์ และขั้นตอนการจับกันโดยหมู่ฟังก์ชั่นของเอนไซม์ที่เกิดพันธะโควาเลนท์ได้ดี คือ Amino group, Carboxyl group และ Sulfhydryl group เป็นต้น ข้อดีของวิธีนี้คือจับแน่น ไม่หลุดออกจากกัน แต่ข้อเสียคือใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรง อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้

3.2.2 วิธีการเชื่อมขวาง

การทำเอนไซม์ตรึงรูปโดยวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับวิธีการสร้างพันธะโคเวเลนต์ แต่วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพยุง เอนไซม์จะถูกตรึงรูปอยู่ได้โดยการสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างภายในโมเลกุล 2 โมเลกุล หรือมากกว่า ซึ่งมีผลให้เอนไซม์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มกลายเป็นโมเลกุลใหญ่ละลายน้ำได้น้อยลง

3.2.3 วิธีการห่อหุ้ม

วิธีการห่อหุ้มเป็นวิธีการตรึงรูปแบบรวมอิสระไว้ในช่องว่างของตาข่ายพอลิเมอร์หรือห่อหุ้มเอนไซม์อิสระด้วยเยื่อบางที่ยอมให้มีสารซึมผ่านไปได้บ้าง (Semipermeable membrane) ดังนั้นจึงแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย (Lattice type) และห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type) การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้แตกต่างจากวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ และวิธีเชื่อมขวาง กล่าวคือ เอนไซม์ไม่เชื่อมพันธะเคมีใดๆกับสารห่อหุ้ม ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย แม้ว่าปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดสารพอลิเมอร์สำหรับห่อหุ้มนั้น ต้องการภาวะที่รุนแรงมาก อาจจะมีผลกระทบต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ จึงต้องเลือกหาภาวะที่มีผลกระทบน้อยที่สุด

3.2.3.1 วิธีห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย (Lattice type)

การห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ไม่ละลายน้ำ ทำได้ในลักษณะที่ผสมเอนไซม์เข้ากับสารห่อหุ้มในขณะกำลังจะเกิดพอลิเมอร์ โมเลกุลของเอนไซม์จะถูกห่อหุ้มด้วยช่องตาข่ายอย่างสม่ำเสมอ ทุกช่องอย่างช้าๆ การตรึงรูปเอนไซม์ลักษณะนี้จะผลกระทบต่อเสถียรภาพของของโปรตีนเอนไซม์โดยตรง เนื่องจากสารที่กำลังรวมตัวเป็นพอลิเมอร์มักจะมีปฏิกิริยารุนแรงในการสร้างพันธะเคมี

สารเชื่อมขวางระหว่างสายพอลิเมอร์ ได้แก่ กลูทารัลดีไฮด์ และสารอื่นๆ ตามความเหมาะสมของชนิดพอลิเมอร์สังเคราะห์ และพันธะเคมีที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างช่องตาข่ายระหว่างสายตรงของพอลิเมอร์ จะได้ช่องตาข่ายที่สม่ำเสมอและคงตัว ส่วนพอลิเมอร์ธรรมชาติไม่นิยมใช้สารเชื่อมขวาง เนื่องจากการเกิดช่องตาข่ายในพอลิเมอร์ธรรมชาติเกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องใช้ตัวเชื่อมขวาง กล่าวคือ ช่องตาข่ายของสายพอลิเมอร์ธรรมชาติจะอยู่ในลักษณะช่องตาข่ายแบบกายภาพ ซึ่งเกิดจากสายสาขาของพอลิเมอร์ธรรมชาติจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบเกิดช่องตาข่ายขึ้นเอง ดังนั้นขนาดช่องตาข่ายจะขึ้นกับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และจะขยายกว้างได้ถ้าลดความเข้มข้น และยังมีช่องตาข่ายที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนของน้ำกับโมเลกุลของพอลิเมอร์ อย่างไรก็ตาม ช่องตาข่ายทั้ง 2 แบบนี้ไม่แข็งแรงจึงต้องเติมสารเชื่อมขวาง ถ้าต้องการเพิ่มความแข็งแรงและความคงตัวของช่องตาข่ายในพอลิเมอร์

3.2.3.2 วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type)

เทคนิคการทำแคปซูลเล็กได้เริ่มขึ้นมาจาก บริษัท National Cash Register Co., USA ได้นำมาใช้ทำกระดาษก๊อปปี้ไร้คาร์บอน (Carbonless copy paper) ในปี ค.ศ. 1954 จากนั้นได้มีการนำมาพัฒนาดัดแปลงใช้ในอุตสาหกรรมประเภทอื่นๆ เช่น ยา อาหาร เครื่องสำอาง สีย้อม เชื้อเพลิง เป็นต้น สำหรับการทำแคปซูลเล็กของเอนไซม์ได้มีพัฒนามาด้วยหลักการเดียวกันแต่กรรมวิธีจะต้องควบคุมให้ดี ป้องกันผลกระทบต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ แคปซูลเล็กของเอนไซม์ที่ได้ริเริ่มทำกันมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-100 ไมครอน ข้อดีคือพื้นที่ผิวของเอนไซม์ที่จะสัมผัสกับสับสเตรตมีมากและสามารถตรึงได้หลายๆ เอนไซม์ได้ในขั้นตอนเดียว

4. รายละเอียดเกี่ยวกับแร่ดินเหนียว

ดินที่อยู่ในสารละลายประกอบด้วยแร่ธาตุต่าง ๆ อินทรียวัตถุที่มีขนาดเล็กมาก และสามารถแขวนลอย ซึ่งมีอนุภาคเล็กราว 0.5 – 0.2 ไมครอน สารคอลลอยด์ในดิน แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ คอลลอยด์ที่เป็นสารอินทรีย์ (Organic colloid) คอลลอยด์ประเภทนี้ คือ ส่วนที่หลงเหลือจากเศษ

ซากพืชซากสัตว์ที่ถูกย่อยสลายแล้ว ส่วนนี้จะทนทานต่อการสลายตัวหรือสลายตัวได้ช้ามาก เรียกสารอินทรีย์ส่วนนี้ว่า ฮิวมัส (Humus) คอลลอยด์ที่เป็นสารอนินทรีย์ (Inorganic colloid) คอลลอยด์ประเภทนี้ คือ ส่วนที่ได้จากการสลายตัวของแร่ธาตุ ซึ่งจะถูกปลดปล่อยออกมาในรูปของไอออนและอนุมูลต่าง ๆ และส่วนที่ปลดปล่อยออกมานี้อาจตกผลึก หรือทำปฏิกิริยารวมตัวกันใหม่ เป็นผลึกบาง ๆ มีขนาดเล็กมาก เรียกว่า แร่ดินเหนียว (Clay mineral) (บุญแสน เตียวนุกูลธรรม, 2545)

แร่ดินเหนียว (Clay mineral) หมายถึง กลุ่มแร่อะลูมิโนซิลิเกต (Alumino silicate minerals) ซึ่งประกอบด้วยแผ่นซิลิกา (Silica sheet) และแผ่นอะลูมินา (Alumina sheet) ซ้อนกันแบบ 1:1 หรือ 2:1 มีทั้งชนิดที่ขยายตัวได้และขยายตัวไม่ได้ แร่ดินเหนียวที่พบทั่วไปคือ เคโอลิไนต์ (Kaolinite) อิลไลต์ (Illite) มอนต์มอริลโลไนต์ (Montmorillonite) และเวอร์มิคิวไลต์ (Vermiculite) (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2548)

4.1 สมบัติที่สำคัญของแร่ดินเหนียว

4.1.1 รูปร่างและขนาด

มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ ซ้อนกันอยู่เป็นจำนวนมาก อนุภาคของแร่ดินเหนียวส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นผลึกบาง ๆ มีรูปร่างเป็นหกเหลี่ยม (Hexagonal) ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope) ส่วนแร่ดินเหนียวบางชนิดมีรูปร่างเป็นม้วนก็มี ขนาดของซิลิเกตเคลย์ จะอยู่ระหว่าง 0.01 – 5.0 ไมครอน (บุญแสน เตียวนุกูลธรรม, 2545)

4.1.2 พื้นที่ผิว (Surface area)

เนื่องจากอนุภาคของแร่ดินเหนียวมีขนาดเล็กมากและโดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นแผ่นแบนและบาง จึงทำให้พื้นที่ผิวจำเพาะ (Specific surface) ซึ่งเป็นพื้นที่ผิวต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักมีค่าสูงมาก อนุภาคของสารที่มีน้ำหนักเท่ากัน แต่เมื่อมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันออกไป เช่น กลม ลูกบาศก์ และแบน จะมีพื้นที่ผิวทั้งหมดแตกต่างกันเป็นอย่างมาก อนุภาคที่มีน้ำหนักเท่ากันอนุภาคเป็นรูปทรงกลมจะมีพื้นที่ผิวน้อยที่สุด ส่วนอนุภาคที่เป็นรูปแบนหรือแผ่นจะมีพื้นที่ผิวมากที่สุด จะเห็นได้ว่าแร่ดินเหนียว มีรูปร่างที่ส่งเสริมให้มีพื้นที่ผิวมากที่สุด ที่กล่าวมาแล้วนี้เป็นพื้นที่ผิวนอก (External surface) แต่บางชนิดยังมีพื้นที่ผิวภายในอีกด้วย โดยเป็นพื้นที่ผิวที่อยู่ในหลืบระหว่างแผ่นผลึกของแร่ดินเหนียวที่ซ้อนทับกันอยู่เป็นอนุภาคหรือ Micelle ของแร่ ดังนั้นแร่ดินเหนียวพวกนี้ จะมีพื้นที่ผิวทั้งหมดเป็นจำนวนมาก (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2548)

4.1.3 ความเหนียว (Cohesion) และสภาพพลาสติก (Plasticity)

แร่ดินเหนียวมีคุณสมบัติเกี่ยวกับความเชื่อมแน่นและสภาพพลาสติกแตกต่างกันเป็นอย่างมาก ขึ้นอยู่กับชนิดของดินเหนียว คำว่าความเหนียว (Cohesion) นั้นหมายความถึงความสามารถเกาะยึดกันได้ระหว่างอนุภาคของดินเหนียว (บุญแสน เตียวนุกูลธรรม, 2545) การที่ดินเหนียวชนิดหนึ่งมีความเชื่อมแน่นสูงก็เนื่องจากอนุภาคของดินเหนียวมีพื้นที่ผิวให้น้ำเกาะยึดอยู่ได้มาก จึงทำให้อนุภาคของดินเหนียวนั้นเกาะยึดกันได้ดีด้วย ดังนั้นดินที่มีดินเหนียวซึ่งมีความเชื่อมแน่นสูงจะมีสภาพเหนียวและเกาะติดมือ นอกจากนี้เมื่อดินเหนียวมีความชื้นที่เหมาะสมจะมีความอ่อนนุ่มบีบปั้นให้เป็นรูปต่างๆ และคงสภาพเช่นนั้นอยู่ได้ คุณสมบัตินี้เราก็เรียกว่า สภาพพลาสติก (Plasticity) ดินเหนียวที่มีความเชื่อมแน่น และสภาพพลาสติกสูงจะเป็นดินเหนียวพวกที่มีพื้นที่ผิวมากจึงมีโอกาสดูดยึดอนุภาคของน้ำไว้ที่ผิวได้มาก การเกาะกันระหว่างอนุภาคของดินก็จะเกิดขึ้นตามไปด้วย

4.1.4 การขยายตัว (Swelling) และการหดตัว (Shrinking)

ดินเหนียวบางชนิดมีคุณสมบัติเกี่ยวกับการขยายตัวได้สูงมาก บางชนิดก็ขยายตัวได้น้อยทั้งนี้เกี่ยวกับลักษณะทางโครงสร้างของดินเหนียว โดยเฉพาะแร่ดินเหนียวบางชนิดแผ่นผลึกที่ซ้อนทับกันเป็น Clay micelle นั้นจะมีช่องหรือหลืบระหว่างแผ่นผลึกที่ทับกันค่อนข้างกว้างและไม่เกาะยึดกันเหนียวแน่นนัก โมเลกุลของน้ำสามารถแทรกเข้าไปได้ง่าย แล้วเข้าไปเกาะยึดอยู่กับพื้นที่ผิวภายในของดินเหนียวมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อน้ำเข้าไปอยู่ในหลืบ (Inter layer) นั้นได้มากขึ้นก็ยิ่งทำให้ หลืบระหว่างดินเหนียวพวกนี้อ้ามากขึ้น ดังนั้นจึงมีผลทำให้ดินเหนียวพวกนี้เมื่อเปียกน้ำแล้วจะพองหรือขยายตัวได้ แต่ถ้าทำให้ดินเหนียวนี้แห้งลง เช่นนำเข้าเตาอบเพื่อไล่น้ำออก น้ำที่เกาะอยู่ในหลืบของดินเหนียวก็จะหลุดโดยการระเหยออกมา เมื่อน้ำออกมาหมดก็ทำให้หลืบของดินเหนียวนั้นยุบตัวลงมาจึงมีผลทำให้ดินเหนียวนั้นหดตัว

4.1.5 ประจุลบ (Electronegative charge) และการดูดยึดไอออนบวก (Adsorption of cation) บริเวณผิวของอนุภาคดินเหนียว จะมีประจุลบอยู่จำนวนมากเมื่อดินเหนียวอยู่ในสภาพแขวนลอยจะมีอนุภาคของน้ำและแคตไอออน (Cation) มาเกาะอยู่ที่ดินเหนียว เต็มไปหมดสภาพเช่นนี้เราเรียกว่าเคลย์ ไมเซลล์ (Clay micelle) ไอออนบวกที่ถูกยึดอยู่ที่ผิวของดินเหนียว จะถูกยึดแบบหลวมๆ สามารถถูกไล่ที่ได้ด้วยแคตไอออนชนิดอื่น ๆ ได้ ซึ่งเรียกแคตไอออนพวกนี้ว่า แคตไอออนที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable cation) ดินส่วนใหญ่พบว่ามี แคตไอออน พวก ไฮโดรเจนไอออน โปตัสเซียมไอออน โซเดียมไอออนแมกนีเซียมไอออน และคัลเซียมไอออนเกาะที่ผิวของดินเหนียว (บุญแสน เตียวนุกูลธรรม, 2545)

4.2 ชนิดของแร่ดินเหนียวที่สำคัญ

4.2.1 เคโอลิไนต์ (Kaolinite) โครงสร้างของเคโอลิไนต์ประกอบด้วยแผ่นซิลิกา (Silica sheet) หนึ่งแผ่นประกบทับแผ่นอะลูมินา (Alumina sheet) อีกหนึ่งแผ่น แบบ 1:1 โดยที่ Si (ซิลิกา) และ Al (อะลูมินา) จะร่วมเกาะออกซิเจนตัวเดียวกันในด้านที่ประกอบเข้าหากัน จึงทำให้แผ่นทั้งสองประสานกันแน่นรวมกันเข้าเป็นผลึกของแร่เคโอลิไนต์ซึ่งมีสูตรทางเคมีคือ $Si_4Al_4O_{10}(OH)_8$ ผลึกของเคโอลิไนต์จะขยายตัวเองออกไปในแนวระนาบได้โดยไม่จำกัด รูปของแผ่นผลึกของ เคโอลิไนต์เป็นรูปหกเหลี่ยมมีขอบชัดเจน ผลึกของเคโอลิไนต์ที่อยู่ในธรรมชาติจะเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ แต่ละชั้นของแผ่นโครงสร้างที่เรียงซ้อนทับกันมีความหนา 7 อังสตรอม (วัดจากขอบบนของผลึกแผ่นบนถึงขอบบนของแผ่นล่างถัดลงมา) หลืบระหว่างแผ่นโครงสร้างไม่สามารถจะขยายให้กว้างขึ้นหรือแคบเข้าได้ เนื่องจากถูกยึดไว้ด้วยพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างอะตอมออกซิเจนของแผ่นซิลิกาและอะตอมไฮโดรเจนของแผ่นอะลูมินาระหว่างแผ่นโครงสร้างที่อยู่ติดกัน การที่แผ่นอะลูมินา มีอะตอมไฮโดรเจนอยู่ด้วยนั้น ความจริงอะตอมไฮโดรเจนนี้เป็นของหมู่ไฮดรอกซิล(OH) ซึ่งเกิดขึ้นที่ออกซิเจนอะตอมซึ่งอยู่ด้านนอกของแผ่นอะลูมินา โดยธรรมชาติแล้วไฮโดรเจนและออกซิเจนจะมีสัมพรรคภาพ (Affinity) ที่เกาะยึดกันเป็นอย่างมาก ดังนั้นเมื่อต่างเข้ามาอยู่ใกล้กันจึงทำให้เกิดมีแรงยึดระหว่างกันขึ้นค่อนข้างเหนียวแน่นมากซึ่งเราเรียกว่า พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonding) เมื่อแผ่นผลึกของเคโอลิไนต์ที่เรียงซ้อนกันอยู่นั้นมีพันธะไฮโดรเจนช่วยเกาะยึดด้วยก็ทำให้หลืบระหว่างแผ่นผลึกนั้นแคบและขยายออกไม่ได้ จึงมีผลทำให้เคโอลิไนต์ไม่ขยายตัวและหดตัวเมื่อเปียกและแห้ง และพื้นที่ผิวภายในหลืบก็ไม่มีประโยชน์เนื่องจากดูดยึดอะไรไม่ได้ เพราะน้ำและไอออนต่างๆเข้าไปไม่ได้ ดังนั้นจึงถือว่าพื้นที่ผิวภายในของเคโอลิไนต์ไม่มี จะมีแต่พื้นที่ผิวภายนอกเท่านั้น (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2548)

4.2.2 สเม็กไทต์ (Smectite) แร่ดินเหนียวพวกนี้มีอยู่หลายชนิดที่สำคัญได้แก่ Montmorillonite, Beidellite, Nontronite, Saponite และอื่นๆอีก ในจำนวนนี้มอนมอริลโลไนต์ (Montmorillonite) เป็นแร่ดินเหนียวที่สำคัญเพราะมีให้พบเห็นอยู่มากในดินทั่วๆไป รองลงมาได้แก่ Beidellite และ Nontronite ตามลำดับ

โครงสร้างของแร่ดินเหนียวพวก Smectite นั้นประกอบด้วยแผ่นซิลิกา (Silica sheet) สองแผ่นและแผ่นอะลูมินา (Alumina sheet) หนึ่งแผ่นสอดอยู่ระหว่างกลางของแผ่นซิลิกาทั้งสอง Si (ซิลิกา) และ Al (อะลูมินา) อะตอมในแผ่นเหล่านั้นต่างก็เกาะยึดออกซิเจนร่วมกันประกอบกันเป็นผลึกของ Smectite เนื่องจากแร่ดินเหนียวพวกนี้ประกอบด้วยแผ่นซิลิกาสองแผ่นและแผ่นอะลูมินาหนึ่งแผ่นจึงมักเรียกกันว่า 2:1 type clay

ผลึกของ Smectite นี้จะเชื่อมต่อกันไปในระดับ และจะซ้อนกันเป็นชั้นๆ เช่นเดียวกันกับเคโอลิไนต์ แผ่นโครงสร้างและหลืบระหว่างแผ่นที่ซ้อนกันนี้มีความหนา 9-21 angstrom หลืบอาจขยายกว้างหรือแคบได้ เพราะไม่มีพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ยึดระหว่างแผ่นผลึกที่ซ้อนทับกันอยู่ เนื่องจากทั้งด้านบนและด้านล่างของหลืบนี้ต่างก็มีออกซิเจนซึ่งเป็นผลึกซิลิกาทั้งนั้น ดังนั้นพันธะไฮโดรเจนจึงไม่เกิด แต่จะเกิด Oxygen-oxygen linkage ขึ้นแทน ซึ่งเป็นแรงเกาะกันที่เบาบางมากไม่สามารถจะยึดหลืบของแร่ดินเหนียวให้มีระยะที่คงที่ได้ โมเลกุลของน้ำและไอออนประจุบวกต่างๆก็แทรกซึมเข้าไปดูดซับอยู่ที่ผิวภายในหลืบ (Internal surface) ได้โดยง่าย แร่ดินเหนียวพวกนี้จะมีพื้นที่ผิวดูดซับโมเลกุลของน้ำและไอออนประจุบวกได้มาก การพองตัวและหดตัวก็จะเกิดขึ้นมากด้วยเมื่อดินนั้นเปียกหรือแห้งตัวลง ความสามารถในการดูดยึดน้ำและไอออนประจุบวกต่างๆจะสูงมาก เมื่อแร่ดินเหนียวพวกนี้เปียกน้ำจะเหนียว ไม่ร่วนเหมือนเคโอลิไนต์

