

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย (Project)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2549

ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)

- 1.1 รหัส ศ-ข (วศ) 2.2.6.48 ชื่อโครงการ การผลิตไบโอดีเซลจากสับปะรดด้วยกระบวนการผลิตแบบสองขั้นตอน
 (Physic nut biodiesel production of two-step process)
- 1.2 ลักษณะโครงการ ☐ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
☒ เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย)
 โครงการวิจัยเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการ เพื่อการแข่งขัน
 โครงการวิจัยด้านพลังงานทดแทน เศรษฐกิจ-ไบโอดีเซล
- 1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ.ดร.เพ็ญจิตร์ ศรีนพคุณ
- 1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 1.5 ประเภทโครงการ ☐ โครงการวิจัย 3 สาขา; ☐ เกษตรศาสตร์ ☐ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ☐ สังคมศาสตร์
☐ โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพสถาบัน
☐ โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
☐ โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
☒ โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย มก.
☐ โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขัน ฯ
- 1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 2 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2548 ถึงปีงบประมาณ 2549
- 1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- 1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 150,000 บาท ประกอบด้วย
 ปีงบประมาณ 2548 ได้รับ 100,000 บาท ปีงบประมาณ ได้รับ บาท
 ปีงบประมาณ 2549 ได้รับ 50,000 บาท ปีงบประมาณ ได้รับ บาท
 ปีงบประมาณ ได้รับ บาท ปีงบประมาณ ได้รับ บาท
- 1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย
1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส
 2. ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสับปะรดโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
 3. ศึกษาปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลแบบสองขั้นตอน
- 1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ
- | ปีที่ | เดือนที่ | ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้ |
|-------|----------|---|
| 1. | 1 | สืบค้นเอกสารและข้อมูลโดยละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส วิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปสและออกแบบการทดลอง |
| 1 | 2-8 | ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนโคโคซานโดยเทคนิคการดูดซับทางกายภาพ |
| 1. | 9-12 | ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนอัลจิเนตโดยเทคนิคการห่อหุ้ม |

2. 13-18 ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยใช้เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ที่ถูกตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
- 2 19-22 ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยกระบวนการผลิตแบบสองขั้นตอน ได้แก่ การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนแรก จากนั้นใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สอง
- 2 23-24 จัดพิมพ์รายงานฉบับสมบูรณ์

1.11 สรุปการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ (ตามแผน)	เป้าหมาย / ผลที่คาด (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยเทคนิคต่างๆ	1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยเทคนิคต่างๆ	1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยเทคนิคต่างๆ
2. ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	2. ทราบปริมาณเมทิลเอสเทอร์จากการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	2. ทราบปริมาณเมทิลเอสเทอร์จากการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
3. ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยกระบวนการผลิตแบบสองขั้นตอน ได้แก่ การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนแรก จากนั้นใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สอง	3. ทราบปริมาณเมทิลเอสเทอร์จากการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนแรก จากนั้นใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สอง	3. ทราบปริมาณเมทิลเอสเทอร์จากการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนแรก จากนั้นใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สอง

1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- ☒ บรรลุ.....
- ☐ บรรลุบางส่วน (ร้อยละ.....) เหตุผล.....
- ☐ ไม่บรรลุ เหตุผล.....

1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

- ☒ องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส.....
- ☐ สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์.....
- ☐ ผลิตภัณฑ์.....
- ☐ สิ่งประดิษฐ์.....

- ☐ เทคโนโลยี/นวัตกรรม
- ☐ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์
- ☐ คู่มือ
- ☐ วิดีทัศน์
- ☐ การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิตินิติบัญญัติ..... คน ปรินญาโท คน ปรินญาเอก คน
- ☐ สนับสนุนการศึกษาปัญหาพิเศษ..... เรื่อง (ระบุ)..... วิทยานิพนธ์..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

(1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

- ☒ ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนรู้การสอน ใช้เป็นความรู้พื้นฐานและเอกสารอ้างอิงในการผลิตใบเอดีเซลในปรินญาตรีและปรินญาโท
- ☐ ด้านการเกษตร
- ☐ ด้านอุตสาหกรรม
- ☐ ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม
- ☐ ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย
- ☐ ด้านเศรษฐกิจ
- ☐ ด้านสังคม
- ☐ ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม
- ☐ ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย
- ☐ เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ
- ☐ นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป
- ☐ ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

(2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด ตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดโครงการ (ระบุรายละเอียดอยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็น

ภาคผนวกของรายงาน)

- ☐ ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอทางนิทรรศการ..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดิทัศน์..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....

- ☐ ถ่ายทอดฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ.....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์).....เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ).....
- ☐ มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ).....
- ☒ อื่นๆ (ระบุ).....จัดทำเป็นรายงานเสนอ สวพ.....

1.15 การยื่นจด ☐ สิทธิบัตร ☐ อนุสิทธิบัตร ☐ ลิขสิทธิ์

☐ มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ)..... ☐ ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)

- ☒ ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และบริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....
- ☒ ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ).....
- ☐ ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกันความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ).....
- ☒ ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริการจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน

- ☐ ยุทธศาสตร์ความมั่นคงของชาติ การต่างประเทศและการอำนวยความสะดวก
- ☐ ยุทธศาสตร์เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศ
- ☐ ยุทธศาสตร์การพัฒนาสังคม การแก้ไขปัญหาความยากจนและยกระดับคุณภาพชีวิต
- ☒ ยุทธศาสตร์การเสริมสร้างการพัฒนาที่ยั่งยืนของประเทศ
- ☐ ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการประเทศ

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข.....ไม่มี.....

1.19 งานที่จะทำต่อไป/ค่าชี้แจงเพิ่มเติม.....

