

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา

ปัจจุบันน้ำมันเชื้อเพลิงในประเทศไทยมีราคาสูงที่สุดในรอบ 50 ปี อันเนื่องมาจากราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกปรับตัวสูงขึ้นเป็นประวัติการณ์ น้ำมันเชื้อเพลิงถูกใช้ทั้งในด้านอุตสาหกรรม การขนส่งและด้านอื่นๆ ทำให้ประเทศไทยมีการนำเข้าน้ำมันเชิงเพลิงเป็นสินค้านำเข้าอันดับหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำมันดีเซล ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1.1. แสดงมูลค่าการนำเข้าน้ำมันดีเซลของไทย

ปี	มูลค่า : ล้านบาท
2545	3,465.3
2546	4,932.4
2547	2,053.8

ที่มา: ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร

(www.aopdm02.doe.go.th)

ดังนั้นประเทศไทยจะต้องเสียดุลการค้าทำให้ประเทศไทยหาแนวทางเพื่อลดปัญหาการนำเข้าน้ำมันและปรับปรุงพัฒนาพลังงานทดแทนประเภทต่างๆ แนวทางหนึ่งที่เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซลคือ ไบโอดีเซล (Biodiesel)

ไบโอดีเซล คือน้ำมันที่ผลิตได้จากน้ำมันพืชชนิดต่างๆ หรือน้ำมันจากสัตว์มาทำปฏิกิริยาทางเคมีกับแอลกอฮอล์หรือที่เรียกว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (Transesterification) โดยต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเข้ามาช่วยซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอล และเอสเทอร์ นั่นคือน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งไบโอดีเซลที่ผลิตได้ได้รับการทดสอบว่ามีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลจากน้ำมันดิบ ดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 1.2. แสดงคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลและน้ำมันดีเซลจากน้ำมันดิบ

คุณสมบัติ	น้ำมันดีเซลจากน้ำมันดิบ	น้ำมันไบโอดีเซล
Density at 15 °C(Kg /m ³)	0.849	0.888
Initial boiling point (°C)	180	307
10%	220	319
20%	234	328
50%	263	333
	349	342

Final boiling point (°C)	31.5	-
Aromatic (% v/v)	86.0	77.4
Carbon (%)	13.4	12.0
Hydrogen (%)	0.0	11.2
Oxygen (%)	0.3	0.03
Sulphur (%)	46.1	44.6
Octane index (%)	46.2	58.8
Octane number	1.81	3.62
H : C ratio	42.3	31.50
Net calorific value (MJ/kg)		

ที่มา : Mittelbach M. และ Tritthart P.,1988

ข้อดีของไบโอดีเซลที่ Vicente และคณะ [Vicente et al., 2004] กล่าไว้คือ

- 1 เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงทางเลือกสำหรับทดแทนน้ำมันจากฟอสซิล ซึ่งสามารถผลิตได้ในประเทศ และช่วยลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ
 - 2 เป็นน้ำมันซึ่งสามารถผลิตหมุนเวียนได้ตลอด (ผลิตจากพืช) จึงถือได้ว่าเป็น renewable energy)
 - 3 เป็นการลดมลพิษและพลังงานที่มีอยู่ในโลก ไม่ทำให้ปริมาณคาร์บอนเพิ่มขึ้น
 - 4 เป็นการลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ทางอ้อม เพราะเป็นการหมุนเวียนคาร์บอนไดออกไซด์ โดยพืชใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศผลิตน้ำมัน และคาร์บอนไดออกไซด์จะกลับสู่อากาศ เมื่อเผาไหม้ น้ำมัน จึงเป็นการลดสภาวะเรือนกระจก (green house effect)
 - 5 เป็นการลดก๊าซเสีย เช่นก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ปกติจะปนเปื้อนอยู่ในน้ำมันดีเซล เพราะน้ำมันจากพืชจะมีกำมะถันปนเปื้อนอยู่น้อยมาก
 - 6 ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์และไม่มีความเป็นพิษ จึงบำบัดของเสียได้ง่าย ถ้ามีการปนเปื้อนไบโอดีเซลลงในสิ่งแวดล้อม
 - 7 เนื่องจากไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืช หรือน้ำมันสัตว์ จึงเป็นผลผลิตทางการเกษตร เป็นการช่วยพัฒนาระบบเศรษฐกิจฐานราก
- น้ำมันพืชที่นิยมนำมาผลิตน้ำมันไบโอดีเซลคือ น้ำมันปาล์ม เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากน้ำมันปาล์มที่มีมากเกินความต้องการของตลาด ทำให้น้ำมันปาล์มมีราคาต่ำมาก ประกอบกับต้องประกอบส่วน