เนื่องจากแร่ดินเหนียวพวกนี้ยึดหดได้ง่ายและมี Ionic substitution มาก โครงสร้างของผลึกจึงไม่แข็งแรง การแตกสลายของผลึกและอนุภาคของดินเหนียวพวกนี้จึงเกิดขึ้นได้ง่ายมาก ในสภาพธรรมชาติทั่วไปจึงพบว่าแร่ดินเหนียวพวก Smectite นี้จะมีขนาดเล็กมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเคโอลิไนต์ คือมีขนาดอยู่ระหว่าง 0.01 ถึง 1.0 ไมโครเมตร ดังนั้นจึงยิ่งมีผลทำให้แร่ดินเหนียวพวกนี้มีพื้นที่ผิวจำเพาะ (Specific surface) สูงมากขึ้นอีก

แร่ดินเหนียวในกลุ่ม Smectite จะมีโครงสร้างเหมือนกันแต่จะต่างกันที่ปริมาณการถูกไล่ที่ของ Si (ซิลิกา) และ Al (อะลูมินา) ในโครงสร้างของผลึกด้วยธาตุอื่นๆซึ่งเรียกว่า Ionic substitution ยกตัวอย่าง เช่น สูตรทั่วไปของแร่ดินเหนียวพวก 2:1 ก็คือ $Si_8Al_4O_{20}(OH)_4$ เรียกว่า Pyrophyllite ถ้ามีธาตุ Mg (แมกนีเซียม) เข้ามาแทนที่ Al (อะลูมินา) บางส่วนในแผ่นอะลูมินา (Al-sheet) ก็ได้ 2:1 type clay ที่เรียกว่า มอนต์มอริลโลไนต์ (Montmorillonite) มีสูตรคือ $Si_8(Al_{3.34}Mg_{0.66})O_{20}(OH)_4$ ถ้ามีธาตุ Al(อะลูมินา) เข้ามาแทนที่ Si (ซิลิกา) บางส่วนในแผ่นซิลิกา (Si-sheet) ก็จะเกิด 2:1 type clay ชนิดที่เรียกว่า Beidellite ขึ้นมีสูตรคือ $(Si_{7.33}Al_{0.67})Al_4O_{20}(OH)_4$ หรือถ้ามี Al (อะลูมินา) เข้ามาแทนที่ Si (ซิลิกา)ในแผ่นซิลิกาบางส่วนและแผ่นอะลูมินานั้น Al ถูกแทนที่หมดโดย Mg ก็จะเกิด 2:1 type clay พวก Saponite $(Si_{7.34}Al_{0.66})Mg_6O_{20}(OH)_4$ ขึ้นเป็นต้น

4.2.3 อิลไลต์ (Illite) มีองค์ประกอบของผลึกคล้ายกับพวก Smectite มาก และมีโครงสร้างทั่วๆไปเหมือนกัน ดังนั้นจึงเป็นพวก 2:1 type clay ด้วยแต่จะแตกต่างกันตรงที่ระยะระหว่างแผ่นผลึกโดยวัดจากขอบบนของแผ่นโครงสร้างแผ่นบนถึงขอบบนของแผ่นล่างถัดลงมามีระยะคงที่เท่ากับ 10 อังสตรอม และไม่สามารถยืดหดได้เหมือนอย่าง Smectite บางครั้งจะเรียกพวกนี้ว่าเป็นพวก

ที่ไม่ยืดตัว (Non-expanding lattice) ส่วน Smectite เป็นพวกที่ยืดตัวได้ (Expanding lattice) สาเหตุที่อิลไลต์เป็นพวกที่ไม่ยืดตัวก็เพราะว่า Si อะตอมในแผ่นซิลิกาบางส่วนจะถูกแทนที่โดย Al อะตอม และประจุที่เหลือค้างอยู่ เนื่องจากการแทนที่กันนี้จะถูกดูดยึดชดเชยทำให้เป็นกลางโดย K^+ ดังนั้น สูตรอิลไลต์จึงเขียนได้ดังนี้ $K1.33\ (Si_{6.66}Al_{1.33})Al_4O_{20}(OH)_4$ สำหรับ K^+ ที่เข้ามาทำให้ประจุลบที่ค้างอยู่เป็นกลางนี้จะเข้ามาอยู่ในรูปของ K^+ ที่ฝังตัวอยู่ในระหว่างหลืบภายในช่องรูปหกเหลี่ยมของแผ่นซิลิกาของผลึกที่ซ้อนอยู่ข้างบนและข้างล่าง เลยทำหน้าที่คล้ายๆกับดุมหรือกลอนที่ยึดแผ่นผลึกของอิลไลต์ที่เรียงซ้อนกันอยู่นั้นทำให้ขยับเขยื้อนได้ยาก ซึ่งมีผลทำให้หลืบระหว่างแผ่นผลึกของแร่ดินเหนียวขยายและหดตัวไม่ได้ เมื่อดินเหนียวนั้นเปียกหรือแห้ง ไอออนประจุบวกต่างๆก็จะซึมเข้าไปดูดยึดกับพื้นที่ผิวภายในหลืบไม่ได้ด้วย ซึ่งก็หมายความว่า พื้นที่ผิวภายในจะมีน้อยมากแต่ก็ยังมากกว่าแร่ดินเหนียวพวกเคโอลิไนต์ ทั้งนี้เพราะโมเลกุลของน้ำและไอออนประจุบวกอาจแทรกซึมเข้าไปดูดซับอยู่ที่พื้นที่ผิวภายในบริเวณใกล้กับขอบของผลึกได้บ้าง ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าคุณสมบัติต่างๆของอิลไลต์จะอยู่ระหว่างคุณสมบัติของ Smectite และ Kaolinite (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2548)

4.2.4 แร่ดินเหนียวชนิดอื่นๆ นอกจากแร่ดินเหนียวพวกใหญ่ๆ 3 พวก ซึ่งได้กล่าวมาแล้วนี้ ในปัจจุบันยังทราบว่ามีพวกอื่นๆอีกเป็นจำนวนมาก เช่น เวอร์มิคิวไลต์ (Vermiculite) ซึ่งก็เป็นพวก 2:1 type clay คล้ายกับอิลไลต์ แต่ Al ในแผ่นอะลูมินาซึ่งเป็น Di-octahedral จะถูกแทนที่หมดโดย Mg (Tri- octahedral) และในระหว่างหลืบของผลึกที่ซ้อนทับกันนั้นจะมี Ca และ Mg ดูดยึดอยู่เป็นส่วนใหญ่ และโมเลกุลของน้ำสามารถจะแทรกซึมเข้าไปได้น้อย (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2548)

5. รายละเอียดเกี่ยวกับไบโอดีเซล

5.1 ความหมายและนิยามของน้ำมันไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล (Biodiesel) หมายถึง น้ำมันเชื้อเพลิงที่เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซลซึ่งได้มาจากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้ปรุงอาหารแล้ว โดยผ่านกระบวนการทางเคมีกับแอลกอฮอล์หรือกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ซึ่งเป็นกระบวนการที่นำน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้ปรุงอาหารแล้วมาทำปฏิกิริยากับตัวรับหมู่เอซิล (Acyl acceptor) เช่น เมทานอล (Methanol) หรือเอทานอล (Ethanol) โดยส่วนใหญ่นิยมใช้เมทานอล โดยมีกรด เบส หรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างจากไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ให้เป็นโม

โนอัลคิลเอสเทอร์ (Mono alkyl ester) ของกรดไขมัน ได้แก่ เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl ester : FAMEs) มีสูตรทางเคมีคือ R_1COOR_2 และกลีเซอรอล (Glycerol) เป็นผลิตภัณฑ์ เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้นี้มีลักษณะคล้ายน้ำมันดีเซลจึงเรียกเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้นี้ว่าไบโอดีเซล (สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.)

5.2 ประเภทของไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

1.2.1 น้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์

ไบโอดีเซลประเภทนี้ใช้น้ำมันของพืชหรือไขมันจากสัตว์โดยตรง เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม หรือน้ำมันจากไขมันสัตว์ เช่น น้ำมันหมู เป็นต้น ป้อนลงไปให้เครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ต้องผสมหรือเติมสารเคมีอื่นใด (สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.) สิ่งสำคัญของการใช้น้ำมันพืชโดยตรงคือต้องมีการอุ่นน้ำมันในทุกจุดที่น้ำมันผ่าน ได้แก่ ถังน้ำมัน ท่อทางเดินของน้ำมัน ชุดกรองน้ำมัน และอุณหภูมิที่อุ่นน้ำมันต้องอย่างน้อย 70 องศาเซลเซียส แนวทางในการนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรงเป็นวิธีที่ได้น้ำมันราคาถูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำน้ำมันพืชที่ยังไม่ผ่านกระบวนการกลั่นมาใช้ แต่การที่จะนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสมจำเป็นต้องอาศัยความร้อนในการหลอมเหลวไขและลดความหนืดของน้ำมัน เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลประมาณ 11-17 เท่า ที่อุณหภูมิต่ำน้ำมันพืชจะยิ่งมีความหนืดสูงขึ้นเป็นลำดับจนเกิดเป็นไข โดยที่น้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลทำให้หัวฉีดของน้ำมันเกิดการฉีดน้ำมันให้เป็นฝอยได้ยากเกิดเป็นอุปสรรคต่อการป้อนน้ำมันเชื้อเพลิง และเกิดการสันดาปไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้แล้วน้ำมันพืชที่มีคุณสมบัติการระเหยตัวกลายเป็นไอได้ช้าและน้อยมาก (Slow/low volatility) ทำให้เครื่องยนต์ติดยาก และหลงเหลือคราบเขม่าเกาะที่หัวฉีด ผนังลูกสูบ แหวน และวาล์ว จากคุณสมบัติที่น้ำมันพืชมีความหนืดสูงและระเหยตัวได้ต่ำกว่าน้ำมันดีเซลนี้ทำให้เกิดความยุ่งยากเมื่อใช้น้ำมันพืชโดยตรงในเครื่องยนต์ (พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล, 2552; วิทยา ถาปันนา, ณัฐพงษ์ จันทิมา และนิคม ชื่นใจดี, 2555)

5.2.2 ไบโอดีเซลแบบลูกผสม

ไบโอดีเซลประเภทนี้ก็คือเป็นการผสมน้ำมันพืชหรือน้ำมันจากสัตว์กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซล เพื่อลดความหนืดของน้ำมันพืชหรือน้ำมันจากสัตว์ลง เพื่อให้ได้ไบโอดีเซลที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลให้มากที่สุด (สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.) น้ำมันที่ได้จากวิธีดังกล่าวเหมาะกับกรณีจำเป็นต้องการใช้น้ำมัน

อย่างเร่งด่วนและใช้กับเครื่องยนต์ที่ใช้งานหนัก ตลอดจนใช้งานในภูมิอากาศเขตร้อน อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันก๊าดและน้ำมันพืชขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของพื้นที่ใช้งาน อัตราส่วนผสมมีตั้งแต่ 10:90 หรือ 40:60 ของน้ำมันก๊าดต่อน้ำมันพืช (วิทยา ถาปันนา, ณัฐพงษ์ จันทิมา และนิคม ชื่นใจดี, 2555) ไบโอดีเซลแบบลูกผสมสามารถใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลที่ไม่มีการดัดแปลงเครื่องยนต์ ในการผลิตไบโอดีเซลแบบลูกผสมจึงต้องเลือกชนิดของน้ำมันพืช ชนิดของตัวทำละลาย และอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมกับพื้นที่ และฤดูกาลที่ใช้ เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้และไม่เกิดความยุ่งยาก (พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล, 2552)

5.2.3 ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์

ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์เป็นความหมายของไบโอดีเซลที่แท้จริง และเป็นที่ยอมรับในสากล และมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี สหรัฐอเมริกา เป็นต้น มีคำจำกัดความว่าเป็นเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด ทำให้ไม่มีปัญหากับเครื่องยนต์ ได้น้ำมันที่มีความคงตัวมากขึ้น สามารถนำไปใช้ได้กับเครื่องยนต์ดีเซลทุกชนิด ทั้งเติมโดยตรงและผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่าง ๆ เช่น B5 หมายถึง การผสมน้ำมันไบโอดีเซลต่อน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 5:95 หรือ B100 ซึ่งเป็นน้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น (สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.) แต่ปัญหาคือต้นทุนการผลิตมีมูลค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับไบโอดีเซลแบบอื่น ๆ การนำมาใช้กับเครื่องยนต์มักจะนำมาผสมกับน้ำมันดีเซล ซึ่งปัจจุบันได้รับความนิยมอย่างมากในระบบขนส่งมวลชน เนื่องจากเป็นน้ำมันที่มีราคาไม่ต่างจากน้ำมันดีเซลมากนัก นอกจากนี้ยังสามารถเผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์ ไม่มีเขม่าควันหลงเหลือ ทำให้ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จากความนิยมเป็นอย่างมากเช่นนี้ทำให้ปั๊มน้ำมันจำนวนมากนำไบโอดีเซลมาบริการให้กับลูกค้า เชื้อเพลิงชนิดนี้มีความหนืดใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล และมีความคงตัวสูง ความหนืดเปลี่ยนแปลงได้น้อยมากเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยน จุดวาบไฟของไบโอดีเซลมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซลทำให้มีความปลอดภัยในการใช้และการขนส่ง นอกจากนั้นแล้ว ค่าซีเทนที่เป็นดัชนีที่บอกถึงคุณภาพในการติดไฟของไบโอดีเซลยังมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล ไบโอดีเซลประเภทนี้เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันพืชที่ใช้แล้วกับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด ด่าง หรือเอนไซม์ โดยปกติน้ำมันพืชประกอบด้วยกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid), Phospholipid, Sterol, น้ำ และสิ่งเจือปนอื่น ๆ ดังนั้นในการนำน้ำมันมาใช้เป็นเชื้อเพลิงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการต่าง ๆ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสายโซ่ตรง (พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล, 2552) และหนึ่งในกระบวนการนั้นคือ ปฏิกิริยา Transesterification (หรือ Alcoholysis) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของ

น้ำมันจากไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (Mono alkyl ester) ได้แก่ เมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) เอทิลเอสเทอร์ (Ethyl ester) และกลีเซอรอล (Glycerol) (วิทยา ถาปันนา, ณัฐพงษ์ จันทิมา และนิคม ชื่นใจดี, 2555)

5.3 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล (วิทยา ถาปันนา, ณัฐพงษ์ จันทิมา และนิคม ชื่นใจดี, 2555; สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.)

ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีวิธีการและทางเลือกจำนวนมาก เทคนิคต่าง ๆ มีทั้งข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ดังนั้นการออกแบบกระบวนการผลิตที่สามารถรองรับการทำงานได้หลากหลายจึงเป็นวิธีที่นักออกแบบนิยมทำกัน แต่การออกแบบที่ซับซ้อนย่อมส่งผลให้เครื่องจักรมีราคาแพงและการทำงานยุ่งยากขึ้น กระบวนการผลิตสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ ตามลักษณะการผลิต ดังนี้

แบบที่ 1 กระบวนการผลิตแบบกะ (Batch process) เป็นกระบวนการที่นิยมและง่ายที่สุด เนื่องจากต้นทุนเครื่องจักรต่ำและการดำเนินงานไม่ซับซ้อน ในการผลิตใช้ถังกวนผสมทำปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์และไตรกลีเซอไรด์ จะดำเนินปฏิกิริยาในถังปิดหรือถังเปิดที่มีอุณหภูมิระหว่าง 25-85 องศาเซลเซียส ตัวเร่งปฏิกิริยาคือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) กระบวนการที่ดีต้องเกิดขึ้นในช่วงแรกเพื่อให้แอลกอฮอล์ น้ำมันและตัวเร่งปฏิกิริยาสัมผัสกันอย่างสมบูรณ์ ส่วนช่วงท้ายของปฏิกิริยาการลดแรงกวนจะช่วยให้กลีเซอรอลที่เกิดจากปฏิกิริยาแยกตัวออกได้ดี

แบบที่ 2 กระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง (Continuous process) ในโรงงานขนาดใหญ่เป็นกระบวนการผลิตแบบถังต่อเนื่อง (Continuous stirred tankreactor, CSTR) ซึ่งประกอบด้วยถังกวนผสมตั้งแต่หนึ่งใบ (หรืออาจมากกว่า) ที่มีการไหลเข้าของสารป้อนทั้งหมดและมีการไหลออกของผลิตภัณฑ์อย่างต่อเนื่อง ในกระบวนการผลิตที่ใช้ถังปฏิกรณ์แบบนี้ต้องมีการกวนที่รุนแรงเพียงพอที่จะทำให้ของผสมเป็นเนื้อเดียวกันภายในถังก่อนไหลออกจากถัง ทำให้การแยกกลีเซอรอลในถังแยกทำได้ลำบาก

อย่างไรก็ตามชนิดของกระบวนการผลิตทั้งสองได้ไบโอดีเซลที่มีคุณภาพใกล้เคียงกัน การตัดสินใจของผู้ประกอบการจะต้องคำนึงถึงผลดีและผลเสียของกระบวนการผลิตแต่ละประเภทก่อน เช่น เน้นค่าก่อสร้างระดับปานกลางก็จะเลือกกระบวนการผลิตแบบกะ แต่ถ้าเน้นการตัดสินใจคนคุมเครื่องน้อยที่สุดก็จะเลือกกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง เป็นต้น

5.4 เทคนิคการผลิตไบโอดีเซล

ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้นได้มีการคิดค้นเทคนิคต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ปรับปรุงคุณภาพของไบโอดีเซลให้ดีขึ้น การทำไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (Pyrolysis) การทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต และการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นเทคนิคที่นิยมใช้และไบโอดีเซลที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด

5.4.1 ไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชัน คือ คอลลอยด์ที่กระจายตัวในสภาวะที่สมดุล โดยอนุภาคที่กระจายตัวอยู่ส่วนมากอยู่ในช่วง 1-150 นาโนเมตร ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้เพื่อแก้ปัญหาค่าความหนืดสูงในน้ำมันพืชให้มีค่าความหนืดลดลง โดยใช้ควบคู่กับตัวทำละลาย เช่น 1-บิวทานอล (Srivastava & Prasad, 2000) ไมโครอิมัลชันที่เกิดจากเมทานอลกับน้ำมันพืชจะได้น้ำมันที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล แต่เมื่อนำมาทดสอบกับเครื่องยนต์พบว่ามีการสะสมตัวของคราบ (ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน) เกาะรอบ ๆ หัวฉีดและวาล์วของเครื่องยนต์ซึ่งเป็นข้อเสียของไบโอดีเซลที่ผลิตด้วยวิธีนี้ (Ma, Clements, & Hanna, 1998)

5.4.2 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน

เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนจากสารประกอบชนิดหนึ่งไปเป็นสารประกอบอื่น ๆ มากกว่าหนึ่งชนิด โดยใช้ความร้อนหรือใช้ความร้อนร่วมกับตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้จะต้องจำกัดปริมาณอากาศหรือออกซิเจนที่ใช้ในกระบวนการด้วย เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการอยู่ที่ประมาณ 450-600 องศาเซลเซียส สารประกอบที่ผ่ากระบวนการไพโรไลซีสจะถูกทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลง ซึ่งกระบวนการนี้ยากที่จะกำหนดหรือควบคุมให้ได้ผลผลิตตามที่ต้องการ เนื่องด้วยความหลากหลายทางปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ วัตถุดิบที่สามารถใช้ในกระบวนการไพโรไลซีส ได้แก่ น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ กรดไขมันธรรมชาติ (Natural fatty acid) (Ma, Clements, & Hanna, 1998)