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2 (หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(รศ.ดร.เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ)

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2549

โครงการวิจัยรหัส ศ-ท (วศ) 2.2.6.48
การผลิตไบโอดีเซลจากสบู่ดำด้วยกระบวนการผลิตแบบสองขั้นตอน
(Physic nut Biodiesel Production of two-step processes)

ดุษฎี รัตนพระ และ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ

Dussadee Rattanaphra and Penjit Srinophakun

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ ในตอนแรกของการทดลองได้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ และการตรึงเอนไซม์โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 857 หน่วยต่อกรัม ในขณะที่เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 513 หน่วยต่อกรัม โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระเท่ากับ 2048 หน่วยต่อกรัม ในขั้นตอนต่อมา นำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันสบู่ดำกับเมทานอล (ขั้นตอนที่หนึ่ง) พบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพเท่ากับ 11 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้เอนไซม์อิสระพบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไบโอดีเซลที่ได้จากขั้นตอนที่หนึ่งไปทำปฏิกิริยาต่อในขั้นตอนที่สองพบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 25 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระที่สภาวะเดียวกันได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 29

คำสำคัญ: เอนไซม์ไลเปส การตรึงเอนไซม์ ไบโอดีเซล ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ABSTRACT

This project studied biodiesel production from physic nut using two step processes, by using lipase as a catalyst in first step followed by sulfuric acid catalyst. In experiment, lipase was immobilized on chitosan by physical adsorption technique and on sodium alginate by entrapment technique. The results show the highest activities of immobilized lipase on chitosan and immobilized lipase on sodium alginate were 857 and 513 unit/g respectively while free lipase gave the highest activity of 2048 unit/g. Then, both immobilized lipase and free lipase were used to catalyze in tranesterification of physic nut with methanol (first step). The experimental data represented that the methyl ester content obtained using immobilized lipase on chitosan was 11%, and immobilized lipase on sodium alginate obtained the methyl ester content of 3%. However, the usage of free lipase as a catalyst produced the higher methyl ester content of 22%. When biodiesel from first step was continued catalyze using sulfuric acid, it was found that the methyl ester content of early used immobilized lipase on chitosan was 25% while the early used free lipase obtained the methyl ester content of 29%.

Key words: lipase, immobilized lipase, biodiesel, tranesterification reaction

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kasetsart University

บทนำ

จากสถานการณ์ปัจจุบัน พบว่าราคาน้ำมันในประเทศไทยได้มีการปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยราคาน้ำมันดีเซลในปี 2547 มีราคาอยู่ที่ 16.99 บาทต่อลิตร และในตลอดทั้งปีมีการปรับตัวเพิ่มขึ้นตลอดเวลา จนกระทั่งปัจจุบันปี 2549 ราคาน้ำมันดีเซล มีราคาเพิ่มขึ้นเป็น 24.14 บาทต่อลิตร (http://www.eppo.go.th/retail_prices.html) และประกอบกับความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในปริมาณมาก โดยเฉพาะน้ำมันดีเซลใช้มากถึง 43 ล้านลิตรต่อวัน คิดเป็น 46.6% ของปริมาณน้ำมันที่ใช้ภายในประเทศ (<http://www.doeb.go.th/dbd/knowledge/bio-diesel2.htm>) มีสัดส่วนการใช้สูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ ในขณะที่พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่ได้จากซากฟอสซิล (fossil fuel) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญมีเหลืออยู่อย่างจำกัดและคาดว่าจะหมดไปในอีกไม่ช้านี้ จึงได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาวัตถุดิบภายในประเทศ เช่น น้ำมันพืชชนิดต่างๆ น้ำมันพืชใช้แล้ว ฯลฯ มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ใช้แทนน้ำมันดีเซล

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ หรือไขมันสัตว์เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซล (Ma and Hanna, 1999) การผลิตไบโอดีเซลมีหลายวิธี ได้แก่ การใช้โดยตรงและการผสม (direct use and blending) ไมโครอิมัลชัน (microemulsions) ไพโรไลซิส (pyrolysis) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (tranesterification) และผลิตโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในรูปแบบอื่น ๆ (other forms of catalysis) (Khan, 2002) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) เป็นวิธีหนึ่งที่ยินยอมนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซล เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่ง

ปฏิกิริยา จะได้เอสเทอร์ (ester) หรือไบโอดีเซล และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ น้ำมันที่นำมาผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันเมล็ดทานตะวัน หรือแม้แต่ไขมันพืชหรือสัตว์ที่ใช้แล้วก็สามารถนำมาผลิตไบโอดีเซลได้ สำหรับประเทศไทย ในขณะนี้ได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกต้นสบู่ดำเพื่อนำน้ำมันมาผลิตไบโอดีเซล ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันสบู่ดำมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงน้ำมันดีเซลมากกว่าน้ำมันชนิดอื่น โดยมีรายงานว่าในเมล็ดของสบู่ดำประกอบด้วยน้ำมัน 40-60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งในน้ำมันสบู่ดำประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว 20 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นที่เหลือเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยมีกรดโอเลอิกเป็นส่วนประกอบมากที่สุดถึง 44.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดลิโนเลอิกมี 34 เปอร์เซ็นต์ กรดปามิติก 12.8 เปอร์เซ็นต์ และ กรดสเตียริก 7.3 เปอร์เซ็นต์ (Shah et al., 2004)

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ ได้แก่ กรด เบส และเอนไซม์ กรดที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟินิก การใช้กรดในการเร่งปฏิกิริยาจะเหมาะสมกับกลีเซอไรด์ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระ และปริมาณน้ำสูง (Fukuda et al., 2001) ส่วนตัวเร่งปฏิกิริยาเบส ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เบสอะลูมิเนียม มีข้อเสียคือ ในน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระสูงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชัน ระหว่างกรดไขมันอิสระกับแอลกอฮอล์กลายเป็นสบู่ ทำให้มีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล ดังนั้นเอนไซม์จึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่น่าสนใจ เนื่องจากไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ เอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม hydrolase มีชื่อในระบบ systematic name ว่า glycerol ester hydrolase หรือ triacylglycerol acyl ester hydrolase (EC 3.1.1.3) (Chowdary et al., 2000) เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน โดยทำให้พันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลน้ำมันแตกออกอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล (ณกัญภัทร, 2547) ถึงแม้ไลเปสจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเอนไซม์ทั่วไป คือสามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีภายใต้สภาวะไม่รุนแรง ที่อุณหภูมิและความดันปกติ (โดยมีน้ำร่วมในปฏิกิริยา) มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงมาก จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อื่น (by products) ที่ไม่ต้องการน้อยมาก ซึ่งทำให้สะดวกในการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยา ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสารลดต่ำลง แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าเอนไซม์จะมีข้อดีหลายประการ แต่การนำเอนไซม์มาใช้ในระดับอุตสาหกรรมก็มีข้อจำกัดเนื่องจากเอนไซม์ส่วนใหญ่มีความเสถียรต่ำ และเอนไซม์บริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้หลาย ๆ รอบ ในรูปเอนไซม์ที่ถูกตรึง (ผ่องผกา, 2537) เอนไซม์ที่ถูกตรึงหมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้นหรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว กลายเป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalyst) (ปราณี, 2535) สำหรับวิธีที่นิยมนำมาตรึงเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ วิธีการดูดซับทางกายภาพ