ใหญ่ของน้ำมันปาล์มมีไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูง ทำให้เป็นที่นิยมในการประกอบอาหารน้อยกว่าน้ำมันถั่วเหลือง

ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาช่วย ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ

- วิธีทางเคมี จะใช้ตัวเร่งหรือเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาแบบ homogeneous reaction ปฏิกิริยานี้จะใช้อุณหภูมิและความดันสูง ให้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูง แต่อาจเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง ทำให้ต้องมีการบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งต้องมีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น และมีการสูญเสียผลิตภัณฑ์ออกไปด้วย
- วิธีทางชีวภาพ คือการใช้เอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ทั้งในระบบ homogeneous reaction หรือ heterogeneous reaction เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสนั้นมีคุณสมบัติที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการย่อยสลายพันธะในไขมัน ในการเลือกใช้วิธีทางชีวภาพนั้นสามารถลดปัญหาของการใช้วิธีทางเคมีได้และยังมีข้อดีคือ ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสทำให้สามารถเลือกผลิตสารได้จำเพาะขึ้น ได้แก่ โมโนกลีเซอไรด์, ไดกลีเซอไรด์และไตรกลีเซอไรด์

อย่างไรก็ตามการใช้ไลเปสในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลยังมีข้อจำกัด เนื่องจากไลเปสมีราคาแพง จึงมีงานวิจัยพยายามใช้ไลเปสในรูปแบบที่ถูกตรึงเพื่อที่จะได้มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมได้มากขึ้น และมีจำนวนรอบการใช้ได้มากขึ้น ส่วนใหญ่การใช้ไลเปสจะยังคงจำกัดอยู่กับปฏิกิริยาที่ใช้เมธานอลเป็นสำคัญ แต่เมธานอลมีความเป็นพิษ ทำให้ผู้วิจัยหันมาสนใจเอทานอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จากผลผลิตทางการเกษตรเช่นเดียวกัน จึงถือได้ว่าเป็น renewable energy เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสนใจที่จะศึกษากระบวนการผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่อง เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาใช้ในระบบอุตสาหกรรม และเป็นการลดขั้นตอนในการผลิตไบโอดีเซลลงเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแบบครั้งคราว (batch) อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จะเป็นการรวบรวมความรู้ในด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องมาประกอบเป็นงานวิจัย โดยมีการศึกษาและมีการตรวจเอกสารมาอย่างพอเพียง เพื่อให้ได้ความรู้ใหม่ที่ต่อยอดออกไปจากความรู้เดิม

งานวิจัยต่าง ๆ ที่ทำมาที่เกี่ยวข้องกับไบโอดีเซล จะมีงานแบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ คือศึกษาน้ำมันชนิดที่เหมาะสมกับการผลิตไบโอดีเซล ศึกษาหาตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมต่อการผลิต ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล และทดสอบสภาวะการทำงานของเครื่องยนต์ที่ใช้ไบโอดีเซล

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จะนำความรู้ที่ได้รวบรวมมาเพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

- 1 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อ immobilized lipase activity ในสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

2 เพื่อศึกษา kinetic parameters และ kinetic model สำหรับปฏิกิริยาการเกิดไบโอดีเซลเมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง

3 เพื่อศึกษาใช้วิธีการผลิตไบโอดีเซลในระบบต่อเนื่อง และหาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อผลได้ของไบโอดีเซล และความบริสุทธิ์

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

เพื่อที่จะได้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย การดำเนินการวิจัยจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

1 ศึกษาเอนไซม์ไลเปส โดยไลเปสที่ใช้จะเป็นไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งมีการวิจัยเบื้องต้นว่าจะมีความสามารถในการตัดสายโซ่ของไตรกลีเซอไรด์ แบบสุ่ม งานวิจัยนี้จะศึกษาแอกติวิตี้ของไลเปสในการย่อยน้ำมันปาล์ม โดยจะมีการตรึงเอนไซม์ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี entrapment และจะศึกษาถึงผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อการย่อยไตรกลีเซอไรด์ ปัจจัยเหล่านี้เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง อัตราเร็วในการผสม เป็นต้น

2 ศึกษา kinetic parameters และ kinetic model สำหรับปฏิกิริยาการเกิดไบโอดีเซลเมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง ซึ่งจะมีการทดลองแบบกะ (batch) ในถังปฏิกรณ์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้คงที่