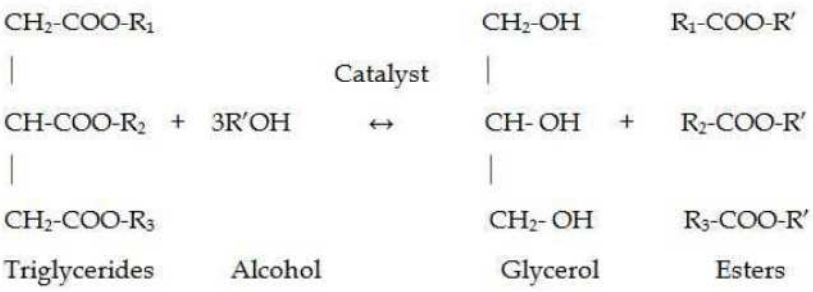
5.4.3 การทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต

กระบวนการนี้เป็นกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งวิธีนี้เป็นการนำเอาน้ำมันมาทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย พร้อมทั้งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม กล่าวคือไม่มีของเสียจากกระบวนการ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะต้องใช้

อุณหภูมิและความดันในระดับค่อนข้างสูงประมาณ 512.2 เคลวิน และ 8.1 เมกะปาสคาล ตามลำดับ เพื่อทำให้เมทานอลอยู่ในสภาวะเหนือวิกฤต (Demirbas, 2005)

5.4.4 การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส เป็นปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างไตรกลีเซอรอลกับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันประกอบด้วยปฏิกิริยาแบบผันกลับ (Reversible reaction) 3 ขั้นตอนย่อย โดยไตรกลีเซอไรด์จะเปลี่ยนไปเป็นไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) และกลีเซอรอล ตามลำดับ โดยในแต่ละปฏิกิริยาย่อยจะได้อัลคิลเอสเทอร์ 1 โมล ออกมา ดังภาพที่ 1 ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมีหลายปัจจัย เช่น ชนิดของแอลกอฮอล์ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ ตัวเร่งปฏิกิริยา อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น (Ma, Clements, & Hanna, 1998)



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์

(ที่มา: Marchetti, Miguel, & Errazu, 2007, p. 1302)

5.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

5.5.1 ปริมาณกรดไขมันอิสระ

น้ำมันที่นำมาใช้สำหรับผลิตไบโอดีเซลจะต้องมีปริมาณกรดไขมันอิสระที่เหมาะสม โดยถ้าใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส น้ำมันที่ใช้จะต้องมีปริมาณกรดไขมันอิสระน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก เนื่องจากถ้าใช้น้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระมาก ก็จะต้องใช้เบสในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อปรับสภาพของกรดไขมันอิสระให้กลายเป็นกลาง และได้ผลิตภัณฑ์ร่วมเป็นสบู่ นอกจากนี้การที่กรดไขมันอิสระทำปฏิกิริยากับเบสกลายเป็นสบู่จะส่งผลให้ความหนืดเพิ่มขึ้น ทำให้แยกกลีเซอรอลออกได้ยากขึ้น และสบู่ที่เกิดขึ้นยังทำให้ประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยาลดลง ถ้าน้ำมัน

ที่ใช้มีปริมาณกรดไขมันอิสระมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะส่งผลให้ได้น้ำมันไบโอดีเซลลดน้อยลงตามไปด้วย แต่ถ้าใช้กรดหรือเอนไซม์หรือการทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหนือจุดวิกฤตของแอลกอฮอล์ พบว่า สามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ปริมาณผลผลิตสูง โดยน้ำมันที่ใช้มีปริมาณกรดไขมันอิสระมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักได้ (Al-Zuhair, Jayaraman, Krishnan, & Chan, 2006; Tan *et al*., 2010)

5.5.2 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้อุณหภูมิสูงจะทำให้ความหนืดของน้ำมันลดลง ทำให้อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้น จึงใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้นลง แต่อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มอุณหภูมิมากเกินไป จะทำให้ปริมาณของไบโอดีเซลลดน้อยลง เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น จะเร่งการเกิดสบู่จากปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน (Saponification reaction) ของน้ำมัน ดังนั้น อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาควรมีค่าที่เหมาะสม และควรต่ำกว่าจุดเดือดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ เพื่อป้องกันแอลกอฮอล์ระเหยออกไป (Eevera, Rajendran, & Saradha, 2009; Leung & Guo, 2006)

5.5.3 เวลาในการทำปฏิกิริยา

อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันขึ้นอยู่กับเวลา โดยในขั้นตอนเริ่ม ต้นของปฏิกิริยาจะเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างช้า เนื่องจากการผสมและการกระจายตัวของแอลกอฮอล์ในน้ำมันยังไม่ดี แต่หลังจากนั้นปฏิกิริยาจะเกิดค่อนข้างเร็ว จากนั้นค่อนข้างจะคงที่ แม้ว่าจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้นก็ตาม (Freedman, Pryde, & Mounts, 1984)

5.5.4 อัตราส่วนระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์

อัตราส่วนระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตไบโอดีเซล จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่า น้ำมัน 1 โมล จะทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ 3 โมล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลคิลเอสเทอร์ 3 โมล และกลีเซอรอล 1 โมล ดังนั้นจึงใช้แอลกอฮอล์ในปริมาณที่มากเกินพอ เพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปข้างหน้าได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งการใช้แอลกอฮอล์ที่มากกว่า 3 โมล จะส่งผลให้เกิดอัลคิลเอสเทอร์ที่สูงขึ้น และให้ค่าผลผลิตสูงสุด โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยลง แต่การใช้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงเกินจุดที่เหมาะสม นอกจากจะไม่ทำให้ปริมาณไบโอดีเซลสูงขึ้นแล้ว ยังทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการแยกแอลกอฮอล์ออก เนื่องจากแอลกอฮอล์มีหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์ (Emulsifier) ทำให้เกิดอิมัลชันขึ้น การแยกชั้นของเอสเทอร์ออกจากน้ำจึงทำได้ยากขึ้น จึงควรเลือกอัตราส่วนระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ให้เหมาะสม ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์ที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันที่ใช้ ชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยา รวมถึงปริมาณของกรด

ไขมันอิสระด้วย โดยถ้าใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะต้องใช้แอลกอฮอล์ในปริมาณที่สูงกว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ปริมาณเท่ากัน (Freedman, Butterfield, & Pryde, 1986; Leung & Guo, 2006)

5.5.5 ชนิดของสารเคมีที่เป็นตัวรับหมู่เอซิล (Acyl acceptor)

สารเคมีหลายชนิดสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิลในการผลิตไบโอดีเซล โดยส่วนใหญ่นิยมใช้แอลกอฮอล์สายสั้น ๆ (Short chain alcohol) เช่น เมทานอล เอทานอล โพรพานอล และบิวทานอล เป็นต้น เมื่อเทียบกับแอลกอฮอล์ชนิดอื่น ๆ เมทานอล และเอทานอลมีราคาถูกที่สุดและสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ในปริมาณมาก ดังนั้นจึงเป็นสารหลักที่นิยมใช้เป็นตัวรับหมู่เอซิลในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเมทานอลและเอทานอล พบว่าเมทานอลมีราคาที่ถูกกว่า มีความบริสุทธิ์สูง และสามารถทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้ว่องไวกว่าเอทานอล (เกษรา ทองบริบูรณ์, 2553) อย่างไรก็ตาม เมทานอลและเมทอกไซด์เป็นสารที่อันตรายมาก ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเนื่องจากเป็นสารที่มีจุดเดือดต่ำจึงเสี่ยงต่อการระเบิด นอกจากนี้เมทานอลส่วนใหญ่ผลิตมาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลจึงไม่สามารถหมุนเวียนได้ ในทางตรงกันข้าม เอทานอลเป็นสารที่มีพิษน้อยกว่าและสามารถหมุนเวียนได้เพราะสามารถผลิตขึ้นจากกระบวนการหมักทางชีวภาพ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นเชื้อเพลิงระหว่างเอทิลเอสเทอร์ ซึ่งใช้เมทานอลเป็นสารตั้งต้น จะมีค่าการระเหย มีจุดหมอกและจุดไหลเทต่ำกว่าเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งใช้เมทานอลเป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตาม สารทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นผลผลิตโดยรวมของปฏิกิริยาจึงขึ้นอยู่กับเร็วในการเร่งปฏิกิริยาและอัตราการเสียสภาพของเอนไซม์ และปริมาณของแอลกอฮอล์ที่เติมลงไปในปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเสถียรทานของเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ ในแอลกอฮอล์ (ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ, 2554)

5.5.6 ตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบ่งออกได้เป็นหลายประเภท ซึ่งจะกล่าวไว้อย่างละเอียดในข้อ 5.6

5.6 ชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

การนำตัวเร่งปฏิกิริยามาใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะช่วยทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีดีขึ้น โดยชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

5.6.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส (Base catalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมมากที่สุดในปัจจุบัน ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาจะละลายอยู่ในเอทานอลหรือเมทานอล จากนั้นจะผสมลงไปในน้ำมัน โดยน้ำมันที่ใช้จะเป็นชนิดใดก็ได้ เช่น น้ำมันดิบ (Crude oil) น้ำมันที่ใช้แล้ว เป็นต้น สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสนี้จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อีกทั้งยังให้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่สูงกว่าด้วย ส่วนข้อจำกัดของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ คือ ถ้ามีน้ำและกรดไขมันอิสระในระบบมากเกินไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง คือ การเกิดสบู่ สบู่ที่เกิดขึ้นนี้จะไปลดประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยา ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นไบโอดีเซลลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลต่อคุณสมบัติของไบโอดีเซล คือ ทำให้ค่าความหนืดสูงขึ้น ทำให้น้ำมันมีลักษณะเป็นเจล และยากต่อการแยกไบโอดีเซลออกจากกลีเซอรอลด้วย และถ้าใช้ปริมาณเบสเพิ่มมากขึ้นถึงแม้ว่าจะสามารถผลิตไบโอดีเซลได้มากขึ้น แต่ถ้าใส่เบสมากเกินไปจะทำให้น้ำมันเกิดปฏิกิริยากับเบสกลายเป็นสบู่ได้มากขึ้นอีก ซึ่งโดยทั่วไปแล้วปริมาณเบสที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถผลิตไบโอดีเซลได้ปริมาณสูง ๆ ไม่ควรเกิน 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมัน (Agarwal, 2007)

5.6.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด (Acid catalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นกรดที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และเฟอริกซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งถ้าเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ตัวเร่งเหล่านี้จะทำให้ได้ไบโอดีเซลในปริมาณมาก แต่ปฏิกิริยาจะดำเนินไปอย่างช้า ๆ อาจใช้เวลาเป็นวัน ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันที่เร่งปฏิกิริยาด้วยตัวเร่งเหล่านี้ คือ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ การใช้แอลกอฮอล์ที่มากเกินพอจะช่วยให้เกิดอัลคิลเอสเทอร์ได้มากขึ้น แต่มีข้อเสียคือกระบวนการแยกกลีเซอรอลออกจะยากขึ้นด้วย ดังนั้นการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะใช้เวลาในการผลิตไบโอดีเซลนานกว่าการใช้เบสและต้องใช้ปริมาณแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนที่สูงกว่าด้วย ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้สามารถใช้ได้ดีกับน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระ และน้ำในปริมาณมาก เช่น น้ำมันที่ผ่านการใช้งานมาแล้ว เป็นต้น (Fukuda, Kondo, & Noda, 2001)

การเร่งปฏิกิริยาด้วยกรดหรือเบสนั้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการล้างเอาตัวเร่งปฏิกิริยาออกจากผลิตภัณฑ์เพื่อทำให้ได้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ ซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นและน้ำเสียที่ปล่อยออกมาจะส่งผลกระทบอย่างมากต่อสิ่งแวดล้อม

5.6.3 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปสถูกใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการต่าง ๆ เช่น ไฮโดรไลซิสของกลีเซอรอล แอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) และแอซิโดไลซิส (Acidolysis) ข้อดีของการใช้เอนไซม์ไลเปสคือ สามารถนำมาตรึงบนตัวรองรับได้ ทำให้สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่ายขึ้น และไบโอดีเซลที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง ไม่จำเป็นต้องมีการล้างตัวเร่งปฏิกิริยาออก นอกจากนี้ยังมีข้อดีในด้านมีความจำเพาะต่อการทำปฏิกิริยาสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ สามารถใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ ทำให้ความว่องไวของตัวเร่งปฏิกิริยายาวนานขึ้นและมีความเสถียรต่อความร้อน แต่มีข้อเสียคือมีราคาค่อนข้างสูง และยังไม่เสถียรในการเร่งปฏิกิริยาเท่าที่ควร (Fukuda *et al*., 2001)

5.6.4 ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ (Heterogeneous catalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับระบบ ได้แก่ เกลือของอัลคาไลน์ที่ไม่มีตัวรองรับ แมกนีเซียม แคลเซียม แบเรียมออกไซด์ – ไฮดรอกไซด์ที่ไม่มีตัวรองรับ ซิงค์ฟอสเฟต โซเดียม โพแทสเซียม ออกไซด์ของโลหะอัลคาไลน์ เกลือไนเตรต เป็นต้น การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะช่วยลดปัญหาการเกิดสบู่ในกระบวนการผลิตได้ ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์สามารถแยกเอาตัวเร่งออกมาได้ง่าย และสามารถนำกลับไปใช้ซ้ำได้ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมค่อนข้างมาก (Jitputti *et al*., 2006)

5.7 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

การผลิตไบโอดีเซลได้มาจากวัตถุดิบหลัก ได้แก่ กลุ่มพืชที่ให้น้ำมัน เช่น ปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ทานตะวัน และเมล็ดเรพ เป็นต้น ไขมันจากสัตว์ และน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว

ปาล์มน้ำมัน เป็นพืชตระกูลปาล์ม เป็นพืชยืนต้นขนาดใหญ่ ลักษณะลำต้นเดี่ยว ลักษณะผลเป็นทะลาย ผลจะเกาะติดกันแน่นจนไม่สามารถสอดนิ้วมือเข้าไปที่ก้านผลได้ ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชเศรษฐกิจมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา เป็นพืชที่ให้ผลผลิต น้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงกว่าพืชน้ำมันทุกชนิด น้ำมันปาล์มประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันที่อิ่มตัวในสัดส่วนที่สมดุล และมีวิตามินอีสูง จึงทำให้น้ำมันปาล์มมีเสถียรภาพสูง โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวส่วนใหญ่ประกอบด้วยไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว คือ กรดโอเลอิก (Oleic acid) 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดไขมันอิ่มตัวประกอบด้วยกรดปาล์มมิติก (Palmitic acid) 44 เปอร์เซ็นต์ และกรดสเตียริก (Stearic acid) 5 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนของน้ำมันดังกล่าวทำให้น้ำมันปาล์มสามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในชีวิตประจำวันของมนุษย์ทั้งด้านการบริโภค เช่น การทำน้ำมันพืช การใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ เช่น ขนมขบ

เคี้ยว บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป นมข้นหวาน ครีมและเนยเทียมหรือใช้ในอุตสาหกรรมอุปโภคอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง พลาสติก และยางรถยนต์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตไบโอดีเซลซึ่งเป็นพลังงานทดแทน เพิ่มความมั่นคงทางด้านพลังงานให้กับประเทศ อีกทั้งยังจะช่วยลดปัญหาผลกระทบทางด้านสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.)

สำหรับพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันจะเหมาะสมกับสภาพอากาศร้อนชื้น ดังนั้น จึงเจริญเติบโตได้ดีในภาคใต้ของไทย โดยบริเวณที่ปลูกมากที่สุด คือ จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูลและตรัง และจากผลตอบแทนที่ดีกว่าพืชชนิดอื่น เช่น ยางพารา และการทำนาข้าว ทำให้เป็นแรงจูงใจที่สำคัญให้เกษตรกรหันมาให้ความสนใจปลูกกันมากขึ้น ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันอื่น ๆ อาทิ บางจังหวัดในภาคอีสาน และภาคเหนือ ปาล์มน้ำมันจึงนับได้ว่าเป็นพืชชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่มีศักยภาพมากที่สุดในการนำมาผลิตไบโอดีเซล เพื่อลดผลกระทบจากปัญหาน้ำมันปิโตรเลียมที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และมีราคาสูงขึ้น และเป็นการช่วยส่งเสริมให้เกษตรกรมีรายได้ที่มั่นคง (สถานวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนจากน้ำมันปาล์มและพืชน้ำมัน, 2007; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร(องค์การมหาชน), ม.ป.ป.; ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, ม.ป.ป.)

5.8 คุณภาพและมาตรฐานของไบโอดีเซล

ปัจจุบัน ไบโอดีเซลได้รับการผลิตขึ้นตามมาตรฐานต่าง ๆ ที่กำหนดขึ้น มาตรฐานที่ได้รับความนิยมในการใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงกันอย่างกว้างขวาง คือ มาตรฐานของสหภาพยุโรป EN14214 (European biodiesel standard) และมาตรฐานของสหรัฐอเมริกา ASTM D6751 (American society for testing and materials) โดยมาตรฐาน EN 14214 กำหนดขึ้นโดยมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อเพลิงไบโอดีเซลที่ผลิตจากเมล็ดเรพและน้ำมันผสมอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเมล็ดเรพ เช่น น้ำมันดอกทานตะวัน ในขณะที่มาตรฐาน ASTM D6751 กำหนดขึ้นโดยพิจารณาเชื้อเพลิงไบโอดีเซลที่ส่วนใหญ่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันประกอบอาหารที่ผ่านการใช้งานแล้ว คุณภาพของไบโอดีเซลขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต สภาวะอากาศในพื้นที่ใช้งาน และประเภทของยานพาหนะ ซึ่งปัจจัยที่แตกต่างกันนี้ทำให้ต้องมีการกำหนดมาตรฐานไบโอดีเซลให้สอดคล้องกันเพื่อตอบสนองความต้องการของท้องตลาด การทดสอบตามมาตรฐานเหล่านี้เป็นกระบวนการสำคัญที่ใช้ในการควบคุมคุณสมบัติของไบโอดีเซลและธุรกิจน้ำมันก่อนการซื้อขายในตลาด ถ้าไบโอดีเซลที่จำหน่าย

ไม่ได้คุณภาพอาจส่งผลกระทบถึงประชาชน สำหรับประเทศไทยการรับรองมาตรฐานการใช้ไบโอดีเซลทั้งระดับชุมชนและพาณิชย์ โดยกรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงานได้กำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซล โดยกรมธุรกิจพลังงานได้ออกมาตรฐานไบโอดีเซลออกเป็น 2 ประเภท โดยมาตรฐานไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน B100 มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตน้ำมันไบโอดีเซล B5 ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป และมาตรฐานไบโอดีเซล B100 มีวัตถุประสงค์อีกอย่างคือเพื่อใช้กับเครื่องยนต์การเกษตร ประเภทเครื่องยนต์ดีเซลสูบเดียว 4 จังหวะ และเพื่อให้ผู้บริโภคแยกความแตกต่างระหว่างไบโอดีเซลเครื่องยนต์การเกษตร และไบโอดีเซลที่ใช้ในเครื่องยนต์จึงได้เติมสีม่วงลงในไบโอดีเซลเครื่องยนต์การเกษตร (พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล, 2552)

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ และน้ำมันที่ใช้แล้วโดยมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล แต่ให้การเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่า เพราะออกซิเจนในไบโอดีเซลทำให้การสันดาปสมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซลปกติ จึงเกิดคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่า โดยไบโอดีเซลไม่มีส่วนประกอบของสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ทำให้ไอเสียที่มาจากเครื่องยนต์ปราศจากมลพิษ จึงช่วยลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฝนกรด โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับน้ำมันดีเซลรวมทั้งการใช้ไบโอดีเซลยังก่อให้เกิดเขม่าคาร์บอนน้อย ช่วยหล่อลื่นเครื่องยนต์ทำให้ยืดอายุการทำงานของเครื่องยนต์ได้ดี นอกจากนี้หากใช้ไบโอดีเซล B100 เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันดีเซลข้อดีต่อสิ่งแวดล้อมคือจะช่วยลดโอกาสที่จะทำให้เกิดการทำลายชั้นโอโซนได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ลดการเกิดก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ลดการเกิดฝุ่นละอองขนาดเล็กลงได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ หากเมื่อใช้ไบโอดีเซลผสมกับน้ำมันดีเซลผลที่มีต่อสิ่งแวดล้อมก็จะลดสัดส่วนตามลงมา (สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน กระทรวงพลังงาน, ม.ป.ป.)

6. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Fuentes, Viseras, Ubiali, Terreni, & Alcantara (2001) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Rhizomucor miehei* และ *Candida cylindracea* ที่ตรึงบนแร่ดินเหนียวในกลุ่ม Phyllosilicates 3 ชนิด (Sepiolite, Palygorskite และ Montmorillonite) แล้วเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ของไลเปสที่ตรึงบนเรซิน (Duolite A-568) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ตรึง ของวัสดุ 4 ชนิด พบว่า Sepiolite และPalygorskite เป็นตัวพยุงที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก

Rhizomucor miehei ในขณะที่ Duolite เหมาะสำหรับใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* เพื่อใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลาย Ethyl formiate

Ranjitha, Karthy, & Mohankumar (2009) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Vibrio fischeri* พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ปริมาณมากที่สุด จากนั้นนำเอนไซม์ไปทำบริสุทธิ์ต่อแล้วศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่า มีกิจกรรมจำเพาะ 121 ยูนิตต่อมิลลิกรัม มีค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 7 ถึง 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส

Tzialla *et al*. (2009) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Candida antarctica* ที่ตรึงบนแร่ดินเหนียว Smectite 3 ชนิด (Laponite, SWy-2 และ Kunipia) พบว่า แร่ดินเหนียว Smectite ทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวพยุงสำหรับเอนไซม์ โดยมีค่า Yields ของเอนไซม์ตรึงอยู่ระหว่าง 80-96 เปอร์เซ็นต์

Scherer *et al*. (2011) ได้ทำการศึกษาตัวพยุงที่มีความเหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของสุกร พบว่า การใช้แร่ดินเหนียว Montmorillonite (KSF) และแร่ดินเหนียว Montmorillonite (Natural) เป็นตัวพยุงเอนไซม์ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ Yields ของเอนไซม์ตรึงเท่ากับ 76.32 และ 52.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการตรึงไลเปสบนแร่ Pillared montmorillonite นั้นแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา Esterification ได้ถึง 515.71 ยูนิตต่อกรัม

Amin, Othman, Radzi, & Rahman (2012) ได้ศึกษาเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Candida rugosa* ที่ตรึงบนแร่ดินเหนียว Montmorillonite ดัดแปลง (Cloisite 30B) พบว่า วัสดุดังกล่าวสามารถบรรจุโปรตีนได้ในปริมาณมาก และช่วยส่งเสริมให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น เมื่อตรึงโดยใช้วิธีดูดซับทางกายภาพ

Kumar, Sharma, Kumar, & Singh (2012) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus pumilus* RK31 โดยทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆ (50, 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์) พบว่า ที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 60 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 123.82 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

Sharma and Kanwar (2012) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* โดยทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวตั้งแต่ 10 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์

Reshmi and Sugunan (2013) ได้ศึกษาเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ที่ตรึงบนแร่ดินเหนียว Montmorillonite 2 วิธี ได้แก่ 1) ทำการดัดแปลงแร่ดินเหนียวโดยใช้ 3-aminopropyl-triethoxysilane และทำการเชื่อมไขว้กับเอนไซม์โดยใช้ Glutaraldehyde 2) วิธีการดูดซับทางกายภาพ พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงโดยใช้วิธีแรกสามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงได้เกือบ 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์อิสระสามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ 20 เปอร์เซ็นต์ หลังการให้ความร้อนเป็นเวลา 120 นาที

Kumar, Joseph, Ramtek, Mani, and Jahan (2011) ทำการแยกเชื้อ *Microbacterium* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากดิน จากนั้นนำ Crude lipase ที่เชื้อผลิตได้ส่วนหนึ่งไปทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และไดอะไลซิส แล้วนำเอนไซม์มาตรึงบนโซเดียมอัลจิเนตเพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในสภาวะต่างๆ โดยใช้น้ำมันสบู่ดำกับเมทานอล และใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า Crude lipase ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้มากที่สุด และเมื่อ Crude lipase มีความเข้มข้นมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเกิดเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่า Crude lipase ทำให้ความเข้มข้นของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ในขณะที่การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 300 มิลลิกรัม สามารถทำให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้มากที่สุด และเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมากกว่า 400 มิลลิกรัม พบว่าการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันลดลง และเมื่อใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอล เท่ากับ 1:6 ทั้ง Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด และที่อุณหภูมิ 5-15 องศาเซลเซียส Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ใกล้เคียงกัน และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 15 องศาเซลเซียส การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปลดลง เมื่อเทียบกับ Crude lipase ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมีความไวต่ออุณหภูมิทำให้เสียสภาพได้ง่ายเมื่ออุณหภูมิสูง

Meng and Salihon (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ Crude lipase สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีที่สุดโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบทำปฏิกิริยากับเมทานอล และใช้ Crude lipase ที่ได้จากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas qeniculata Stenotrophomonas maltophilia* และ *Bacillus pseudomycoides* ที่แยกได้จากดินบริเวณที่ปลูกปาล์มเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า Crude lipase จาก *P. qeniculata* สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด คือ 24 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *S. maltophilia* 21 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย *B. pseudomycoides* 17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีอุณหภูมิ 50-60 องศา

เซลเซียส สามารถทำให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด โดย Crude lipase จาก *P. geniculata* สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. maltophilia* ตามด้วย *B. pseudomycoides* และ Crude lipase จากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด เมื่อใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 และ Crude lipase จากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด เมื่อใช้เอทานอลทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มดิบเทียบกับการใช้เมทานอล

Lui, Huang, Wang, Lee, and Chang (2012) ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia* sp. ที่ตรึงบนอนุภาคแม่เหล็กที่ไม่ชอบน้ำ โดยแยกเชื้อ *Burkholderia* sp. จากเศษอาหาร จากนั้นนำ Crude lipase ที่เชื้อผลิตได้มาตรึงบน Hydrophobic magnetic particles (HMPs) จากนั้นนำมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่สภาวะต่าง ๆ โดยใช้น้ำมันมะกอกทำปฏิกิริยากับเมทานอล พบว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป (HMP-lipase) สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่อคำนึงถึงประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาร่วมกับการใช้พลังงานแล้ว พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม ในขณะที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาไม่แตกต่างกัน เมื่อใช้ความเร็วในการกวน 200-650 รอบต่อนาที ดังนั้นการกวนที่ 200 รอบต่อนาที จึงเป็นทางเลือกที่ดีเนื่องจากประหยัดพลังงาน และเมื่อมีปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 10 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติมเมทานอลความเข้มข้น 13 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็นอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันมะกอก เท่ากับ 4.1) แบบครั้งเดียว สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดโดยพบว่า สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 12 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 43.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Mander *et al*. (2012) ทำการศึกษาเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากเชื้อ *Streptomyces* sp. CS133 พบว่า เอนไซม์ไลเปสมีเสถียรภาพที่ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มที่ไม่มีขั้ว นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จาก *Streptomyces* sp. CS133 ยังมีความคงตัวในสภาวะที่มีเมทานอล โดยสามารถรักษากิจกรรมเอาไว้ได้ 2 ใน 3 ส่วน ภายในเวลา 48 ชั่วโมง โดยเมทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตไบโอดีเซลเมื่อนำเมทานอลมาใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันมะกอก และใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Streptomyces* sp. CS133 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Streptomyces* sp. CS133 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ทั้งในน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันมะกอก โดยพบว่า

สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุดในน้ำมันถั่วเหลืองที่เวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ในน้ำมันมะกอกต้องใช้เวลาอีก 12 ชั่วโมง

Tripathi, Singh, Bharti, and Thakur (2014) ทำการแยกเชื้อ *Microbacterium* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากตะกอนของน้ำเสียและน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อและกระดาษ จากนั้นนำเอนไซม์ที่เชื้อผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและเจลฟิวเตรชัน-โครมาโตกราฟี แล้วนำเอนไซม์มาตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน Celite และถ่าน เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้น้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่าย *Scendesmus* sp. กับเมทานอลโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และเอนไซม์ตรึง (บน Celite และถ่าน) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าได้เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน 75, 90, 95.1 และ 15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Microbacterium* sp. ที่ตรึงบน Celite สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด ในขณะที่เอนไซม์ที่ตรึงบนถ่านสามารถเร่งปฏิกิริยาได้น้อยสุด

Abd-Alla, Bagy, Morsy, and Hassan (2015) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไขมันจากเชื้อรา *Cunninghamella echinulata* และใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากเมล็ดพืชและธัญพืช พบว่ามีแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ASU3 มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA99 เปอร์เซ็นต์ กับ *Bacillus vallismortis* NR_113994 (KP777551) สายพันธุ์ ASU11 มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA97 เปอร์เซ็นต์ กับ *Bacillus tequilensis* NR_104919 (KP777550) สายพันธุ์ ASU16 ซึ่งมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA 100 เปอร์เซ็นต์ กับ *Bacillus amyloliquefaciens* NR_075005 (KP777549) และสายพันธุ์ ASU32 ซึ่งมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA 98 เปอร์เซ็นต์ กับ *B. firmus* NR_112635 (KP777552) จากนั้นนำเอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไขมันจากเชื้อรา *C. echinulata* ทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์และไขมัน เท่ากับ 1:2 พบว่า สายพันธุ์ ASU 32 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้มากที่สุด เท่ากับ 71.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สายพันธุ์ ASU11 ซึ่งสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้ 67.12 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ ASU 32 มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

Sivaramakrishnan and Incharoensakdi (2016) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และความสามารถในการทนตัวต่อทำละลายอินทรีย์ของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการผลิต

เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันของสาหร่าย โดยแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันที่โรงงานผลิตน้ำมัน พบว่า มี 1 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด ซึ่งจำแนกได้เป็น *Bacillus* sp. จากผลการทดสอบทางชีวเคมี จากนั้นนำเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อนี้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้นอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ และ Ion-exchange chromatography จากนั้นนำเอนไซม์มาตรึงบน Celite แล้วนำเอนไซม์ตรึงไปทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้น้ำมันจากสาหร่าย *Botryococcus* sp. 1 กรัม ทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างไขมันและเมทานอล เท่ากับ 1:3, น้ำ 5 ไมโครลิตร และ 1-butanol 0.75 มิลลิลิตร

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

Bacillus sp. BLCD003

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Tryptic Soy Agar

2.2 Production medium

3. วัสดุและอุปกรณ์

3.1 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3 ขวดดูแรน ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.4 หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.5 เข็มเขี่ยเชื้อแบบปลายกลม (Loop)

3.6 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)

3.7 บิวเรต (Buret) ขนาด 25 มิลลิลิตร

3.8 ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5, และ 10 มิลลิลิตร

3.9 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.10 บีกเกอร์ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.11 กระดาษกรอง Whatman No. 1

3.12 กระจกนาฬิกา (Watch glass)

4. เครื่องมือ

4.1 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Autoclave) (SA-300VL, STURDY, ประเทศไต้หวัน)

4.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

4.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น PM6100, ประเทศสวิสแลนด์)

4.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AT200, ประเทศสวิสแลนด์) 5.3

4.5 เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot plate stirrer)

4.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Eppendorf AG 22331, ประเทศเยอรมัน)

4.7 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (BioMérieux DENSIMAT, ประเทศฝรั่งเศส)

4.8 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (Vortex-2Genie รุ่น G560E, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4.9 96-Well microtiter plate (Corning®, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

4.11 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) (B-5410, Termaks, ประเทศนอร์เวย์)

4.12 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus,ประเทศญี่ปุ่น)

4.13 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) (Denver รุ่น UB-10, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4.14 แผ่น Thin layer chromatography ที่เคลือบด้วย siliga gel 60 และ Fluorescent indicator UV_{254} สำเร็จรูป (MACHEREY-NAGEL, ประเทศเยอรมนี)

5. สารเคมี

5.1 น้ำมันปาล์ม

5.2 เมทานอล (CH_3OH) ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์

5.3 เอทานอล (C_2H_6O) ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์

5.4 เทอร์เทียรีบิวทานอล ($C_4H_{10}O$)ความเข้มข้น 99.7 เปอร์เซ็นต์

5.5 ไอโซโพรพานอล (C_3H_8O) ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์

5.6 1-บิวทานอล ($C_4H_{10}O$) ความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์

5.7 เมทิลอะซิเตท ($C_3H_6O_2$) ความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์

5.8 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

5.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5.10 ฟีนอล์ฟทาลีน ($C_{20}H_{14}O_4$)

5.11 ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)

5.12 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

5.13 ไทรบิวไทริน

5.14 4-nitrophenyl palmitate (SIGMA)

5.15 ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)

5.16 เฮกเซน (C_4H_{14}) ความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์

5.17 กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$)

5.18 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5.19 F.A.M.E. mix C8-C24 (SUPELCO)

6. เอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* (35 ยูนิตต่อมิลลิกรัม: SIGMA)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมหัวเชื้อ

1.1 นำโคโลนีเดี่ยวของ Stock เชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาขีดแยกเชื้อลงบนอาหาร Trypticase soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

1.2 นำเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งที่ได้มาแขวนลอยใน 100 มิลลิโมลาร์ Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0

2. การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.1 นำหัวเชื้อที่เตรียมดังแสดงในข้อ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2 บ่มบนเครื่องเขย่า (Incubator shaker) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.3 ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังแสดงในข้อ 4

3. การตรึงเอนไซม์ไลเปส

3.1 นำแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์มาใช้ในการศึกษาการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี Physical adsorption โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ต่อแร่มอนท์มอริลโลไนต์เท่ากับ 5:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และใช้อัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ต่อแร่เวอร์มิคูไลท์เท่ากับ 3:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก

3.2 กวนส่วนผสมของเอนไซม์และแร่ดินด้วย Magnetic stirrer ตลอดเวลาบนถาดน้ำแข็ง เก็บแร่มอนท์มอริลโลไนท์ที่เวลา 90 นาที และเก็บแร่เวอร์มิคูไลท์ที่เวลา 30 นาทีโดยกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 ทำให้แห้งในโถดูดความชื้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ดังแสดงในข้อ 4.2

3.3 นำแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์ทั้งก่อนและหลังการตรึงรูปกับเอนไซม์ไปถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4. วิธีการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจาก Teng & Xu, 2007)

4.1 วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์อิสระ

4.1.1 ปิเปตสารละลาย *p*-nitrophenyl palmitate (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน *n*-heptane) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microtiter plate

4.1.2 ปิเปตเอนไซม์ 20 ไมโครลิตรลงในหลุมที่มี *p*-nitrophenyl palmitate

4.1.3 ปิเปตเอทานอล (ความเข้มข้น 1 โมลาร์) ปริมาตร 12 ไมโครลิตรลงในหลุม เดิมบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.1.4 ปิเปตส่วนใส 100 ไมโครลิตรลงในหลุมใหม่

4.1.5 ปิเปต NaOH ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม

4.1.6 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

หมายเหตุ: ใช้สารละลาย *p*-nitrophenyl palmitate เป็น Blank และใช้อาหาร Production Medium ทำปฏิกิริยาในชุดควบคุม

4.2 วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตรึง

4.2.1 ชั่งส่วนของแข็ง (แร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์) ที่ผ่านการตรึงเอนไซม์มา 0.02 กรัม ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์

4.2.2 ปิเปตสารละลาย *p*-nitrophenyl palmitate (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน *n*-heptane) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ชั่งเอนไซม์ตรึงรูปไว้

4.2.3 ปิเปตเอทานอล (ความเข้มข้น 1 โมลาร์) ปริมาตร 12 ไมโครลิตร ลงในหลอดเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.2.4 ปิเปตส่วนใส 100 ไมโครลิตรลงใน 96-well microtiter plate

4.2.5 ปิเปต NaOH ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลุม

4.2.6 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

หมายเหตุ: ใช้สารละลาย *p*-nitrophenyl palmitate เป็น Blank และใช้แร่ที่ไม่ผ่านการตรึงเอนไซม์ ทำปฏิกิริยาในชุดควบคุม

วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง-ชุดควบคุม}\div\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน4-nitrophenol})\ (\text{ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}) \times \text{ปริมาตรทั้งหมดของสารละลาย(มิลลิลิตร)}}{\text{เวลา (นาที)} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)} \times \text{มวลโมเลกุลของ 4-nitrophenol (139.11 กรัมต่อโมล)}}$$

วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึง (ยูนิตต่อกรัม)

กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัม)

$$= \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง-ชุดควบคุม÷ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน4-nitrophenol) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) x ปริมาตรทั้งหมดของสารละลาย(มิลลิลิตร)}}{\text{เวลา (นาที) xน้ำหนักของเอนไซม์ตรึง (กรัม) x มวลโมเลกุลของ 4-nitrophenol (139.11 กรัมต่อโมล)}}$$

โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปล่อย 4-nitrophenol 1.0 ไมโครโมล จาก 4-nitrophenyl palmitateในเวลา 1 นาที

5. การศึกษาปัจจัยที่ผลมีต่อกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ดัดแปลงจาก Kumar *et al.*, 2011; Bueso, Moreno, Cedeño, & Manzanarez, 2015)

5.1 ชนิดของสารเคมีที่เป็นตัวรับหมู่เอซิลในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

5.1.1 เติมน้ำมันปาล์ม 20 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

5.1.2 เติมเมทานอลปริมาตร 2.87 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3) ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์ม

5.1.3 เติม Crude enzyme ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปปริมาณ 5 กรัม (คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม)

5.1.4 ดำเนินปฏิกิริยาในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.5 ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแยกชั้น

5.1.6 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงในข้อ 7

5.1.7 ทำการทดลองตั้งแต่ข้อ 5.1.1-5.1.6 ซ้ำ โดยทดสอบกับสารเคมีชนิดอื่น ๆ แทนเมทานอล ได้แก่ เอทานอล ปริมาตร 4.14 มิลลิลิตร ไอโซโพรพานอลปริมาตร 5.42 มิลลิลิตร เทอร์เทียรีบิวทานอล ปริมาตร 6.74 มิลลิลิตร 1-บิวทานอล ปริมาตร 6.49 มิลลิลิตร และเมทิลอะซิเตทปริมาตร 5.62 มิลลิลิตร (อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อสารเคมี เท่ากับ 1:3)

5.2 อัตราส่วนระหว่างน้ำมันปาล์มต่อแอลกอฮอล์

5.2.1 เติมน้ำมันปาล์ม 20 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

5.2.2 เติมเมทานอล ปริมาตร 2.87, 3.83, 4.79, 5.73, 9.56 และ 19.13 มิลลิลิตร (อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:10 และ1:20 ตามลำดับ) ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์ม

5.2.3 เติม Crude enzyme ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปปริมาณ 5 กรัม (คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม)

5.2.4 ดำเนินปฏิกิริยาในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.5 ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแยกชั้น

5.2.6 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์ หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงในข้อ 7

5.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์

5.3.1 เติมน้ำมันปาล์ม 20 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

5.3.2 เติมเมทานอลโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์ม

5.3.3 เติม Crude enzyme ปริมาตร 5, 10, 15 และ 20 มิลลิลิตร (คิดเป็น 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม) หรือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปปริมาณ 5, 10, 20 และ 50 กรัม (คิดเป็น 25, 50, 100 และ 250 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม)

5.3.4 ดำเนินปฏิกิริยาในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3.5 ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแยกชั้น

5.3.6 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงในข้อ 7

5.4 อุณหภูมิ

5.4.1 เติมน้ำมันปาล์ม 20 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

5.4.2 เติมเมทานอลปริมาตร 2.87 มิลลิลิตร (อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3) ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์ม