ในปี 2004 Shah และคณะ ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้เอนไซม์ไลเปส 3 ชนิด ได้แก่ *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa* และ Porcine pancreas ที่ตรึงบนซีไลท์ โดยใช้พีเอชในการตรึงเท่ากับ 7.3 7.8 และ 8 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และเมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไขมัน 0.5 กรัม อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเอทานอล 1:4 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 50 มิลลิกรัม บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ

40 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง พบว่าไลเปสจาก *Chromobacterium viscosu* ที่ตรึงบนซีไลท์ ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุด คือ 71เปอร์เซ็นต์

Rachmaniah และคณะ ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง (60 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้น้ำมัน 1 กรัม อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเอสเทอร์ 1:20 ใช้ปริมาณกรด 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากการติดตามปฏิกิริยาพบว่า กรดไขมันอิสระสามารถเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าไตรกลีเซอไรด์ โดยกรดไขมันอิสระ 99 เปอร์เซ็นต์ ถูกเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ภายในเวลา 20 นาที และภายใน 6 ชั่วโมง ไม่มีไตรกลีเซอไรด์ถูกเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์

นอกจากนี้ Veljkovic และคณะ ได้ศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันเมล็ด tobacco ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง (17 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้กรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้น้ำมัน 10 กรัม อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:18 ใช้ปริมาณกรด 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากปฏิกิริยาพบว่า ปริมาณกรดไขมันอิสระลดลงเหลือน้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 25 นาที ในขณะที่มีเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้น 24.3 เปอร์เซ็นต์

โครงการวิจัยนี้จึงให้ความสนใจศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันสบู่ดำแบบ 2 ขั้นตอน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สอง โดยทำการศึกษาในระดับปฏิบัติการ เพื่อนำไปสู่การใช้งานจริงในอนาคตต่อไป

วิธีวิจัย

วัตถุดิบและอุปกรณ์การทดลอง

1. วัตถุดิบ

- 1.1 น้ำมันสบู่ดำ
- 1.2 เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผงจาก *Pseudomonas fluorescens* EnzOS grade Fluka, Switzerland
- 1.3 ไคโตซานชนิดแผ่น, Food grade
- 1.4 โซเดียมอัลจิเนต, Food grade
- 1.5 กลูตาอัลดีไฮด์, Analytical grade
- 1.6 กรดอะซีติกเข้มข้น, Analytical grade
- 1.7 กรดซัลฟูริกเข้มข้น, Analytical grade
- 1.8 เมทานอล, Analytical grade
- 1.9 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์, Analytical grade
- 1.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์, Analytical grade
- 1.11 2-โพรพานอล, Analytical grade

2. เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

- 2.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer): model Anthelie Advanced, Secoman, France
- 2.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ: model SBD 50 – Cold, Heto, Denmark
- 2.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter): model 420A, Orion, Thermo orion, USA
3. เครื่องมือสำหรับผลิตและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์
 - 3.1 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี: model GC-2010, Shimadzu, Japan
 carrier gas: He
 column: Dbwax, 30 m x 0.32 mm ID
 oven: อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส
 detector: FID, อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส
 injector: split 20:1
 - 3.2 เครื่องเขย่า (orbital shaker): model SK2-DO, CTL
 - 3.3 เครื่องเขย่าแบบปรับอุณหภูมิได้ (incubator shaker): BINDER, Germany
 - 3.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง: model BL210S, Sartorius, Goettingen, Germany
 - 3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge): model PLC-012, GEMMY, Taiwan
 - 3.6 เครื่องผสม (vortex mixer): model KMC-1300V, VISION, Korea

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนโคโคซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

1.1 การเตรียมเมดโคโคซาน

ชั่งแผ่นโคโคซาน 2 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเข้มนีดยา ที่มีหัวเข็มขนาด 18 G (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 มิลลิเมตร) แล้วกดให้ของเหลวหยดลงในสารละลายผสมที่เตรียมจาก โซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 กรัม เอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตรรวม 125 มิลลิลิตร จะได้เมดโคโคซานมีลักษณะกลม

1.2 วิธีการตรึงเอนไซม์

โดยชั่งโคโคซานที่เตรียมตามวิธีในข้อ 1.1 ปริมาณ 2 กรัม เติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียมโดยชั่งเอนไซม์ไลเปส 0.05 กรัม ละลายใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยนำไปผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีของ Winkler and Stuckmann (1979) โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate แล้วให้ *p*-nitrophenol เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะการทดสอบ

1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ที่มีต่อการตรึง

ชั่งโคโคซานที่เตรียมตามวิธีในข้อ 1.1 ปริมาณ 2 กรัม เติมกลูตาอัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.025 0.05 0.1 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเขย่าที่ อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา กรองแยกเอาเม็ดโคโคซาน เติมสารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียมโดยชั่งเอนไซม์ไลเปส 0.05 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยนำไปผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

1.4 ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการตรึง

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 1.3 ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ คือ 5, 6, 7, 8 และ 9 (ทำการปรับพีเอชโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอชต่าง ๆ ในการละลายเอนไซม์ไลเปส) โดยใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 1.3 แล้วนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

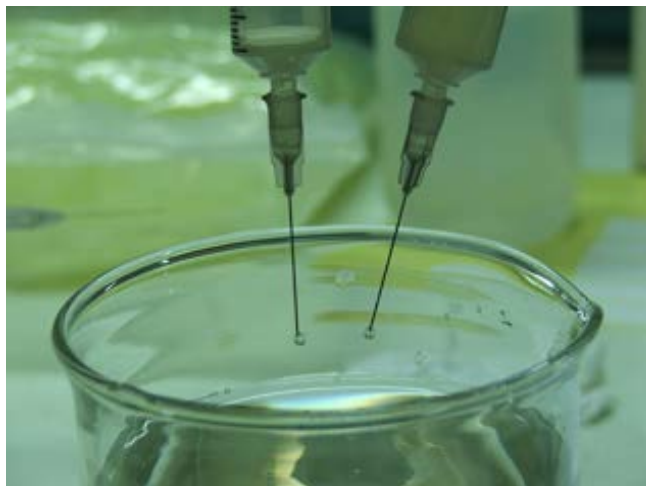
1.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.4 มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีของ Winkler and Stuckmann (1979) แต่ใช้อุณหภูมิระหว่างวิเคราะห์กิจกรรมที่ 30, 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้มาคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์

2. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต

2.1 ศึกษาผลของขนาดเม็ดอัลจิเนตที่มีต่อการตรึง

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (โดยชั่งผงโซเดียมอัลจิเนต 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร) เติมสารละลายเอนไซม์ไลเปสเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเข็มฉีดยา ที่มีหัวเข็มขนาด 18 G (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 มิลลิเมตร) 21 G (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร) 23 G (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร) 24 G (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.55 มิลลิเมตร) แล้วกดให้ของเหลวหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง จึงสามารถนำออกมาใช้งานได้ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์



รูปที่ 1 แสดงการหยดสารละลายโซเดียมอัลจิเนตลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีต่อการตรึง

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.1 แต่ใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1.0 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 2.1 จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

2.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่มีต่อการตรึง

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.1 แต่ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ต่างๆ ได้แก่ 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 2.2 จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

2.4 ศึกษาผลของอัตราส่วนของเอนไซม์ไลเปสต่อโซเดียมอัลจิเนตที่มีต่อการตรึง

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.1 แต่ใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ต่างๆ กัน ได้แก่ 0.1:1 0.5:1 และ 1:1 ลำดับ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 2.3 จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

3. ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนโคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

ชั่งน้ำมันสบู่ดำ 24 มิลลิโมล (น้ำหนักโมเลกุลสบู่ดำเท่ากับ 900 กรัมต่อโมล) เติมเอนไซม์ที่ถูกตรึง 21.6 กรัม จากนั้นเติมเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 หลังจากนั้นเติมน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกตัวอย่างออกจากเอนไซม์ที่ถูกตรึง แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูดตัวอย่างน้ำมันชั้นบนสุดมาวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี และค่าความเป็นกรด ด้วยเทคนิคการไทเทรต

4. ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 3 แต่ใช้เอนไซม์ที่ถูกต้องโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต จากนั้นดูตัวอย่างน้ำมันชั้นบนสุดมาวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี และค่าความเป็นกรด ด้วยเทคนิคการไทเทรต

5. ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยแบบสองขั้นตอน

ซึ่งไบโอดีเซลที่ได้จากข้อ 3 ปริมาณ 11 มิลลิโมล นำไปอุ่นให้ได้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมส่วนผสมระหว่างเมทานอลกับกรดซัลฟูริก โดยใช้เมทานอลในอัตราส่วนน้ำมันต่อเมทานอล 1:20 และกรดซัลฟูริก 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน กวนสารละลายด้วยแท่งเหล็ก ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกตัวอย่างออกจากเอนไซม์ที่ถูกต้องแล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูตัวอย่างน้ำมันชั้นบนสุดมาวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี และค่าความเป็นกรด ด้วยเทคนิคการไทเทรต

ผลและวิจารณ์

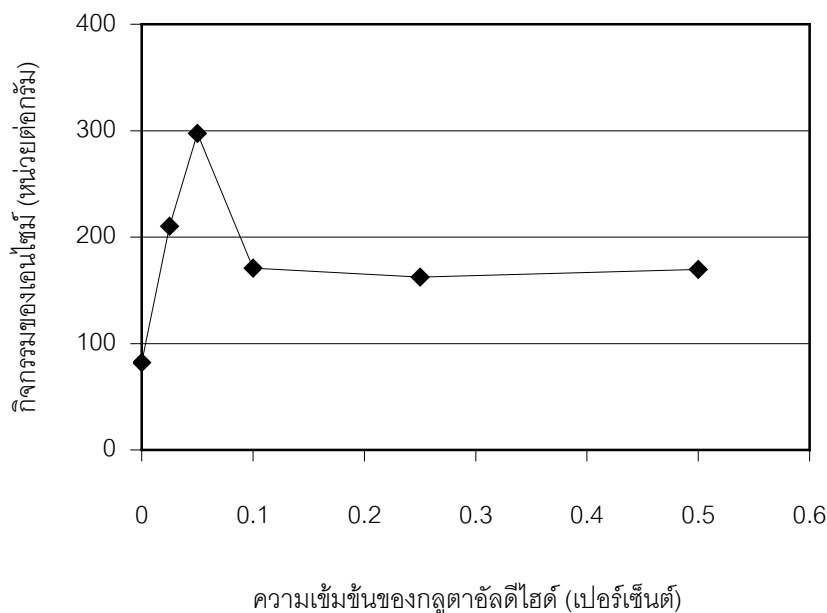
1. ผลของการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนโคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

1.1 ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีต่อการตรึง

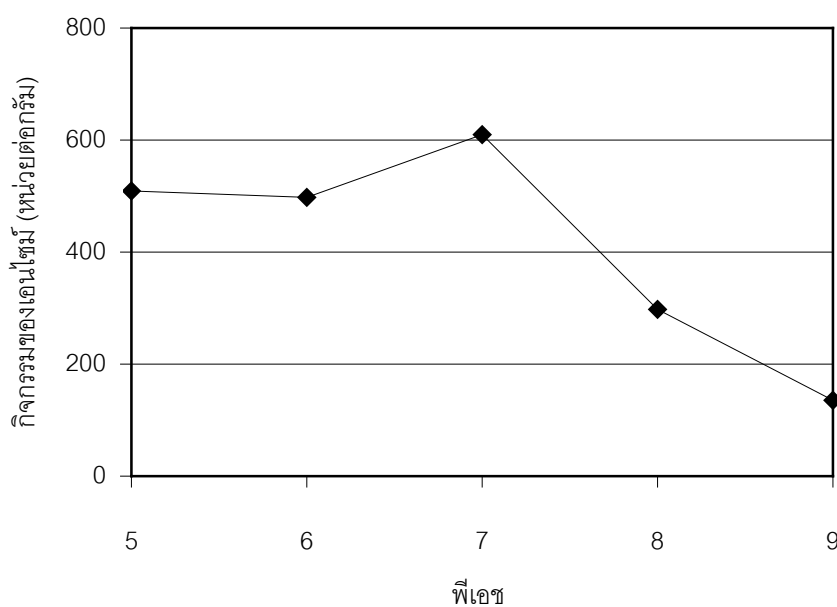
เมื่อตรึงเอนไซม์ไลเปสบนโคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ โดยไม่ใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไข้ว และใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไข้ว ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8 พบว่ากลูตาอัลดีไฮด์มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเมื่อไม่ใช้ กลูตาอัลดีไฮด์มีค่าต่ำ (รูปที่ 2) แต่เมื่อใช้กลูตาอัลดีไฮด์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็จะเพิ่มขึ้น ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 297.48 หน่วยต่อกรัม อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นเป็น 0.1, 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็ลดลงตามลำดับ ทั้งนี้เพราะที่ระดับการเชื่อมไข้วระหว่างโคโตซานกับเอนไซม์มากขึ้น โมเลกุลของเอนไซม์อยู่เบียดชิดกัน ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายมวลลดลง สัมประสิทธิ์ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้