3 ต้องมีการออกแบบถังปฏิกรณ์เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลเมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง และมีการทดสอบใช้ถังปฏิกรณ์นั้น และมีการศึกษาผลของ hydraulic retention time ต่อเปอร์เซ็นต์ผลได้ของไบโอดีเซล

เอกสารอ้างอิง

Mittelbach M. and Tritthart P., Emissions tests using methyl esters of used frying oil, *Journal of the American oil chemists society*, 65(7),1988, p 1185-1187

<http://www.aopdm02.doae.go.th/black>

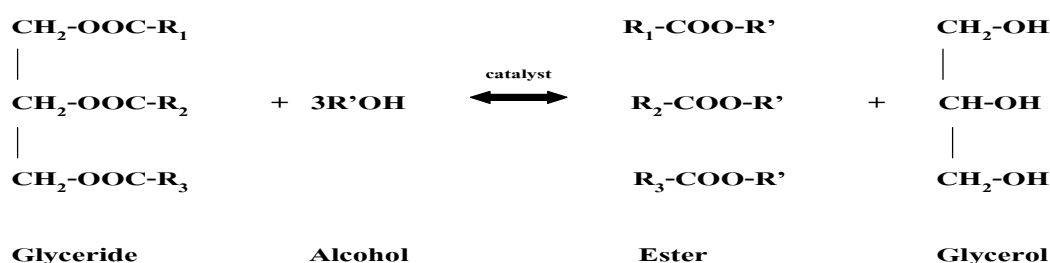
บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่สามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร จึงถือได้ว่าเป็นพลังงานที่มีหมุนเวียนได้ตลอด (renewable energy) ไบโอดีเซลสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ระหว่างน้ำมันพืช และแอลกอฮอล์โดยต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ผลผลิตที่ต้องการในอุณหภูมิที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรืออาจเรียกว่า แอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) เป็นการแทนกลุ่มแอลกอฮอล์ลงไปไนโตรกลีเซอไรด์เพื่อให้ได้เป็นเอสเทอร์ เพื่อลดความหนืดของน้ำมันพืช หรือน้ำมันจากสัตว์

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันอาจเขียนได้ดังนี้



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ กับแอลกอฮอล์

ที่มา: (Fukuda และคณะ, 2001)

ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันชนิดต่าง ๆ จะมีคุณสมบัติทางกายภาพต่างกัน จึงต้องมีการกำหนดมาตรฐานของไบโอดีเซล ปัจจุบันที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายจะมี 2 มาตรฐาน คือ มาตรฐาน ASTM ของสหรัฐอเมริกา และมาตรฐาน DIN ของเยอรมันนี้ ตาราง 2.1 เป็นตัวอย่างของมาตรฐานน้ำมันตาม ASTM

ตาราง 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพที่กำหนดตามมาตรฐาน ASTM

	ไบโอดีเซล	ดีเซล
kinematic viscosity , cSt	1.9-6	12 -15 (40°C)
cetane number,	30-45	51
Lower heating value, MJ/L	38.5	35.5
Cloud point, °C	-15-6	-
Flash point, °C	100	-
Density, g/L	0.8-0.9	0.83