5.4.3 เติม Crude enzyme ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม) หรือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปปริมาณ 50 กรัม (คิดเป็น 250 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม)

5.4.4 ดำเนินปฏิกิริยาในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 30, 37, และ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.4.5 ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแยกชั้น

5.4.6 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงในข้อ 7

5.5 ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา

5.5.1 เติมน้ำมันปาล์ม 20 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

5.5.2 เติมเมทานอล ปริมาตร 2.87 มิลลิลิตร (อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3) ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์ม

5.5.3 เติม Crude enzyme ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม) หรือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปปริมาณ 50 กรัม (คิดเป็น 250 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม)

5.5.4 ดำเนินปฏิกิริยาในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8, 16, 24, 32, 40 และ 48 ชั่วโมง

5.5.5 ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแยกชั้น

5.5.6 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงในข้อ 7

6. การเตรียมไบโอดีเซลเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีไตเตรทและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีและวิธี HPLC

6.1 การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

6.1.1 เติมน้ำมันปาล์ม 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

6.1.2 เติมเมทานอลปริมาตร 2.87 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3) ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์ม

6.1.3 เติมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปปริมาณ 50 กรัม ลงไป

6.1.4 ทำปฏิกิริยาในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaker incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.1.5 ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแยกชั้น

6.1.6 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีไตเตรทและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีทินเลเยอร์-โครมาโตกราฟีและวิธี HPLC ดังแสดงในข้อ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

6.1.7 เตรียมชุดควบคุม โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 6.1.1 - 6.1.2 แล้วเติมแร่มอนท์มอริลโลไนท์หรือแร่เวอร์มิคูไลท์ที่ไม่ได้นำไปใช้ตรึงเอนไซม์ปริมาณ 50 กรัม ดำเนินปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันเช่นเดียวกับ ข้อ 6.1.4 – 6.1.5 และนำสารละลายที่ได้หลังจากการดำเนินปฏิกิริยาไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 6.1.6

6.2 การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ Crude lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ธัญเรศ อุปนิ, 2558)

6.2.1 เติมน้ำมันปาล์ม 40 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

6.2.2 เติมเมทานอลปริมาตร 5.74 มิลลิลิตร (ใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3) ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์ม

6.2.3 เติม Crude lipase ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม)

6.2.4 ดำเนินปฏิกิริยาในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.2.5 ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแยกชั้น

6.2.6 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีไตเตรทและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีทินเลเยอร์-โครมาโตกราฟีและวิธี HPLC ดังแสดงในข้อ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

6.2.7 เตรียมชุดควบคุม โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 6.2.1 - 6.2.2 แล้วเติม Production medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ดำเนินปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันเช่นเดียวกับข้อ 6.2.4 - 6.2.5 และนำสารละลายที่ได้หลังจากการดำเนินปฏิกิริยาไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 6.2.6

6.3 การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

6.3.1 เติมน้ำมันปาล์ม 0.2 กรัม ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6.3.2 เติมเอทานอลปริมาตร 56 ไมโครลิตร (ใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:4) ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์ม

6.3.3 เติมเอนไซม์ทางการค้า 0.02 กรัม (คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม) ที่ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 500 ไมโครลิตร

6.3.4 ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex)

6.3.4 ดำเนินปฏิกิริยาในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

6.3.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6.3.6 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธี TLCและวิธี HPLC ดังแสดงในข้อ 8 และ 9 ตามลำดับ

6.4 การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

6.4.1 การเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมกับเมทานอล

6.4.1.1 ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.26 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร

6.4.1.2 เติมเมทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic stir bar) ลงในบีกเกอร์

6.4.1.3 นำบีกเกอร์ไปวางบน Hot plate stirrer กวนด้วนแท่งแม่เหล็กกวนสารจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

6.4.2 การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

6.4.2.1 เติมน้ำมันปาล์ม 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ตามด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร แล้วนำไปวางบน Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

6.4.2.2 เมื่อน้ำมันปาล์มมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสแล้ว เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ผสมกับเมทานอล ที่เตรียมได้จากข้อ 5.4.1 ลงไปผสมกับน้ำมันปาล์มทีละเล็กน้อย

6.4.2.3 กวนด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

6.4.2.4 ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สารแยกชั้น

6.4.2.5 นำส่วนใสชั้นบนไปวิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีไตเตรทและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีทินเลเยอร์-โครมาโตกราฟีและวิธี HPLC ดังแสดงในข้อ 8 และ 9 ตามลำดับ

7. การวิเคราะห์การผลิตเมทิลเอสเทอร์ (ดัดแปลงจาก Kumar *et al*., 2011)

7.1 ปิเปตสารละลายที่ได้จากการทดลองข้อ 5, 6.1.6, 6.1.7, 6.2.6 และ 6.2.7 ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขวดละ 5 มิลลิลิตร

7.2 เติมเอทานอลบริสุทธิ์ (Absolute ethanol) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

7.3 เติมฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด (หยดฟีนอล์ฟทาลีนลงไปในชุดควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ด้วยเช่นกัน)

7.4 ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากใสไม่สีเป็นสีชมพูอ่อน และบันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

7.5 คำนวณหาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ (%Conversion of methyl ester) จากสูตร ดังต่อไปนี้

วิธีการคำนวณร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์

ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์

$$= \frac{\text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในชุดควบคุม (มิลลิลิตร)} - \text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในชุดทดลอง (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในชุดควบคุม (มิลลิลิตร)}} \text{ X } 100$$

8. การวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin layer chromatography) (ดัดแปลงจาก Kumar *et al*., 2011)

8.1 การเตรียมแผ่น Thin layer chromatography (TLC)

8.1.1 ตัดแผ่น TLC สำเร็จรูปขนาด 20x20 เซนติเมตร ซึ่งเป็นแผ่นอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 (Silica gel 60) ให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ จากนั้นวัดระยะจากขอบด้านล่าง 0.5 เซนติเมตร แล้วขีดเส้นเพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการจุดสาร (Spot) ในข้อต่อไป และวัดระยะจากขอบด้านบนลงมา 0.5 เซนติเมตร แล้วขีดเส้นเพื่อเป็นการกำหนดจุดสิ้นสุดในการเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่

8.2 การจุดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC

8.2.1 ใช้หลอดแคปิลลารี่ (Capillary tube) ดูดสารตัวอย่างที่ได้จากชุดทดสอบในข้อ 6.1.6 และ 6.2.6 ชุดควบคุมผลบวกในข้อ 6.3.6 และ 6.4.2.5 ชุดควบคุมผลลบในข้อ 6.1.7, 6.2.7 และน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน จุดลงบนแผ่น TLC ตามตำแหน่งที่ทำเครื่องหมาย โดยจุดให้ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างห่างกัน 1 เซนติเมตร

8.2.2 วางทิ้งไว้ให้สารตัวอย่างแห้ง

8.3 การแยกสารบนแผ่น TLC

8.3.1 นำแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ในข้อ 8.2 มาวางในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (ประกอบด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 90:10:1) โดยวางแผ่น TLC ให้ตำแหน่งที่มีจุดตัวอย่างอยู่เหนือวัฏภาคเคลื่อนที่และมีกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 1 แผ่นวางติดกับผนังด้านในของบีกเกอร์ให้กระดาษกรองชุ่มไปด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่

8.3.2 ปิดฝาบีกเกอร์โดยใช้กระจกนาฬิกาเพื่อให้ภายในบีกเกอร์อิ่มตัวไปด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่จะทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น

8.4 การตรวจดูตำแหน่งของสารที่แยกได้บนแผ่น TLC

8.4.1 นำแผ่น TLC จากข้อ 8.3 มาส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ตำแหน่งที่มีสารต่าง ๆ จะปรากฏเป็นจุดสีดำอยู่บนแผ่น TLC

8.4.2 คำนวณหาค่า Retention factor (R_f) จากสมการ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}$$

9. การวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (ดัดแปลงจาก Carvalho, Menbonco, Pinho, Resck, & Suarez, 2012)

นำตัวอย่างที่ได้จากชุดทดสอบในข้อ 6.1.6 และ 6.2.6 ชุดควบคุมผลบวกในข้อ 6.3.6 และ 6.4.2.5 ชุดควบคุมผลลบในข้อ 6.1.7, 6.2.7 และน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC โดยมี F.A.M.E. mix C8-C24 เป็นสารมาตรฐาน ใช้คอลัมน์ Luna 250 x 4.6 mm (C18, 100A) ใช้อะซิโตไนไตรล์เป็น Mobile phase ใช้ Flow rate เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจสอบการแยกสารที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

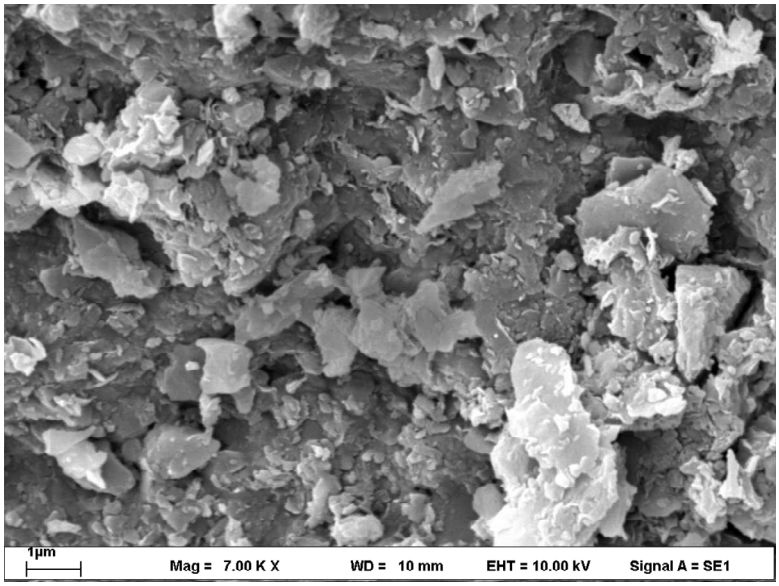
จากการนำเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 ที่เก็บในอาหาร Tryptic Soy Broth ที่เติมกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ มาฟื้นเชื้อโดยใช้อาหาร Tryptic Soy Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหาร Production medium ที่เติมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เชื้อผลิตเอนไซม์ไลเปส หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นำ Crude enzyme ที่ได้ไปวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ 4-nitrophenyl palmitate เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.87 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำ Crude lipase ที่ได้จาก BLCD003 ไปทำการตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์โดยใช้วิธีดูดซับทางกายภาพ โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ต่อแร่มอนท์มอริลโลไนต์เท่ากับ 5:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก และใช้อัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ต่อแร่เวอร์มิคูไลท์เท่ากับ 3:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก พบว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 0.13 ± 0.08 ยูนิตต่อกรัม ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่เวอร์มิคูไลท์ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ จากผลดังกล่าวจึงได้นำ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ไปใช้ในการศึกษาในลำดับถัดไป

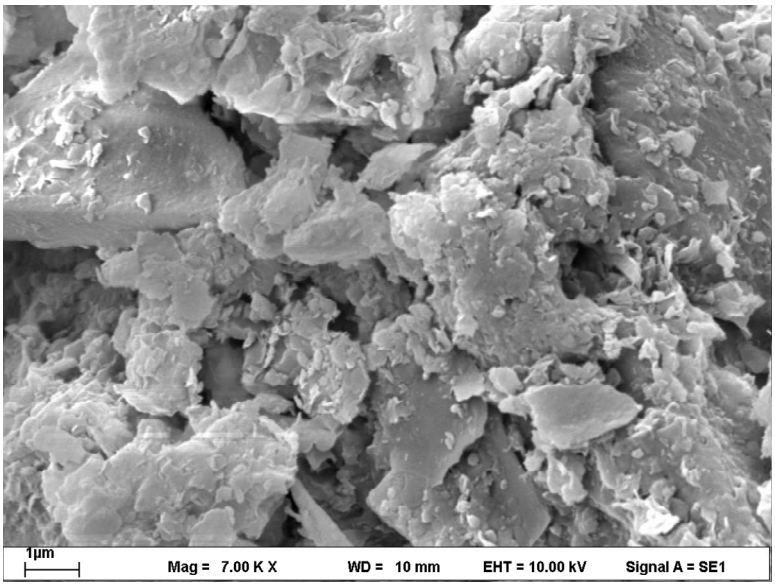
2. ลักษณะทางกายภาพของแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์

เมื่อนำแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์ทั้งก่อนและหลังการตรึงรูปกับเอนไซม์ไลเปสไปตรวจดูลักษณะโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าแร่ทั้งสองชนิดระหว่างแร่ที่ไม่ได้ตรึงเอนไซม์และหลังจากที่ตรึงเอนไซม์แล้วมีลักษณะพื้นผิวที่ไม่แตกต่างกัน **(ภาพที่ 2 และ 3)** โดยแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีพื้นผิวขรุขระ มีความลึกหลายระดับ **(ภาพที่ 2)** ในขณะที่พื้นผิวด้านข้างของแร่เวอร์มิคูไลท์มีลักษณะเป็นแผ่นบางซ้อนกันหลายชั้นและมีช่องว่างคั่นระหว่างชั้น **(ภาพที่ 3)**

(A)

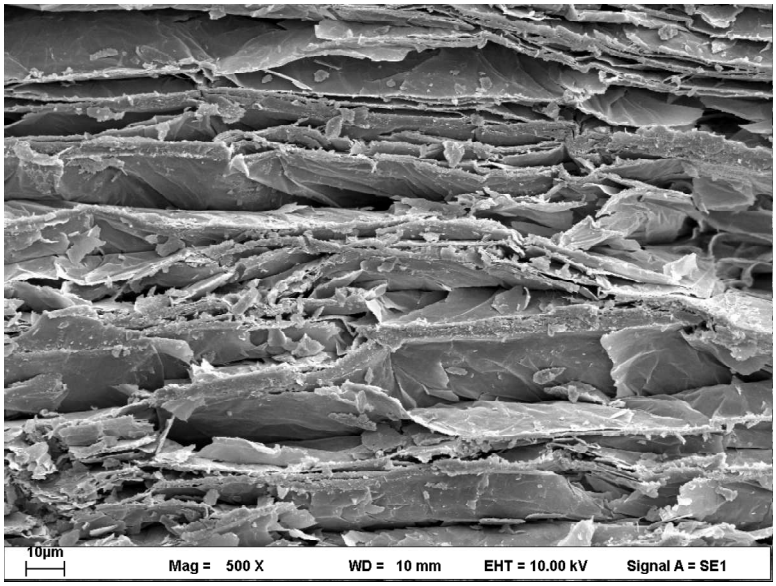


(B)

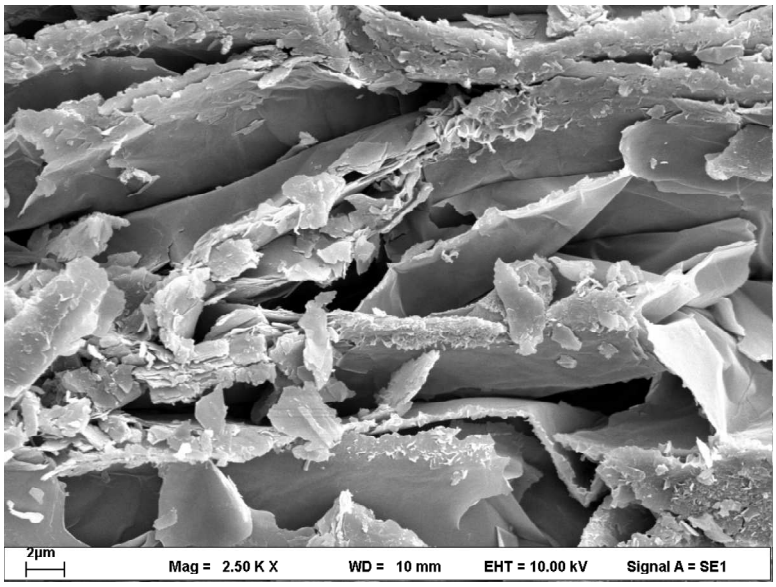


ภาพที่ 2 ภาพถ่าย SEM แสดงพื้นผิวของแร่มอนท์มอริลโลไนท์ (A) ก่อน และ (B) หลังการตรึงเอนไซม์ไลเปส (กำลังขยาย 7000X)

(A)



(B)



ภาพที่ 3 ภาพถ่าย SEM แสดงพื้นผิวของแร่เวอร์มิคูไลท์ (A) ก่อน และ (B) หลังการตรึงเอนไซม์ไลเปส (กำลังขยาย 2500X)

3. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

3.1 ชนิดของสารเคมีที่เป็นตัวรับหมู่เอซิลในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ในการทดลองนี้ใช้น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับสารเคมี 6 ชนิด คือ เมทานอล

เอทานอล 2-methyl propanol ไอโซโพรพานอล 1-บิวทานอล และเมทธิลอะซิเตท ในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 โดยใช้ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้ววิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีการไตเตรท พบว่าตัวอย่างที่ใช้น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด เท่ากับ 12.82 ± 4.44 และ 8.13 ± 2.26 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้เอทานอลในปฏิกิริยาที่ใช้ Crude lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบ ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 10.53 ± 4.56 ในขณะที่เมื่อใช้สารเคมีชนิดอื่นๆ พบว่าไม่มีเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่ใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่ง ดังแสดงใน**ตารางที่ 1**

จากผลที่อธิบายไว้ข้างต้นจึงได้เลือกเมทานอลไปใช้ในการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำมันปาล์มต่อแอลกอฮอล์ในลำดับถัดไป

ตารางที่ 1 ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับสารเคมีชนิดต่าง ๆ โดยใช้ Crude lipase และ ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ชนิดของสารเคมี	**%**Conversion of methyl ester เมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้	
	Crude lipase	ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์
Methanol	12.82 ± 4.44	8.13 ± 2.26
Ethanol	10.53 ± 4.56	0.00
1-butanol	0.00	0.00
2-propanol	0.00	0.00
tert-Butanol	0.00	0.00
Methyl acetate	0.00	0.00

หมายเหตุ ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

3.2 อัตราส่วนระหว่างน้ำมันปาล์มต่อแอลกอฮอล์

ในการทดลองนี้ใช้น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:10 โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้ววิเคราะห์ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีการไตเตรท พบว่าตัวอย่างที่ใช้น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 เมื่อใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด คือ 9.52±4.12 และ 8.65 ± 3.01 ตามลำดับ ในขณะที่การใช้อัตราส่วนอื่น ๆ ไม่พบการเกิดเมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงใน**ตารางที่ 2**

จากผลที่อธิบายไว้ข้างต้นจึงได้เลือกเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 ไปใช้ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ในลำดับถัดไป

ตารางที่ 2 ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลในอัตราส่วนต่าง ๆ โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล	**%**Conversion of methyl ester เมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้	
	Crude lipase	ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์
1:3	9.52 ± 4.12	8.65 ± 3.01
1:4	0.00	0.00
1:5	0.00	0.00
1:6	0.00	0.00
1:10	0.00	0.00

หมายเหตุ ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

3.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์

การทดลองนี้ใช้น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้ววิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีการไตเตรท พบว่าตัวอย่างที่ใช้ Crude lipase ความ

เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด คือ 13.89±4.81 ในขณะที่การใช้ Crude lipase ความเข้มข้นอื่น ๆ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 11.11 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ตัวอย่างที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด เท่ากับ 10.09 ± 3.62 ดังแสดงใน**ตารางที่ 3**

จากผลที่อธิบายไว้ข้างต้นจึงได้เลือก Crude lipase ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์ ไปใช้ในการศึกษาผลของอุณหภูมิในลำดับถัดไป

ตารางที่ 3 ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ 1:3 โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์)	**%**Conversion of methyl ester เมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้	
	Crude lipase	ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์
25	11.11 ± 4.81	8.68 ± 2.12
50	13.89 ± 4.81	8.42 ± 2.89
75	11.11 ± 9.62	n.d.
100	11.11 ± 9.62	8.27 ± 3.35
250	n.d.	10.09 ± 3.62