1.2 ผลของพีเอชที่มีต่อการตรึง

ผลของพีเอชที่มีต่อการตรึง พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชช่วงระหว่าง 5 - 7 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง (รูปที่ 2) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโดยทั่วไปโคโตซานเป็นตัวพุงที่เป็นโพลิแคตไอออนิก (polycationic) โดยมีค่าไอโซอิเล็กทริกพอยท์ (isoelectric point) เท่ากับ 5.4 (Chiou and Wu, 2004) ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงจะอยู่ในช่วงของพีเอชที่เป็นกรด ซึ่งประจุบวกที่อยู่ในสารละลายรอบ ๆ โคโตซานจะเหนี่ยวนำเอนไซม์เข้ามายึดจับกับโคโตซานได้ดี โดยพีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ พีเอช 7 โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 609.61 หน่วยต่อกรัม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าที่พีเอชมากกว่า 6 ทำให้โคโตซานเป็นกลาง เอนไซม์จึงไปเกาะได้น้อยลง แต่เอนไซม์ที่เกาะได้น้อยนั้นก็กลับมีกิจกรรมสูงที่พีเอช 6-7 เมื่อพีเอชสูงขึ้นจาก 7 เป็น 8 เอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลง และเมื่อพีเอชสูงขึ้นเป็น 8 และเอนไซม์กลับเสียสภาพ ซึ่งส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง



รูปที่ 2 ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ที่พีเอช 8 และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

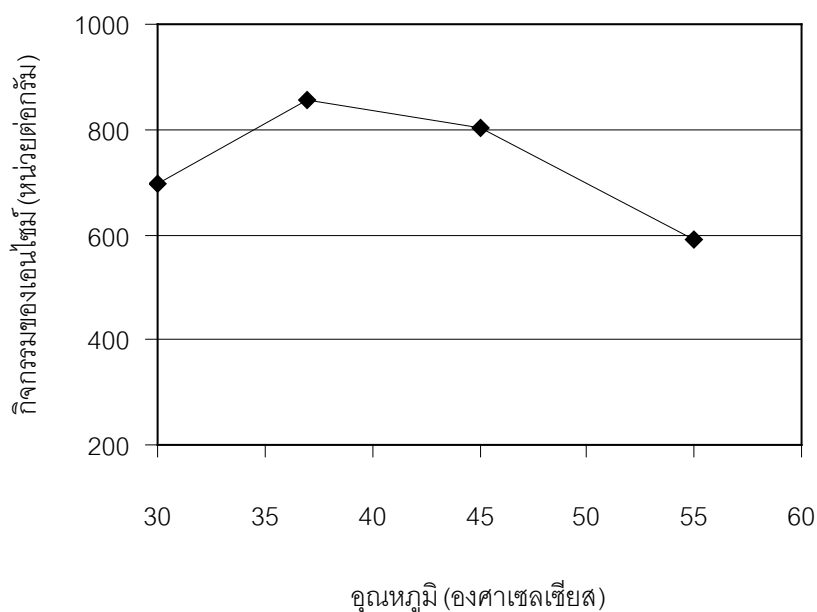


รูปที่ 3 ผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

1.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

ศึกษาโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงในสภาวะที่เหมาะสม คือ ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช 7 มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30-55 องศาเซลเซียส บ่มนาน 15 นาที จากการทดลองพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 856.76 หน่วยต่อกรัม และเมื่อ

อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 45 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งคาดว่าอุณหภูมิมีผลต่อค่า k ตามสมการของ Arrhenius แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์อาจเกิดการเสียสภาพด้วยความร้อน



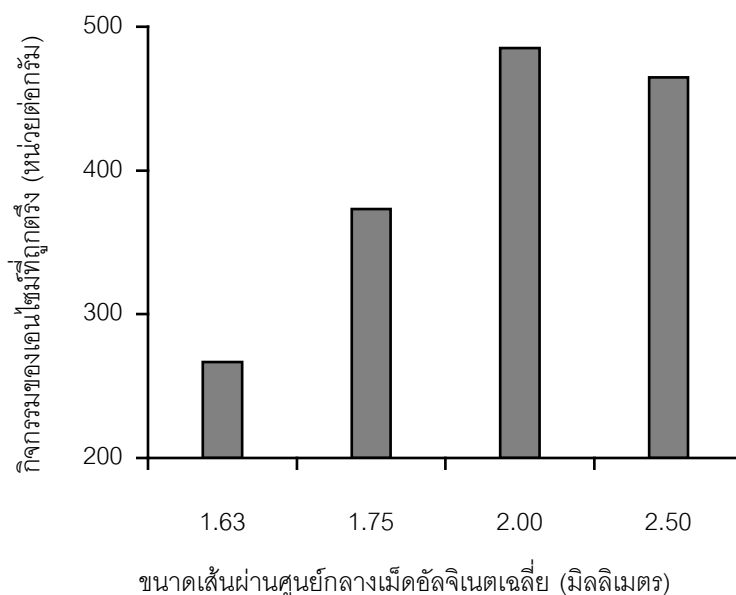
รูปที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7

2. ผลของการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต

2.1 ผลของขนาดเม็ดอัลจิเนตที่มีต่อการตรึง

จากการศึกษาผลของขนาดเม็ดอัลจิเนตที่มีต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส โดยใช้สาร

ละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่ออัลจิเนตคือ 1 ต่อ 2 พบว่าเมื่อขนาดเม็ดอัลจิเนตเพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5) และมีค่าสูงสุดเมื่อขนาดเม็ดอัลจิเนตเท่ากับ 2.00 มิลลิเมตร โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 485 หน่วยต่อกรัม ซึ่งโดยทั่วไปหากขนาดเม็ดอัลจิเนตเพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมควรจะลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขนาดของเม็ดอัลจิเนตที่เล็กเกิดการรวมตัวเป็นก้อน ดังแสดงในรูปที่ 6 ทำให้พื้นที่ในการแลกเปลี่ยนมวลสารลดลง และเมื่อขนาดเม็ดอัลจิเนตเพิ่มขึ้นเป็น 2.50 มิลลิเมตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าลดลง ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีเพราะเมื่อพิจารณาเอนไซม์ที่ถูกตรึงในปริมาณเท่ากัน เม็ดอัลจิเนตที่มีขนาดใหญ่ขึ้น พื้นผิวสัมผัสในการแลกเปลี่ยนมวลสารลดลง ค่ากิจกรรมจึงลดลง



รูปที่ 5 ผลของขนาดเมล็ดอัลจินเตตอกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง



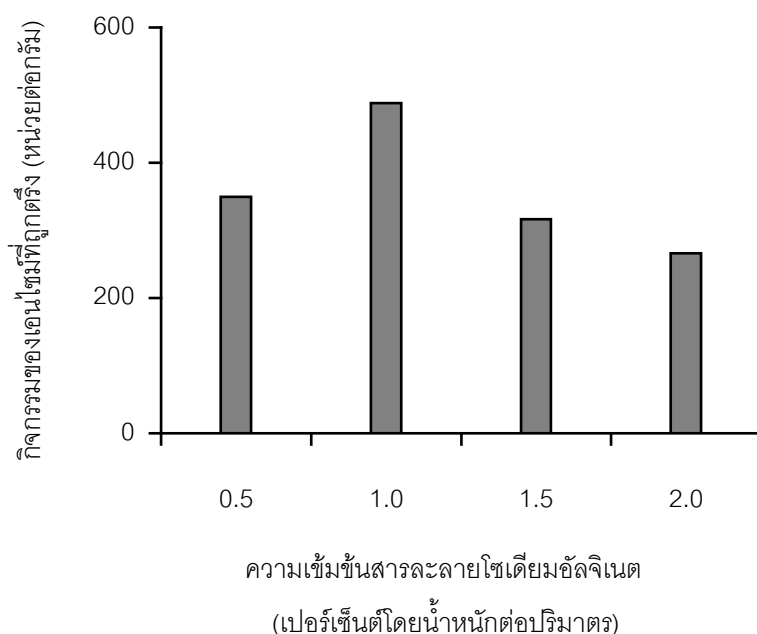
รูปที่ 6 ตัวอย่างเมล็ดอัลจินเตขนาด 1.63 มิลลิเมตรที่เกิดการรวมตัวเป็นก้อน

2.2 ผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินเตที่มีต่อการตรึง

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินเตที่มีต่อการตรึง

เอนไซม์ไลเปส โดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่ออัลจินเตคือ 1 ต่อ 2 และใช้ขนาดของเมล็ดอัลจินเตที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2.1 พบว่าความเข้มข้นโซเดียมอัลจินเตที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (รูปที่ 7) โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 488 หน่วยต่อกรัม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Keehoon W. และคณะ แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง คาดว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตมีผลต่อขนาดของช่องตาข่ายในโครงสร้างของโพลิเมอร์ ซึ่งใช้บรรจุเอนไซม์ โดยที่การเพิ่มความเข้มข้นสารละลายโซเดียมอัลจินเตจะไปลดขนาดของช่องตาข่าย ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปอยู่ได้ ขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่ากิจกรรมของ

เอนไซม์มีค่าลดลงเช่นกัน ทั้งนี้คาดว่าความเข้มข้นของไซโตเคียมอัลจินตที่เจือจาง ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถไปเกาะในโครงร่างตาข่ายโพลิเมอร์ได้ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมลดลง

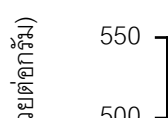


รูปที่ 7 ผลของความเข้มข้นของสารละลายไซโตเคียมอัลจินตต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

2.3 ผลของความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีต่อการตรึง

เนื่องจากแคลเซียมไอออนในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะทำการแลกเปลี่ยนไอออนกับไซโตเคียมไอออน เพื่อฟอร์มตัวเป็นเม็ดเจลแคลเซียมอัลจินต ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จึงมีผลต่อการตรึงเอนไซม์

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส โดยใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่ออัลจินตคือ 1 ต่อ 2 ใช้ขนาดของเม็ดอัลจินตและความเข้มข้นของสารละลายไซโตเคียมอัลจินตที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2.2 พบว่าเมื่อสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (รูปที่ 8) และมีค่าสูงสุดเมื่อสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มีความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 513 หน่วยต่อกรัม ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์จะเป็นการเพิ่มปริมาณแคลเซียมไอออน ที่ใช้ในการขึ้นรูปเป็นเม็ดอัลจินต เอนไซม์จึงถูกห่อหุ้มไว้ภายในเม็ดอัลจินตมากขึ้น ค่ากิจกรรมจึงเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์เป็น 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่ากิจกรรมไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แสดงว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์

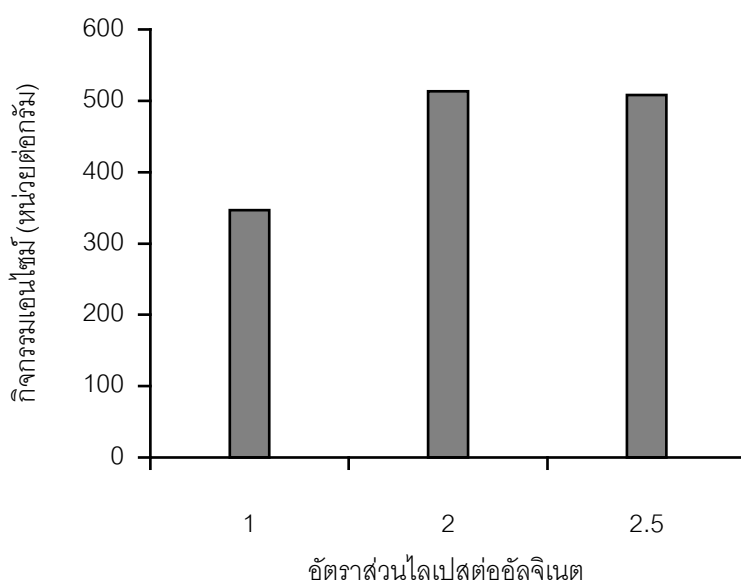


รูปที่ 8 ผลของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

2.4 ผลของอัตราส่วนของเอนไซม์ไลเปสต่อโซเดียมอัลจิเนตที่มีต่อการตรึง

จากการศึกษาผลของอัตราส่วนของเอนไซม์ไลเปสต่อโซเดียมอัลจิเนตที่มีต่อการตรึง

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2.3 พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไลเปสต่ออัลจิเนต ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะมีแนวโน้มสูงขึ้น (รูปที่ 9) จนกระทั่งที่อัตราส่วน ไลเปสต่อโซเดียมอัลจิเนตเพิ่มขึ้นจาก 2:1 เป็น 2.5:1 ค่ากิจกรรมเริ่มคงที่ ที่อัตราส่วนไลเปสต่อโซเดียมอัลจิเนต 2:1 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 513 หน่วยต่อกรัม

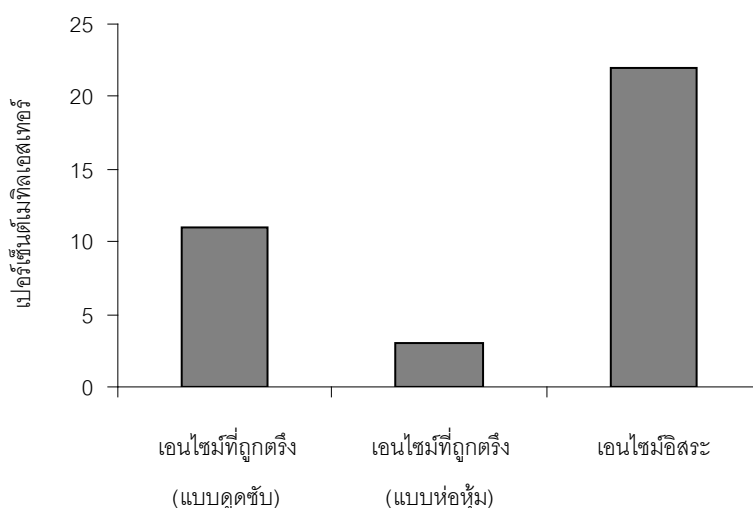


รูปที่ 9 ผลของอัตราส่วนเอนไซม์ไลเปสต่อโซเดียมอัลจิเนตที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

3. ผลการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง

จากการทดลองเมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนโคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพปริมาณ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันสบู่ดำ โดยปรับอัตราส่วนของ

น้ำมันต่อเมทานอลเป็น 1:3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 11 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 10) ซึ่งมีความมากกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในสภาวะเดียวกัน โดยได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ของเอนไซม์อิสระที่สภาวะเดียวกันมีค่าเท่ากับ 22 จากการที่ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตมีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เนื่องจากการตรึงเอนไซม์โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เป็นการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในโครงร่างตาข่าย อาจทำให้สับสเตรทเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ยาก เมื่อเทียบกับวิธีการดูดซับทางกายภาพซึ่งเป็นการตรึงเอนไซม์ไว้บนผิวภายนอกของตัวจับยัดทำให้สับสเตรทสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายกว่า แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงทั้ง 2 วิธีมีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้เอนไซม์อิสระในสภาวะเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการตรึงเอนไซม์อาจจะทำให้ conformation ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง ส่งผลทำให้แอคทีฟไซต์ (active site) ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้เร่งปฏิกิริยาผิดรูปไป มีผลให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลง แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ถูกตรึงสามารถคัดแยกออกจากไบโอดีเซลและสามารถนำกลับไปเร่งปฏิกิริยาได้หลายครั้ง ซึ่งคาดว่าจะทำให้เพิ่มปริมาณเมทิลเอสเทอร์ได้



รูปที่ 10 ผลของเอนไซม์ที่ถูกตรึงและเอนไซม์อิสระต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

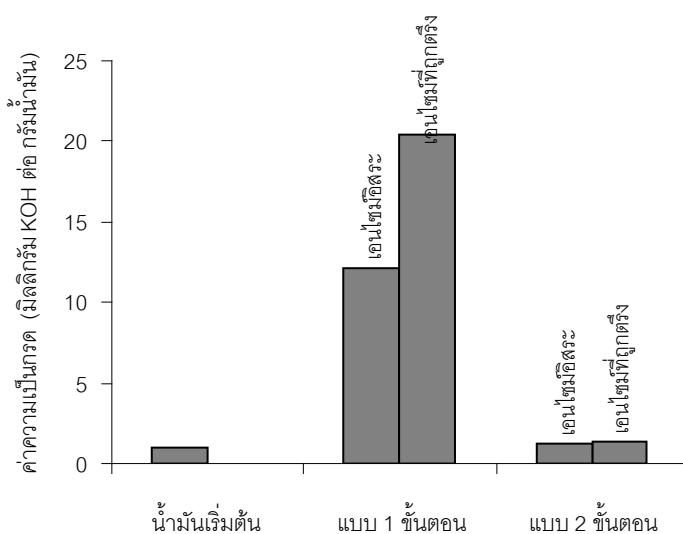
จากผลของการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงและเอนไซม์อิสระ พบว่าได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดพบว่ามีค่าค่อนข้างสูง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะได้ทำการเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวต่อไปโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพและเอนไซม์อิสระ เนื่องจากให้ค่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูง

5. ผลการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยแบบสองขั้นตอน

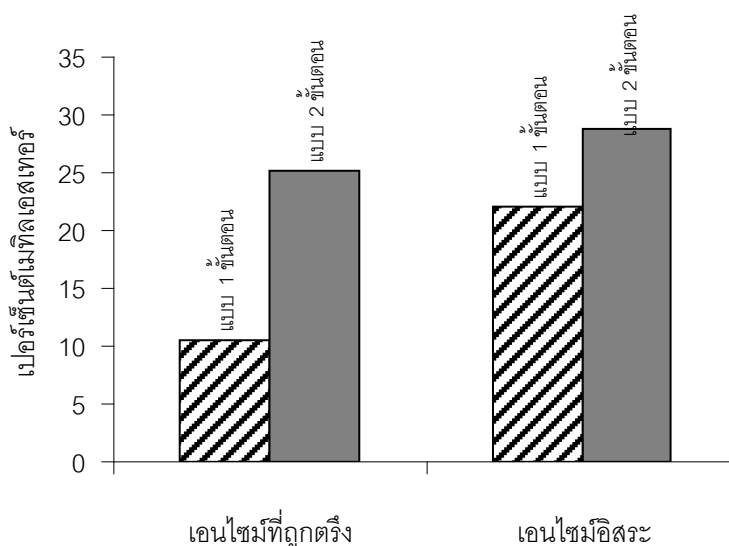
ในขั้นตอนนี้เป็นทดลองเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรด ซึ่งจะเป็นปฏิกิริยาที่ทำต่อเนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ ทดลองโดย