หมายเหตุ ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

n.d. หมายถึง ไม่มีข้อมูล เนื่องจากไม่ได้วิเคราะห์ตัวอย่างที่ความเข้มข้นนั้นๆ

3.4 อุณหภูมิ

จากการใช้ Crude lipase ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์ ในการเร่งปฏิกิริยา โดยมีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีการไตเตรท พบว่

ตัวอย่างที่ใช้ Crude lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด คือ 8.82 ± 5.09 รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และตัวอย่างที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกัน โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด เท่ากับ 9.14 ± 4.11 ดังแสดงใน**ตารางที่ 4**

จากผลที่อธิบายไว้ข้างต้นจึงได้เลือกอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไปใช้ในการศึกษาผลของระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาเป็นลำดับถัดไป

ตารางที่ 4 ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:3 โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

อุณหภูมิ	**%**Conversion of methyl ester เมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้	
	Crude lipase	ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์
30 °C	5.88 ± 5.09	7.30 ± 3.93
37 °C	8.82 ± 5.09	9.14 ± 4.11
45 °C	2.15 ± 1.86	8.05 ± 3.54

หมายเหตุ ดำเนินปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง

3.5 ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา

จากการใช้ Crude lipase ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์ ในการเร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8, 16, 24, 32, 40 และ 48 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีการไตเตรท พบว่าเมื่อใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ในการเร่งปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด คือ 9.09 และ 8.79 ± 2.36 ตามลำดับ และเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ในการเร่งปฏิกิริยาเป็นเวลานานขึ้น พบว่า มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ลดลงแต่ก็มีค่าใกล้เคียงกันตั้งแต่ 32-48 ชั่วโมง ดังแสดงใน**ตารางที่ 5**

ตารางที่ 5 ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

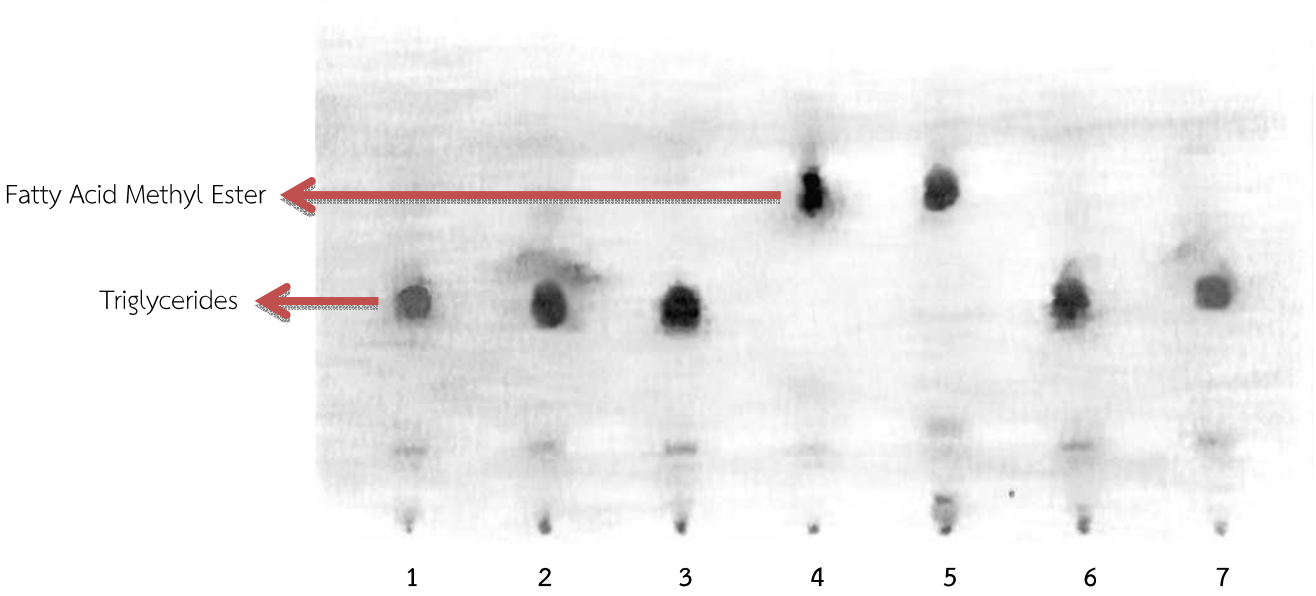
ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	%Conversion of methyl ester เมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้	
	Crude lipase	ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์
8	1.96 ± 1.70	0.00
16	6.06 ± 5.25	3.27 ± 1.56
24	9.09 ± 0.00	8.79 ± 2.36
32	2.15 ± 1.86	6.11 ± 3.52
40	6.45 ± 5.59	6.65 ± 2.35
48	1.96 ± 1.70	5.34 ± 3.67

หมายเหตุ ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

4. การวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

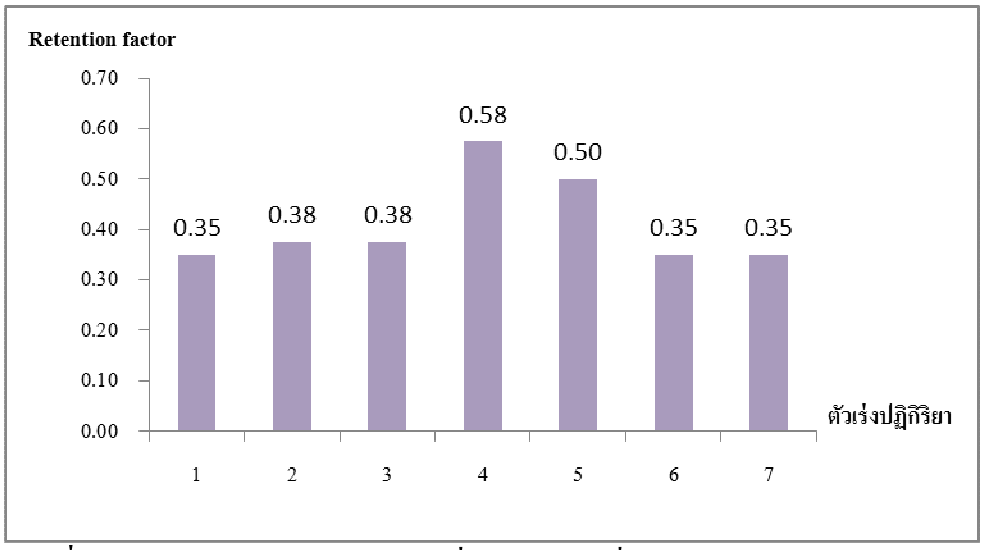
เนื่องจากสภาวะที่ Crude lipase สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีที่สุด คือ ใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 ใช้ Crude lipase ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสภาวะที่เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีที่สุด คือ การใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์ ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงได้เตรียมปฏิกิริยาตามสภาวะดังกล่าว แล้วนำผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี เทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าในชุดทดสอบที่ใช้น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์และใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบตำแหน่งของสารที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.35 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า R_f ของสารในชุดควบคุมที่เป็นน้ำมันปาล์มผสมกับเมทานอลและไม่ได้เติมตัวเร่งปฏิกิริยา (R_f= 0.38) และใกล้เคียงกับค่า R_f ของสารในชุดควบคุมที่เป็นน้ำมันปาล์มซึ่งเป็น

สับเสตรทของปฏิกิริยา (R_f= 0.35) แต่มีค่า R_f แตกต่างจากสารที่ตรวจพบเมื่อใช้เอนไซม์ทางค้าและโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยพบว่าค่า R_f ของสารที่ใช้เอนไซม์ทางการค้าและโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีค่าใกล้เคียงกัน (ค่า R_f เท่ากับ 0.50 และ 0.58 ตามลำดับ) **(ภาพที่ 5)** แสดงว่าสารที่ได้จากการใช้เอนไซม์ทางค้าและโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นสารชนิดเดียวกัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงใน**ภาพที่ 4 และ 5** และแสดงว่า Crude lipase อาจมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาได้ไม่ดี จึงสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ได้ในปริมาณที่น้อยมากจนทำให้ตรวจไม่พบเมทิลเอสเทอร์จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี Thin layer chromatography

หมายเหตุ (1) คือ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์; (2) คือ น้ำมันปาล์มผสมกับเมทานอลและใช้ production medium แทน crude lipase; (3) คือ น้ำมันปาล์มผสมกับเมทานอลและใช้ แร่มอนท์มอริลโลไนท์ที่ไม่ได้ตรึงรูป; (4) คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา; (5) คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา; (6) คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้ Crude lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา; (7) คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 5 ค่า Retention factors ของสารที่มีในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี Thin layer chromatography

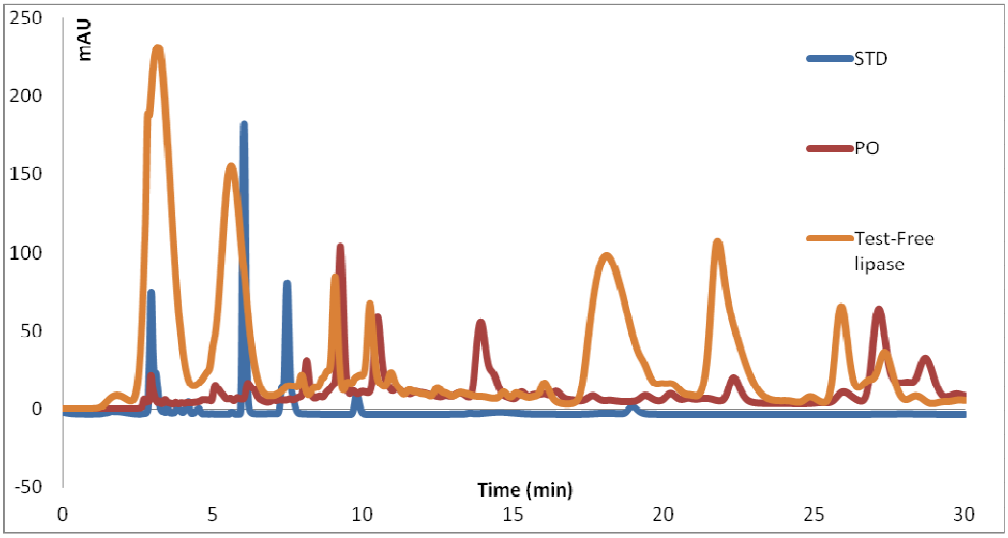
หมายเหตุ (1) คือ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์; (2) คือ น้ำมันปาล์มผสมกับเมทานอลและใช้ production medium แทน crude lipase; (3) คือ น้ำมันปาล์มผสมกับเมทานอลและใช้ แร่มอนท์มอริลโลไนท์ที่ไม่ได้ตรึงรูป; (4) คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา; (5) คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา; (6) คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้ Crude lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา; (7) คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

4. การวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิเคราะห์ HPLC

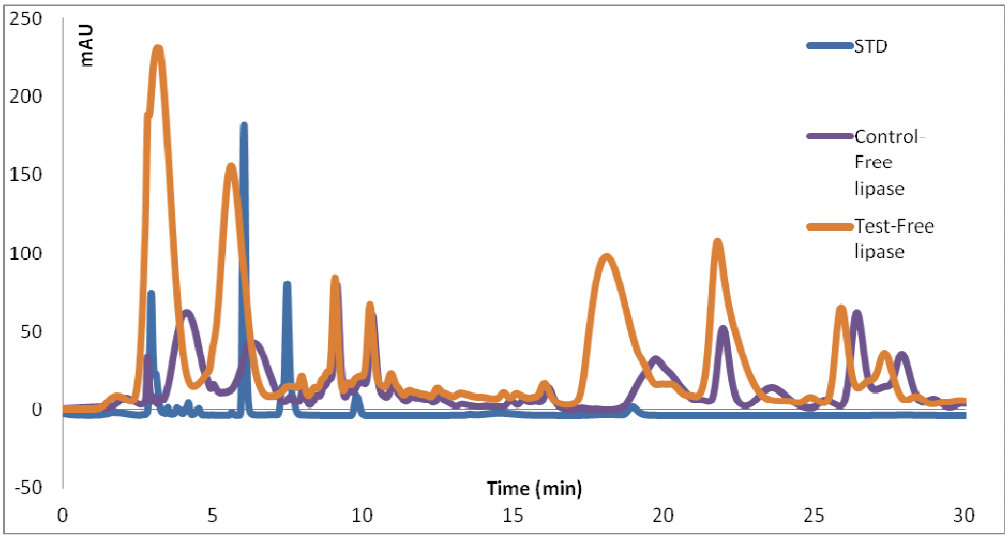
เพื่อยืนยันผลการผลิตเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จึงได้นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากชุดทดสอบและชุดควบคุมซึ่งเป็นตัวอย่างชุดเดียวกันกับที่นำไปวิเคราะห์โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่มีความไวสูงกว่าวิธี TLC พบว่ามีผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ถูกสร้างขึ้นในชุดทดสอบที่เร่งปฏิกิริยาโดยใช้ Crude lipase และในชุดทดสอบที่เร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ เนื่องจากมีรูปแบบของ peaks ที่ปรากฏในชุดทดสอบทั้งสองชุดแตกต่างจากรูปแบบของ peaks ที่ปรากฏในตัวอย่างน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาในบางตำแหน่ง **(ภาพที่ 6A และ 7A)** และแตกต่างจากรูปแบบของ peaks ที่ปรากฏในชุดควบคุมผลลบในบางตำแหน่ง **(ภาพที่ 6B และ 7B)** อย่างไรก็ตาม จากผลโครมาโตแกรมทั้งหมดที่แสดง ยังไม่สามารถจำแนกได้ว่า peaks ที่ปรากฏใน

ชุดทดสอบเป็นเมทิล เอสเทอร์ของกรดไขมันชนิดใด เนื่องจากค่า retention times ไม่ตรงกับค่า retention times ที่พบใน F.A.M.E. mix (C8-C24) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน **(ภาพที่ 6 และ 7)**

(A)

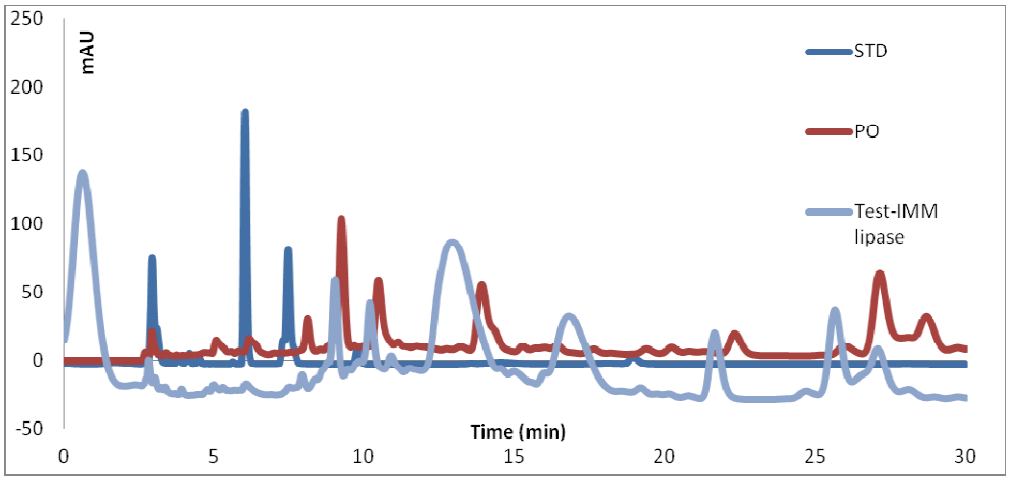


(B)

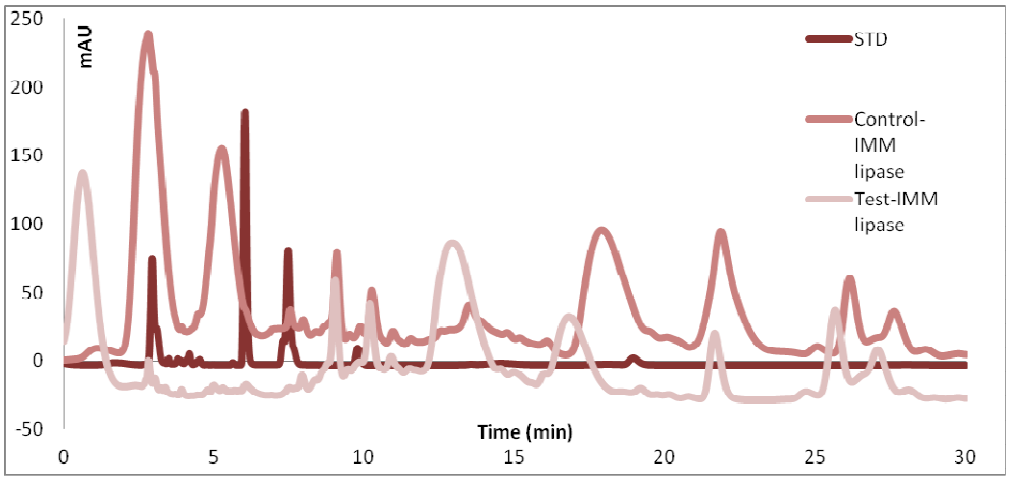


ภาพที่ 6 โครมาโตแกรมของสารที่อยู่ในชุดทดสอบที่ใช้ Crude lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Test-Free lipase) เปรียบเทียบกับ F.A.M.E. mix (C8-C24) (STD และ **(A)** น้ำมันปาล์ม (PO) หรือ **(B)** ชุดควบคุมผลลบ (Control-Free lipase)

(A)



(B)



ภาพที่ 7 โครมาโตแกรมของสารที่อยู่ในชุดทดสอบที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่-มอนท์มอริลโลไนท์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Test-Imm lipase) เปรียบเทียบกับ F.A.M.E. mix (C8-C24) (STD) และ **(A)** น้ำมันปาล์ม (PO) หรือ **(B)** ชุดควบคุมผลลบ (Control-IMM lipase)

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธีการไตเตรท พบว่า สภาวะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีที่สุด คือ การใช้น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอล (อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ Crude lipase ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ หรือเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า Crude lipase เมื่อเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงและใช้เวลาในการดำเนินปฏิกิริยานานขึ้น จากนั้นเมื่อนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาดังกล่าวไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC เทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. cepacia* และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ไม่พบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์จากการใช้ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 หรือใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองรูปแบบสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ แต่อาจมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นน้อยมากจนทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี TLC อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยวิธี HPLC พบว่ามีผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่ง แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้

อภิปรายผลการทดลอง

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการศึกษานี้ได้ใช้ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมาเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันโดยมี 4-nitrophenyl palmitate ทำหน้าที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไลเปส และมีเอทานอลทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิล แล้วได้ 4-nitrophenol เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่ง 4-nitrophenol สามารถดูดกลืนแสงได้ค่าความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทำให้สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ (Teng & Xu, 2007) Crude lipase ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีกิจกรรมเท่ากับ 0.87 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อนำ Crude lipase ไปตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์ด้วยวิธี Physical adsorption ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ต้องมีการปรับหรือกระตุ้นสารพยุงก่อนตรึงจึงไม่

จำเป็นต้องใช้สารเคมีเข้าช่วย ทำให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์ หรือมีผลต่อการทำลายบริเวณเร่งน้อยมากหรืออาจไม่เกิดขึ้นเลย (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556) พบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีกิจกรรม 0.13 ± 0.08 ยูนิตต่อกรัม ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่เวอร์มิคูไลท์ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ การที่เอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมค่อนข้างน้อยหรือไม่มีกิจกรรมเลยนั้น อาจเป็นผลมาจากการที่โมเลกุลเอนไซม์ยึดเกาะกับแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์ด้วยพันธะอย่างอ่อน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน แรง van der Waals และ Hydrophobic interaction จึงทำให้มีโอกาสที่โมเลกุลเอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย (Brena & Batista-Viera, 2006) นอกจากนี้ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า แร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์มีลักษณะพื้นผิวที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีพื้นที่ผิวและช่องว่างในอนุภาคของแร่ที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ที่สามารถยึดเกาะกับแร่ทั้งสองชนิดได้