ใช้ไบโอดีเซลที่ได้จากขั้นตอนแรก (ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง) ทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้อัตราส่วนน้ำมันต่อเมทานอล 1:20 และกรดซัลฟูริก 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง จากการทดลองเมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดพบว่า ค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นหลังทำปฏิกิริยาในขั้นตอนแรก โดยปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงจะให้ค่าความเป็นกรดสูงกว่าปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์อิสระ แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์อิสระกลับสูงกว่าปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง (รูปที่ 11 และ 12) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์อิสระสามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระและมีความสามารถพากรดไขมันอิสระมาทำปฏิกิริยากับเมทานอลได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง เอนไซม์ที่ถูกตรึงสามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้ดีแต่จากที่กล่าวไปข้างต้นแล้วว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงอาจมี conformation ที่เปลี่ยนไป ทำให้บริเวณเร่งไม่เหมาะสมในการจับกับสับสเตรท ทำให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลง

จากปริมาณกรดไขมันอิสระที่สูงหลังทำปฏิกิริยาในขั้นตอนแรก ดังนั้นจึงนำไบโอดีเซลที่ได้ไปเร่งปฏิกิริยาโดยใช้กรด เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันอิสระเป็นเอสเทอร์ จากการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดหลังทำปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สอง ทั้งปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงและเอนไซม์อิสระ โดยปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของขั้นตอนที่สองโดยเอนไซม์ที่ถูกตรึงจะเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้จะสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดของเอนไซม์ที่ถูกตรึงซึ่งสูงกว่าเอนไซม์อิสระหลังทำปฏิกิริยาในขั้นตอนที่หนึ่ง อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาแบบสองขั้นตอนยังมีค่าต่ำ ทั้งนี้อาจสันนิษฐานได้ว่าปริมาณเอสเทอร์ที่เพิ่มขึ้นขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสมากกว่าปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้กรด ซึ่งคาดว่าปฏิกิริยาในส่วนของทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ อาจมีไตรกลีเซอไรด์ ไคกลีเซอไรด์ และมอนอกลิเซอไรด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาเหลืออยู่ จึงทำให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ต่ำ



รูปที่ 11 ผลของปฏิกิริยาแบบสองขั้นตอนต่อค่าความเป็นกรด



รูปที่ 12 ผลของปฏิกิริยาแบบสองขั้นตอนต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

สรุปและเสนอแนะ

จากการศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานด้วยเทคนิคการดูดซับทางกายภาพ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงคือ ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 857 ในขณะที่เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตสภาวะที่เหมาะสมคือ ขนาดเม็ดอัลจิเนต 2 มิลลิเมตร ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ อัตราส่วนของเอนไซม์ไลเปสต่อโซเดียมอัลจิเนต 2:1 โดยจะให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 513 หน่วยต่อกรัม ขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระเท่ากับ 2048 หน่วยต่อกรัม ในขั้นตอนต่อมาเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันสนดำกับเมทานอล (ขั้นตอนที่หนึ่ง) พบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพเท่ากับ 11 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้เอนไซม์อิสระพบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปโอดีเซลที่ได้จากขั้นตอนที่หนึ่งไปทำปฏิกิริยาต่อในขั้นตอนที่สองพบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 25 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระที่สภาวะเดียวกันได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 29

จากผลการทดลองพบว่าการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงด้วยวิธีต่างๆ และเอนไซม์อิสระให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ค่อนข้างต่ำ และนำไปโอดีเซลดังกล่าวมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชันต่อโดยใช้กรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์ไลเปสเพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นทดลองนำไปโอดีเซลที่ผ่านการเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชันต่อโดยใช้เบส (KOH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเกิดสบู่ขึ้นหลังทำปฏิกิริยา ทำให้ผลได้ของไบโอดีเซลลดลงมาก

เอกสารอ้างอิง

1. ณัฏฐภัทร จินดา. 2547. เอนไซม์ไลเปส I: แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 24 (3): 21-31.
 2. ปราณี อานเป็รื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1. ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 3. ผ่องผกา ยงพานิชกุล. 2537. การตรึงเอนไซม์และการศึกษาคุณสมบัติของ β - xylosidase จากเชื้อรา ASPERGILLUS FUMIGATUS FRESENIUS รหัส 4-4S-IF. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
 4. สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง กรมธุรกิจพลังงาน. 2546. ดีเซลจากพืช ทางเลือกใหม่ของพลังงาน. แหล่งที่มา: <http://www.doeb.go.th/dbd/knowledge/bio-diesel2.htm>, 15 มีนาคม 2548.
 5. สำนักงานพลังงาน. ราคาน้ำมันวันนี้. http://www.eppo.go.th/retail_prices.html, 11 ตุลาคม 2549.
 6. Fukuda, H., A. Kondo and H. Noda. 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. J. Biosci. Bioeng. 92: 405-416.
 7. Keehoon W., Sangbum K., Kwang-Je K., Hong-Woo, P. and Moon, S.J. (2004), *Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads*, Process Biochemistry, 40, 2149–2154.
 8. Khan, A.K. 2002. Research into Biodiesel Kinetics & Catalyst Development. Available Source: http://www.chegue.uq.edu.au/ugrad/chee4001/CHEE400102/Adam_Khan_Thesis.pdf. March 26, 2005.
 9. Ma, F. and M.A. Hanna. 1999. Biodiesel production: a review. Biores Technol. 70: 1-15.
 10. Shah, S., S. Sharma and M.N. Gupta. 2004. Biodiesel preparation by Lipase- catalyzed transesterification of jatropha oil. Energy & Fuels. 18: 154-159.
 11. Rachmaniah, O., Y. Ju., S. Vali., I. Tjondronegoro and A.S. Musfil. 2006. A study on acid-catalyzed transesterification of crude rice bran oil for biodiesel production.
 12. Veljkovic, V.B., S.H. Lakicevic., O.S. Stamenkovic., Z.B. Todorovic and M.L. Lazic. 2006. Biodiesel production from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil with a high content of free fatty acids. Fuel. 85: 2671-2675.
 13. Winkler, U.K. and M.J. Stuckmann. 1979. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacterial. 138: 663-670.
-