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซีส เป็นปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ประกอบด้วยปฏิกิริยาแบบผันกลับ (Reversible reaction) 3 ขั้นตอนย่อย โดยไตรกลีเซอไรด์จะเปลี่ยนไปเป็นไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) และกลีเซอรอล ตามลำดับ โดยในแต่ละปฏิกิริยาย่อยจะได้อัลคิลเอสเทอร์ 1 โมลออกมา (Ma *et al.,* 1998) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทานอล โดยปัจจัยดังกล่าวได้แก่ ชนิดของสารเคมีที่เป็น Acyl acceptor ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาของการทำปฏิกิริยา แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธีไตเตรต ซึ่งการไตเตรทเป็นการหาปริมาณสารโดยใช้สารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนให้ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง โดยอาศัยหลักของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลายกรดและเบสที่เข้าทำปฏิกิริยากันพอดี (ประเสริฐ ศรีไพโรจน์, 2538) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบการเกิดเมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีการไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งเมื่อถึงจุดยุติจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน เนื่องจากเมื่อกรดไขมันทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์จะได้เกลือกับน้ำทำให้ความเป็นกรดหายไป สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู (อำภาพรณ์ มั่นหมาย, จรรยา ดาสา, ภิญโญ พานิชพันธ์, พิณทิพ รื่นวงษา และ ชัยเลิศ พิชิตพรชัย, 2550) ดังนั้น วิธีนี้สามารถบอกได้เพียงว่ามีกรดไขมันในสารละลายปริมาณเท่าไหร่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นกรดไขมันชนิดใด

จากการศึกษาผลของชนิดของสารเคมีที่เป็นตัวรับหมู่เอซิลในปฏิกิริยา-ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ปรากฏว่า การใช้เมทานอลทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์ม โดยใช้ Crude lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุด คือ 12.82 ± 4.44 รองลงมา คือ เอทานอล มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ 10.53 ± 4.56 และเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุดในสภาวะที่มีเมทานอล เช่นเดียวกัน ในขณะที่การใช้สารเคมีชนิดอื่นๆ ไม่พบการเกิดเมทิลเอสเทอร์ในปฏิกิริยา ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ การเกิดอิมัลชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับไอโซโพรพานอล เทอร์เทียรีบิวทานอล 1-บิวทานอล และเมทิลอะซิเตท ทำให้ตัวรับหมู่เอซิลเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้ไม่ดี ในขณะที่เมทานอลสามารถเกิดอิมัลชันได้แต่ก็สลายไปได้เร็วจึงทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้ดี (Meng & Salihon, 2011) มีรายงานของ Kamini and Iefuji (2001) ที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส โดยใช้น้ำมันรำข้าวทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ 5 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และไอโซบิวทานอล โดยใช้ Crude lipase จากเชื้อ *Cryptococcus* spp. S-2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า น้ำมันรำข้าวทำปฏิกิริยากับเมทานอลมีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุด คือ 80.7 รองลงมาคือ เอทานอล จะเห็นได้ว่าสารหลายชนิดสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิลในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ที่นิยมใช้โดยทั่วไปคือ แอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอล โพรพานอล บิวทานอล และเอทานอล เป็นต้น แต่เมื่อพิจารณาในด้านของราคาที่ถูกและสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในปริมาณมาก สารหลักที่ใช้เป็นตัวรับหมู่เอซิลในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลจึงเป็นเมทานอล และเอทานอล แต่เมื่อเทียบระหว่างเมทานอลและเอทานอล พบว่าเมทานอลมีราคาที่ถูกกว่าและสามารถทำปฏิกิริยากับไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ว่องไวกว่า อย่างไรก็ตาม สาร 2 ชนิดนี้ อาจทำให้โปรตีนเสียสภาพ ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ดังนั้นปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดที่สามารถเติมลงไปในปฏิกิริยาแต่ละครั้งขึ้นอยู่กับเสถียรภาพของเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ ต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ด้วย (ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ, 2554)

จากการศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ที่มีต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ปรากฏว่า อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุด เท่ากับ 9.52 ± 4.12 และ 8.65 ± 3.01 เมื่อใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ ในขณะที่การใช้อัตราส่วนอื่น ๆ ไม่พบการเกิดเมทิลเอสเทอร์ โดยตามทฤษฎีจะต้องใช้ปริมาณแอลกอฮอล์โดยโมลมากกว่าปริมาณน้ำมัน เพื่อให้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ และช่วยเพิ่มอัตราเร็วและผลผลิตของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วย (Meng & Salihon, 2011) แต่

การใช้แอลกอฮอล์ปริมาณมากในการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพ เพราะแอลกอฮอล์จะดึงน้ำออกมาจากบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์แล้วทำให้โครงรูปของเอนไซม์อยู่ในสภาพที่ทำงานไม่ได้ (พุฒิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์, 2555) ผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Meng and Salihon (2011) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ Crude lipase สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 และ 1:4 และใช้ Crude lipase ที่ได้จากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas qeniculata Stenotrophomonas maltophilia* และ *Bacillus pseudomycoides* ที่แยกได้จากดินบริเวณที่ปลูกปาล์มเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า Crude lipase จากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด เมื่อใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 โดยมีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ 22, 20 และ 16 ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ปรากฏว่า ในตัวอย่างที่ใช้ Crude lipase ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุด คือ 13.89 ± 4.81 ในขณะที่การใช้ Crude lipase ความเข้มข้นอื่น ๆ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ 11.11 และเมื่อปริมาณของ Crude lipase มีค่าเพิ่มขึ้น จาก 25 เปอร์เซ็นต์ เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย แสดงว่าปริมาณของเอนไซม์แปรผันตามปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น แต่เมื่อปริมาณของ Crude lipase เพิ่มขึ้นมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ กลับพบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ ลดลงเล็กน้อย เนื่องจาก ปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้น ทำให้เอนไซม์มีโอกาสจับกับสับสเตรทมากขึ้นและทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไปอีก ในขณะที่ปริมาณสับสเตรทยังเท่าเดิม ก็จะไม่ทำให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น (ดนัย บุณยเกียรติ, ม.ป.ป.) ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Kumar *et al*. (2011) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้น้ำมันสบู่ดำทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้ Crude lipase จากเชื้อ *Microbacterium* sp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า Crude lipase ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้เกิด เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้มากที่สุด และเมื่อ Crude lipase มีความเข้มข้นมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเกิดเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันลดลง ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ ความเข้มข้นสูงสุดที่ 250 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด เท่ากับ 10.09 ± 3.62 ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นอื่นๆ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกัน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ปรากฏว่าเมื่อใช้ Crude lipase เร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุด คือ 8.82 ± 5.09 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 45 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังเห็นได้ว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้ดีกว่า Crude lipase ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากเอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพที่ดีขึ้นที่อุณหภูมิสูงเมื่อเทียบกับ Crude lipase โดยทั่วไปแล้วปฏิกิริยาเคมีต่างๆ จะทำงานได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูง เพราะต้องการพลังงานในการกระตุ้น การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็เช่นกัน แต่เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีน มักจะไม่คงตัวต่อความร้อนจึงทำให้เสียสภาพได้ง่ายเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งความร้อนจะให้พลังงานที่ทำให้อะตอมในโมเลกุลของโปรตีนสั่นรวดเร็วยิ่งขึ้น จนสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจน และพันธะไฮโดรโฟบิกที่ไม่แข็งแรงได้ เอนไซม์เมื่อถูกทำให้เสียสภาพ จะเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานแตกต่างกัน (พุฒิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์, 2555) อุณหภูมิจึงถือเป็นตัวแปรที่สำคัญ การเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมไม่เพียงแต่ช่วยทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น แต่ยังช่วยให้เอนไซม์สามารถทำงานได้นานขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Meng and Salihon (2011) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ Crude lipase สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3 และใช้ Crude lipase ที่ได้จากแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas qeniculata Stenotrophomonas maltophilia* และ *Bacillus pseudomycoides* ที่แยกได้จากดินบริเวณที่ปลูกปาล์มเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 20-65 องศาเซลเซียส พบว่า Crude lipase จากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส

การศึกษาผลของเวลาต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ปรากฏว่า ในช่วงแรกคือที่ชั่วโมงที่ 8 ถึง ชั่วโมงที่ 24 ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 คือ ร้อยละ 9.09 และเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยามากกว่า 24 ชั่วโมง ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่กล่าวว่า ถ้าให้สับสเตรททำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน แล้ววัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะได้ผลคือ ในช่วงแรก ๆ ปริมาณของผลิตภัณฑ์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลา แล้วต่อไปจะเกิดผลิตภัณฑ์ช้าลง และไม่แปรผันโดยตรงกับเวลา การที่เป็นเช่นนี้ อาจเกิดจากการมีสับสเตรทที่จำกัดหรืออัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ถึงจุดสมมูล หรืออาจเกิดจากการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา

(ศิริรัตน์ สาระเวก, 2528) ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Lara and Park (2004) ที่ศึกษาผลสภาวะที่เหมาะสม ที่เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ Waste activated bleaching earth (มีน้ำมันปาล์มเป็นส่วนประกอบ) ทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3 และใช้เอนไซม์บริสุทธิ์จากเชื้อ *Candida cylindracea* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 5, 10, 15, 20 ชั่วโมง พบว่า ในช่วงแรกคือ ที่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 12 ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 คือ 80 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยามากกว่า 24 ชั่วโมง ร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ในการเร่งปฏิกิริยามีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อเร่งปฏิกิริยาเป็นเวลานานขึ้น พบว่า มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ลดลงแต่ก็มีค่าใกล้เคียงกัน

จากผลการทดลองที่ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงข้างต้น สรุปได้ว่า สภาวะที่สามารถเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีที่สุดคือ การใช้น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับเมทานอล (อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:3) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ Crude lipase ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ ความเข้มข้น 250 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อด้วยวิธี TLC เทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. cepacia* และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ค่า R_f ของสารที่แยกได้ไม่แตกต่างกันระหว่างชุดทดสอบที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. cepacia* และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่แตกต่างจาก ค่า R_f ของสารที่พบในตัวอย่างที่ใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การที่ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ไม่สนับสนุนผลที่ได้จากการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ด้วยการไตเตรทนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ มีปริมาณที่น้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้บนแผ่น TLC เนื่องจากความเข้มข้นของสารที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี TLC จะต้องอยู่ในช่วง 500 ไมโครกรัม ถึง 1 มิลลิกรัม (Striegel & Hill, 1996) การที่ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์มีปริมาณน้อยอาจเป็นเพราะกิจกรรมสุดท้ายของ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ ที่อยู่ในสารละลายผสมของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของชุดทดสอบ มีค่าเท่ากับ 9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 6.35 ยูนิต ตามลำดับ ในขณะที่กิจกรรมของ

เอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่อยู่ในสารละลายผสมของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของชุดควบคุมเชิงบวก มีค่าเท่ากับ 868.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่ากิจกรรมของ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ มีค่าน้อยกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทางการค้าถึง 96.5 และ 136.8 เท่า ตามลำดับ จึงส่งผลให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ที่ได้มีปริมาณน้อยไปด้วย และนอกจากนี้วิธีการไตเตรทที่ใช้ในการศึกษานี้ ไม่ได้เป็นการวัดปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นโดยตรง แต่เป็นการวัดปริมาณกรดไขมันที่เหลืออยู่หลังจากการเกิดปฏิกิริยา แล้วนำไปคำนวณร้อยละของการเปลี่ยนจากกรดไขมันไตรกลีเซอไรด์ในไปเป็นเมทิลเอสเทอร์

เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ไม่สามารถช่วยระบุได้ว่ามีการสร้างผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้น ดังนั้นจึงได้ใช้วิธี HPLC ซึ่งมีความไวสูงกว่าในการตรวจสอบ พบว่ามีการสร้างผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ในชุดทดสอบที่ใช้ Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ แต่ไม่สามารถระบุชนิดของเมทิลเอสเทอร์ได้ เนื่องจากค่า Retention times ของสารที่แยกได้ไม่ตรงกันกับค่า Retention times ของสารมาตรฐาน

ในการศึกษาครั้งนี้ มีร้อยละของการเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุดไม่เกิน 14 และ 11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ Crude lipase และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ ในอนาคตหากสามารถทำให้เอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมที่สูงขึ้น และมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาให้ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ไม่ต่ำกว่า ร้อยละ 96.5 โดยน้ำหนักได้ ก็น่าจะสามารถพัฒนาไปใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลในยานยนต์ ตามประกาศของกรมธุรกิจพลังงาน กระทรวงพลังงาน (พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล, 2552)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันไปวิเคราะห์ยืนยันผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น GC หรือใช้วิธี HPLC เหมือนเดิมแต่เปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่
2. ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพิ่มเติม เช่น การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยา เพื่อลดการสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับแอลกอฮอล์โดยตรง และการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อเป็นตัวควบคุมค่า pH ในปฏิกิริยา
3. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ และการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีอื่นหรือใช้ตัวพยุงชนิดอื่น
4. ค้นหาเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมสูงจากจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2558A10802337 สัญญาเลขที่ 33/2558

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัดเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 28 กุมภาพันธ์ 2560

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี 5 เดือน

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 550,000 บาท

งวดที่ 2 (40%) 440,000 บาท

งวดที่ 3 (10%) 110,000 บาท (ยังไม่ได้รับเงินงวดนี้)

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้ (บาท)	งบประมาณที่ใช้จริง (บาท)	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน (บาท)
1. ค่าตอบแทน	180,000		
2. ค่าจ้าง	144,000		
3. ค่าวัสดุ	47,000		
4. ค่าใช้สอย	599,000		
5. ค่าครุภัณฑ์	-		
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	20,000		
7. เงินทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัย เป็นค่าสาธารณูปโภค ร้อยละ 10	110,000	110,000	0
รวม	1,100,000		

(พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม

เกษรา ทองบริบูรณ์. (2553). *การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มใช้แล้วโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในระบบกะและระบบต่อเนื่อง.* วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. (2548). *ปฐพีวิทยาเบื้องต้น (พิมพ์ครั้งที่ 10)*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุฑากานต์ บุญมี. (2552). *การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน*. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ณกัญภัทร จินดา. (2547). เอนไซม์ไลเปส I: แหล่งและประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 24(3), 20-34.

ดนัย บุณยเกียรติ. (ม.ป.ป.). *เอนไซม์*. ; วันที่ค้นข้อมูล 21 กรกฎาคม 2559, เข้าถึงได้จาก http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY3_enzyme.htm

นภัสพร พันธุ์ทอง. (2551). *การสลายไขมันจากกระบวนการผลิตปลาส้มโดยแบคทีเรียที่สลายลิพิดและการประยุกต์เพื่อการบำบัดน้ำเสีย.* วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

บุญแสน เตียวนุกูลธรรม. (2545). *เอกสารประกอนการสอนวิชาปฐพีวิทยา*. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.

ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ. (2554). เทคโนโลยีการเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตไบโอดีเซล. *วารสารวิจัยพลังงาน*, 8, 61-75.

ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. (2538). *เทคนิคทางเคมี* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ประกายพรึก.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2556). เอนไซม์เทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สานักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2558). *เอนไซม์ทางอาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 5). กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์. (2557). *การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัดเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล.* คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.

พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล. (2552). *แนวทางการพัฒนามาตรฐานไบโอดีเซลในภูมิภาคเอเปค* (พิมพ์ครั้งที่1). สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

พุฒิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์. (2555). *การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงบนมอนต์มอริลโลไนต์*. วิทยานิพนธ์ ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต, สาขาอุตสาหกรรม, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วิทยา ถาปันนา, ณัฐพงษ์ จันทิมา และนิคม ชื่นใจดี. (2555). *การพัฒนาต้นแบบเครื่องผลิตน้ำมันไบโอดีเซลสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลขนาดเล็ก*. ปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมอุตสาหการ, คณะวิศกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนาเชียงราย.

สถานวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนจากน้ำมันปาล์มและพืชน้ำมัน. (2007). *วัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล*. วันที่ค้นข้อมูล 15 ธันวาคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://www.biodiesel.eng. psu.ac.th/rawmat.php

สิรินันท์ ชมพูแสง. (2550). *การจัดจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของ Bacillus* sp. *สายพันธุ์* N10. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา, ภาควิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดาพร ปุกแก้ว, อังสนา อัครพิศาล, อรอุมา เรืองวงษ์, เกวลิน คุณาศักดากุล และจิราพร ตยุติวุฒิกุล (2550). การคัดเลือกแบคทีเรียบนผิวใบเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของเสาวรส. *วารสารเกษตร*, 23(2), 147-153.

สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาพลังงาน กระทรวงพลังงาน. (ม.ป.ป.). *ไบโอดีเซลพลังงานใหม่ของคนไทย*. วันที่ค้นข้อมูล 15 ธันวาคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://www.rsu.ac.th/engineer/Energy/download/002/Fact%20Sheet.doc

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร(องค์การมหาชน). (ม.ป.ป.). *ปาล์มน้ำมัน*. วันที่ค้นข้อมูล 15 ธันวาคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/palm/controller/index.php

ศิริรัตน์ สาระเวก. (2528). *เอนไซม์*. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. (ม.ป.ป). *รู้จักปาล์มน้ำมัน*. วันที่ค้นข้อมูล 15 ธันวาคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://www.doa.go.th/palm/linkTechnical/oilpalm.html

เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน. (2545). *การโคลนยีน การทำบริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง Bacillus sp. UN16a*. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อำภาพรณ์ มั่นหมาย, จรรยา ดาสา, ภิญโญ พานิชพันธ์, พิณทิพ รื่นวงษา และชัยเลิศ พิชิตพรชัย. (2550). *การแปรรูปอาหาร*. วันที่ค้นข้อมูล 5 กรกฎาคม 2559, เข้าถึงได้จาก http://www.ilmahidol.ac.th/e-media/acid-base/staff.htm

Abd-Alla, M. H., Bagy, M. M. K., Morsy, F. M., & Hassan, E. A. (2015). Improvement of fungal lipids esterification process by bacterial lipase for biodiesel synthesis. *Fuel*, 160, 196-204.

Agarwal, A. K. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science,* 33(3), 233-271.

Al-Zuhair, S., Jayaraman, K. V., Krishnan, S., & Chan, W. (2006). The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 30(2), 212-217.

Amin, N. A. M., Othman, S. S., Radzi, S. M., & Rahman, M. B. A. (2012). Nanoclay as Potential Support for Immobilization of Lipase from *Candida rugosa*: Physicochemical Properties. *International Annual Symposium on Sustainability Science and Management*. 9(11), 631-639.

Anita, A., Sastry, A., & Hashim, M.A. (1997). Immobilization of urease on vermiculite. *Bioprocess Engineering*, 16 (16), 375–380.

Brena, B.M., & Batista-Viera, F. (2006). Immobilization of Enzymes. In J. M. Guisan (Eds.), *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 15-30). New Jersey: Humana Press Inc.

Bueso, F., Moreno, L., Cedeño, M., & Manzanarez, K. (2015). Lipase-catalyzed biodiesel production and quality with Jatropha curcas oil: exploring its potential for Central America. *Journal of Biological Engineering*, 9(12), 1-7.

Canakci, M., & Gerpen, J. V. (1999). Biodiesel production via acid catalysis. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 42, 1201-1210.

Carvalho, M.S., Menbonco, M.A., Pinho, D.M.M., Resck, I.S., & Suarez, P.A.Z. (2012). Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(4), 763-769.

Chellapandian, M., & Sastry, A. (1992) Vermiculite as an economic support for immobilization ฃ of neutral protease. *Bioprocess Engineering*, 8 (1), 27–31.

Contesinia, F.J., Lopesa, D.B., Macedoa, G.A., Nascimentob, M.G., Carvalhoc, P.O. (2010) *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67(3–4), 163–171.

Demirbas, A. (2005). Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science,* 31(5-6), 466-487.

Eevera, T., Rajendran, K., & Saradha, S. (2009). Biodiesel production process optimization and characterization to assess the suitability of the product for varied environmental conditions. *Renewable Energy*, 34(3), 762-765.

Freedman, B., Butterfield, R. O., & Pryde, E. H. (1986). Transesterification kinetics of soybean oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(10), 1375-1380.

Freedman, B. H., Pryde, E. H., & Mounts, T.L. (1984). Variable Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegatable Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(10), 1638-1643.

Fuentes, I. E., Viseras, C. A., Ubiali, D., Terreni, M., & Alcantara, A. R. (2001). Different phyllosilicates as supports for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymeatic.* 11, 657-663.

Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405-416.

Gandhi, N. N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(6), 621-634.

Gilbert, E. J., Cornish, A., & Jones, C. W. (1991). Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology*, 137, 2223-2229.

Gopinath, S., & Sugunan, S. (2007). Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Applied Clay* Science, 35 (1-2), 67–75.

Huang , A. H. C., Lin, Y. H., & Wang, S. (1988). Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(6), 897-899.

Jaeger, K-E., & Reetz, M. T. (1998). Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipase. *Chemistry and Lipids*. 93(1-2), 3-14.

Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption,* 20, 801-821.

Jitputti, J., Kitiyanan, B., Rangsunvigit, P., Bunyakiat, K., Attanatho, L., & Jenvanitpanijakul, P. (2006). Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. *Chemical Engineering Journal,* 116(1), 61-66.

Kabbashia, N.A., Mohammed, N.I., Alama, M.Z., & Mirghani, M.E.S. (2015). Hydrolysis of Jatropha curcas oil for biodiesel synthesis using immobilized *Candida cylindracea* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 116, 95–100.

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

Kim, H. K., Sung, M. H., Kim, H. M., & Oh, T. K. (1994). Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. Strain 398. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 961-962.

Kumar, V., Joseph, B., Ramtek, P. W., Mani, A., & Jahan, F. (2011). Cold active lipase catalyzed production of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,* 3(2), 226-233.

Kumar, R., Sharma, A., Kumar, A., & Singh, D. (2012). Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, Purification and Some Properties. *World Applied Sciences Journal*. 16(7), 940-948.

Lara, P. V., & Park, E. Y. (2004). Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 270-277.

Lee, S.Y., & Rhee, J.S. (1993). Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 617-623.

Lesuisse, E., Schanck, K., & Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry,* 216, 155-160.

Leung, D. Y. C., & Guo, Y. (2006). Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 87, 883-890.

López, E.N., Medina, A.R., Cerdán, L.E., Moreno, P.A.G., Sánchez, M.D.M., & Grima, E.M. (2016). Fatty acid methyl ester production from wet microalgal biomass by lipase-catalyzed direct transesterification. *Biomass and Bioenergy*, 93, 6–12.

Lui, C. H., Huang, C. C., Wang, Y. W., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2012). Biodiesel production by enzymatic thransesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. *Applied Energy*, 100, 41-46.

Ma, F., Clements, L. D., & Hanna, M. A. (1998). The effects of catalyst, free fatty acids, and water on transecterification of beef tallow. *American Socrety ot Agrrcultural Engineer*, 4(5), 1261-1264.

Macrae, A. R. (1993). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(2), 291-294.

Mander, P., Cho, S. S., Simkhada, J. R., Choi, Y. H., Park, D. J., & Yoo, J. C. (2012). An organic solvent–tolerant lipase from *Streptomyces* sp. CS133 for enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media. *Process Biochemistry*, 47, 635-642.

Marchetti, J.M., Miguel, V.U., & Errazu, A.E. (2007). Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 11, 1300-1311.

Meng, L., & Salihon, J. (2011). Conversion of palm oil to methyl and ethyl ester using crude enzymes. *Biotechnology & Biomaterials*, 1(5). 1-4.

Nazir, M.S., Kassim, M.H.M., Mohapatra, L., Gilani, M.A., Raza, M.R., & Majeed, K. (2016). Characteristic Properties of Nanoclays and Characterization of Nanoparticulates and Nanocomposites. *Nanoclay Reinforced Polymer Composites,* 35-55.

Pourzolfaghar, H., Abnisa, F., Wan Daud, W.M.A., & Aroua, M.K. (2016). A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 61, 245–257.

Pryde, E. H., Mounts, T. L., & Freedman, B. (1984). Variables effecting the yield of fatty ester vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1638-1643.

Ranjitha, P., Karthy, E.S., & Mohankumar, A. (2009). Purification and Characterization of the Lipase from Marine *Vibrio fischeri*. *International Journal of Biology*. 1(2), 48-56.

Reshmi, R., & Sugunan, S. (2013). Superior activities of lipase immobilized on pure and hydrophobic clay supports: Characterization and catalytic activity studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 97, 36-44.

Roberto, A., Arreguin, B., & Gonzalez, C. (2000). Purification and properties of a lipase from . *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, chrysomelidae). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 239-244.

Rodriguesa, J., Perrierb, V., Lecomtec, J., Dubreucqb, E., & Ferreira-Dias, S. (2016). Biodiesel production from crude jatropha oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous medium. *Bioresource Technology*, 218, 1224–1229.

Roychand, P., Angove, M.,& Tisdall, J. (2010) Sorptive protection of organic matter in soil. *19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World,* 235-238.

Scherer, R., Dallago, R., Penna, F., Bertella, F., Oliveira, D., Oliveira, J. V., & Pergher, S. (2012). Influence of process parameters on the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1, 290-294.

Sharma, C. K., & Kanwar, S. S. (2012). Purification of a Novel Thermophilic Lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498. *ISCA Journal of Biological Sciences*. 1(3), 43-48.

Sharma, Y.C., Singha, B. & Upadhyayb, S.N. (2008). Advancements in development and characterization of biodiesel. *Fuel*, 87 (12), 2355–2373.

Sivaramakrishnan, R., & Incharoensakdi, A. (2016). Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus* sp. for methyl ester production from algal oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(5), 517-522.

Srivastava, A., & Prasad, R. (2000). Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4(2), 111-133.

Steiner, J. M., & Williams, D. A. (2002). Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochimie*, 84(12). 1243-1251.

Striegel, M. F., & Hill, J. (1996). *Thin-layer chromatography for binding media analysis*. America: The Getty Conservation Institute.

Tan, K. T., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2010). Effects of the fatty acid, water content and

co-solvent on biodiesel production by supercritical methanol reaction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 53(1-3), 88-91.

Teng, Y. & Xu, Y. (2007). A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry*, 363(2), 297–299.

Tripathi, R., Singh, J., Bharti, R. K., & Thakur, I. S. (2014). Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia*, 54, 518-529.

Tzialla, A. A., Kalogeris, E., Enotiadis, A., Taha, A. A., Gournis, D., & Stanatis, H. (2009). Effective immobilization of *Candida antarctica* lipase B in organic-modified clays: Application for the epoxidation of terpenes. *Materials Science and Engineering: B*. 165(3), 173-177.

Wang, Y. J., Sheu, J. Y., Wang, F. F., & Shaw, J. F. (1988). Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 628-633.

White R.E. (1987). Introduction to the Principles and Practice of Soil Science. Blackwell Scientific Publ. Inc.

Yamane, T. (1987). Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64(12), 1657-1662.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptone (Pancreatic Digest of Cesein)	17.0 กรัม
Soytone (Pancreatic Digest of Soybean Meal)	3.0 กรัม
Glucose (Dextrose)	2.5 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น แล้วแบ่งใส่ฟลาสก์ ๆ ละ 20 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Tryptic Soy Agar (TSA)

Tryptone (Pancreatic Digest of Cesein)	15.0 กรัม
Soytone (Pancreatic Digest of Soybean Meal)	5.0 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนจนวุ่นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวางใน Water bath ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้สักพัก แล้วจึงเทอาหารใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

3. **Production medium (พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์, 2557)**

Glucose	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.0 กรัม

Sodium Chloride	1.25 กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	0.5 มิลลิโมลาร์
น้ำกลั่น	990 มิลลิลิตร
น้ำมันปาล์ม	1 เปอร์เซ็นต์
pH	6.0

ชั่งส่วนประกอบข้างต้น (ยกเว้น น้ำมันปาล์ม) ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 990 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 6.0 แบ่งส่วนผสมใส่ในขวดรูปชมพู่ ขวดละ 19.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตน้ำมันปาล์มลงในขวดรูปชมพู่ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. 100 mM Potassium phosphate buffer (ดัดแปลงจาก สุดาพร ปุกแก้ว, อังสนา อัครพิศาล, อรอุมา เรืองวงษ์, เกวลิน คุณาศักดากุล และจิราพร ตยุติวุฒิกุล, 2550)

เตรียมสารละลาย K_2HPO_4 + KH_2PO_4 โดยเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกันก่อน

การเตรียมสารละลาย K_2HPO_4

เตรียม Stock solution ของ 500 mM K_2HPO_4 (100 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	8.709 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย KH_2PO_4

เตรียม Stock solution ของ 500 mM KH_2PO_4 (100 มิลลิลิตร)

KH_2PO_4	6.805 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

นำ Stock solution ของ 500 mM K_2HPO_4 มา 50 มิลลิลิตร ไปปรับ pH โดยค่อย ๆ เท Stock solution ของ 500 mM KH_2PO_4 ลงไปผสมจนกว่าจะได้ค่า pH 7.0 ซึ่งจะทำให้ได้เป็น 500 mM Potassium phosphate buffer pH 7.0 จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้ 100 mM Potassium phosphate buffer pH 7.0 โดยนำ Stock solution phosphate buffer pH 7.0 มา 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จะได้เป็น 100 mM Potassium phosphate buffer pH 7.0 จากนั้นปิเปตใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ (Teng & Xu, 2007)

2.1 4- Nitrophenyl palmitate (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์)

4- Nitrophenyl palmitate (MW = 377.52 g/mol)	0.0038 กรัม
n-heptane	10 มิลลิลิตร

ชั่ง 4- Nitrophenyl palmitate 0.0038 กรัม ใส่ในขวด vial จากนั้นเติม n-heptane ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หุ้มหลอด vial ด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 เอทานอล (ความเข้มข้น 1 โมลาร์)

เอทานอลมีความหนาแน่น = **0.789** กรัมต่อมิลลิลิตร และมี M.W. = 46.07 g/mol

ใน Absolute ethanol 100 มิลลิลิตร มีเอทานอล **100** มิลลิลิตร

ดังนั้น มวลเอทานอล = 0.789 x **100** = 78.9 มิลลิลิตร

Absolute ethanol (100%)	78.9 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	921.1 มิลลิลิตร

ผสม Absolute ethanol (100%) กับน้ำกลั่นในขวด Duran ขนาด 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หุ้มขวดด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.3 NaOH ความเข้มข้น 5 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (MW = 39.997 g/mol)	199.99 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำกลั่น เก็บสารละลายในขวด Duran ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) (นภัสพร พันธุ์ทอง, 2551)

ฟีนอล์ฟทาลีน	1.0 กรัม
เอทานอล 60 เปอร์เซ็นต์ (60% ethanol)	100 มิลลิลิตร

ละลายฟีนอล์ฟทาลีนในเอทานอล 60 เปอร์เซ็นต์ (60% ethanol) เก็บในขวดสีชา

ภาคผนวก ค

การเตรียมกราฟมาตรฐานของ 4-nitrophenol

1. การเตรียม 4-nitrophenol stock solution ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4-nitrophenol	1.5 มิลลิกรัม
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	3 มิลลิลิตร

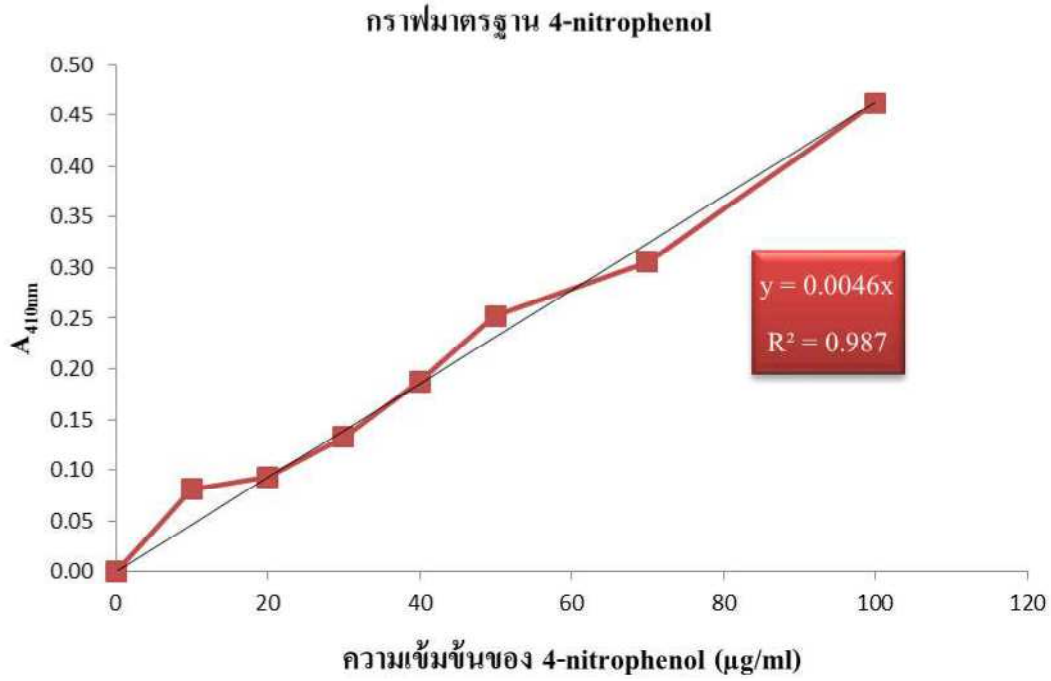
ชั่ง 4-nitrophenol มา 1.5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายจนหมด (stock) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ 4-nitrophenol ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน**ตารางที่ 6**

ตารางที่ 6 ปริมาตรของ 4-nitrophenol stock solution และน้ำที่ใช้สำหรับการเตรียม 4-nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสุดท้ายของ 4-nitrophenol		ปริมาตรของ 4-nitrophenol stock solution (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของน้ำ (ไมโครลิตร)
(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
0	0	0	1000
0.01	10	20	980
0.02	20	40	960
0.03	30	60	940
0.04	40	80	920
0.05	50	100	900
0.07	70	140	860
0.1	100	200	800

2. ปิเปตสารละลาย 4-nitrophenol ที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้นในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microtiter plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ในเครื่อง Microplate reader

3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของ 4-nitrophenol โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel 2010 ซึ่งได้ผลดังแสดงในภาพที่ 13

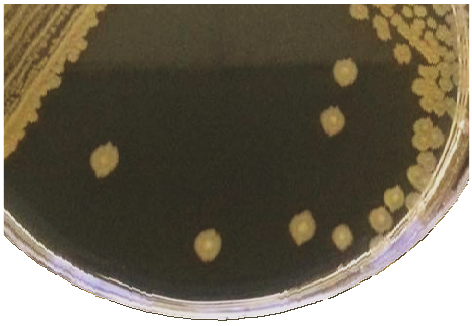


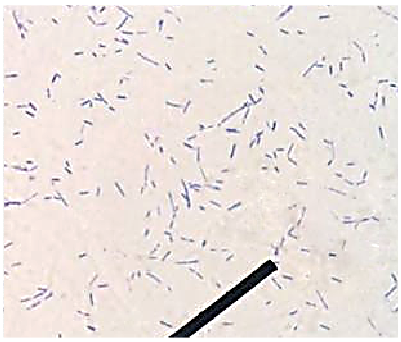
ภาพที่ 8 กราฟมาตรฐานของ 4-nitrophenol

ภาคผนวก ง
รูปภาพที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

1. สัณฐานของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003

A **B**





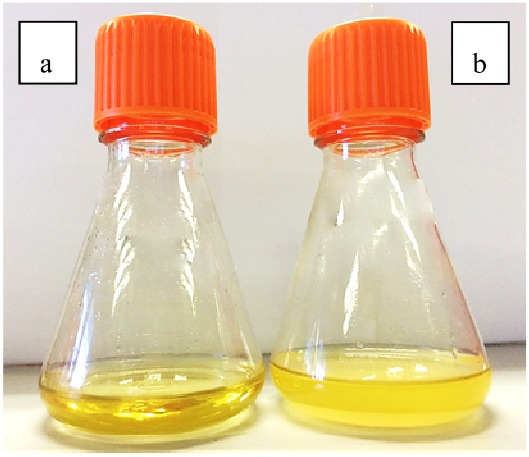
ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนี A) รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยายรวมของภาพ 1000x) B) ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 ที่เจริญบน Trypticase soy agar หลังจากเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. Crude lipase จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003

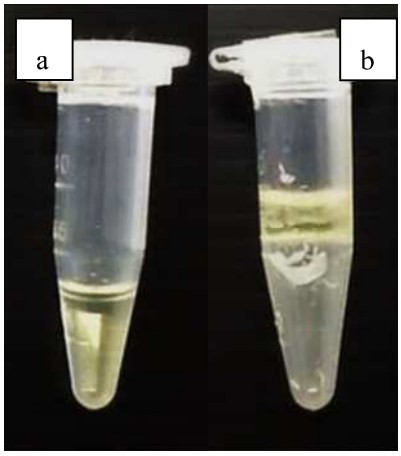
ภาพที่ 10 Crude lipase ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD003 ใน Production medium หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3. ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

A



B



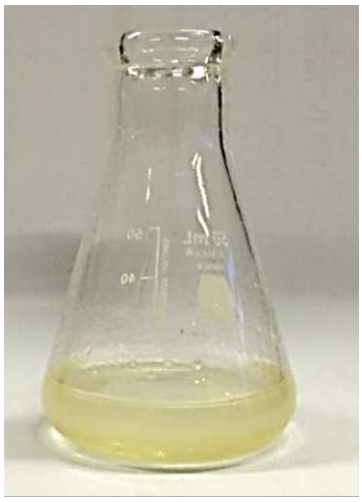
C

ภาพที่ 11 ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดย ภาพ A แสดงการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ Crude lipase ภาพ B แสดงการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า และภาพ C แสดงการเร่งปฏิกิริยาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

หมายเหตุ a คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ ไม่ได้เติมตัวเร่งปฏิกิริยา

b คือ น้ำมันปาล์มทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดยเติมตัวเร่งปฏิกิริยา

4. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์โดยไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

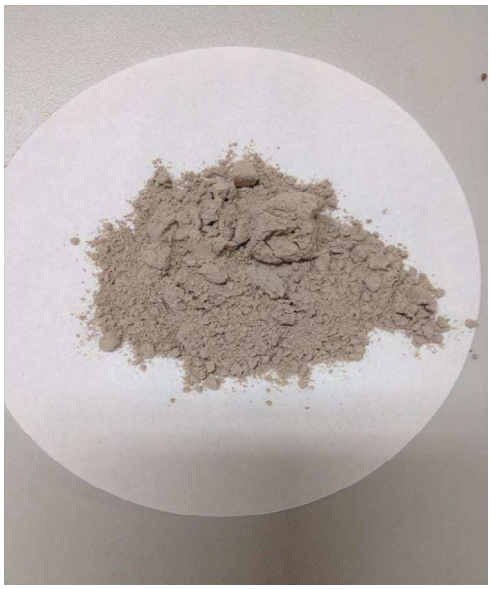


ก่อนการไตเตรท

หลังการไตเตรท

ภาพที่ 12 สารละลายผสมของส่วนใสชั้นบนที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและเอทานอลในอัตราส่วน 1:2 ก่อนและหลังการไตเตรท

5. แร่มอนท์มอริโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์



ภาพที่ 13 ลักษณะของผงแร่มอนท์มอริโลไนท์

(ที่มา : พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์, 2557)

ภาพที่14 ลักษณะของแร่เวอร์มิคูไลท์

(ที่มา : พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์, 2557)

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Patcharanan Amornrattanapan

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

3. หน่วยงานและไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

Email patcharanan@go.buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. ที่จบ	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถานศึกษา
2549	ปริญญาเอก	Molecular Biology and Biotechnology	University of Sheffield, สหราชอาณาจักร
2544	ปริญญาตรี เกียรตินิยมอันดับ1 (ชีววิทยา)	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Molecular machineries of pathogenic yeast morphologies and its physiology
- Gene expression and protein expression in yeasts and bacteria
- Microbial enzymes