2.1 ปัจจัยสำคัญในการผลิตไบโอดีเซล

ปัจจัยสำคัญในการผลิตไบโอดีเซลให้มีคุณภาพตามกำหนด มีหลายปัจจัย ดังนี้

1 น้ำมันที่ใช้ มีรายงานการวิจัยการทำไบโอดีเซล โดยใช้น้ำมันพืชหลาย ๆ ชนิด (Pizarro and Park, 2003) ทั้งน้ำมันพืชที่ไม่ผ่านการปรุงแต่ง น้ำมันพืชกึ่งบริสุทธิ์ น้ำมันพืชบริสุทธิ์ และน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว นอกจากนี้ยังแบ่งออกเป็นน้ำมันพืช พวกที่บริโภคได้ และน้ำมันพืชที่บริโภคไม่ได้ ตัวอย่างจากงานวิจัย ได้แก่ น้ำมันรำข้าว (Zullaikah et al., 2005) น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (Antolín et al., 2002) น้ำมันถั่วเหลือง (Noureddini et al., 2005) น้ำมันปาล์มดิบ (น้ำมันปาล์มที่ผ่านการแยกยางเหนียว) น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ (Kalam and Masjuki, 2002) น้ำมันจากเมล็ดเรป (rapeseed oil) (Saka and Kusdiana, 2001) น้ำมันทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร (Al-Widyan and Al-Shyoukh, 2002, และ Zhang et al., 2003) หรือแม้แต่ไขมันจากสัตว์ (Goodrum, 2002) น้ำมันแต่ละประเภทจะยังไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ได้ทันที ต้องมีกระบวนการตัดโซ่ของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ให้เป็นโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) เสียก่อน การตัดโซ่ของไตรกลีเซอไรด์จะทำโดยตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใส่เข้าไป คุณสมบัติของน้ำมันอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลก็คือ จำนวนพันธะคู่ และพันธะเดี่ยวในโมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งถ้าโมโนกลีเซอไรด์นั้นมีจำนวนพันธะเดี่ยวมาก จะทำให้ไบโอดีเซลที่มีอุณหภูมิจุดหมอก (cloud point) สูง (Knothe, 2004) ซึ่งจะส่งผลต่อการใช้น้ำมันในฤดูที่มีอุณหภูมิต่ำ เช่นในประเทศเขตหนาว ในประเทศไทยมีผลผลิตของน้ำมันปาล์มมาก ส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร แม้ว่าจะมีการวิเคราะห์ว่าน้ำมันปาล์มที่ผลิตได้จะไม่เพียงพอที่จะใช้ในประเทศ แต่ก็ได้มีการวางแผนในการเปิดการนำเข้าเสรีจากประเทศเพื่อนบ้าน จึงคาดว่าน้ำมันปาล์มจะเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทย

2 แอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้นของการทำปฏิกิริยาที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล โดยทั่วไปแล้วสามารถใช้แอลกอฮอล์สายสั้นที่มีคาร์บอนในระดับ 1-4 ตัว ซึ่งอาจจะเป็น primary alcohol, secondary alcohol หรือ tert-alcohol ก็ได้ ซึ่ง แอลกอฮอล์ที่ใช้มากที่สุดคือ เมทานอลซึ่งมีราคาถูก คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีเหมาะสมที่จะใช้ทำปฏิกิริยา และจะให้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูง (Gryglewicz, 1999) ไบโอดีเซลที่ได้ อาจถูกเรียกว่าเป็นเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) ซึ่งเป็นเอสเทอร์ที่มีค่าความหนืดต่ำกว่าเอสเทอร์จากแอลกอฮอล์ตัวอื่นเมื่อใช้น้ำมันชนิดเดียวกัน (May et al., 2005) อย่างไรก็ตามเมทานอลที่ใช้ในปัจจุบันเป็นผลผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แม้ว่าในประเทศจะมีก๊าซธรรมชาติอยู่มาก แต่ก็มีอยู่ในปริมาณจำกัด ส่วนเอทานอลสามารถผลิตได้จากการหมักของเหลือใช้หรือของเสียจากธรรมชาติ เช่นโมลาส จึงถือได้ว่าเป็นสารที่สามารถผลิตทดแทนได้ตลอดเวลา แม้ว่าจะยังให้เปอร์เซ็นต์ผลได้ของไบโอดีเซลต่ำกว่าเมทานอล แต่ก็ยังเป็นแอลกอฮอล์ที่น่าสนใจศึกษาปรับปรุง

3 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน มีทั้งกรด ต่าง (Kim et al., 2004) และ เอนไซม์ ซึ่งต่างที่ใช้ก็มีทั้ง โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ส่วนกรดที่ใช้ มี ไฮโดรคลอริก ซัลฟูริก ส่วนเอนไซม์เป็นเอนไซม์ไลเปส (lipase) (Iso et al., 2001) ปัจจุบันมีรายงานว่าต่างจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลได้สูงสุดและใช้เวลาน้อยที่สุด แต่ปัญหาของการใช้ต่างก็คือ ข้อแรกอาจเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เมื่อแอลกอฮอล์ทำปฏิกิริยากับต่างเกิดเป็นสบู่ทำให้เปอร์เซ็นต์ผลได้ลดลง ข้อที่สองไบโอดีเซลที่ได้จะต้องนำมาล้างหลายครั้งเพื่อล้างต่างที่เหลืออยู่รวมทั้งสบู่ที่อาจเกิดขึ้นเพื่อมิให้ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของน้ำมันและเครื่องยนต์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียต่าง และเป็นการสิ้นเปลืองน้ำ ข้อที่สามปฏิกิริยาที่ใช้ต่างจะต้องทำที่อุณหภูมิประมาณ 90-120 องศาเซลเซียส ซึ่งจำเป็นต้องใช้พลังงานประมาณ 0.5 เท่าของพลังงานที่ผลิตได้ในการผลิตไบโอดีเซลเอง ข้อสุดท้ายน้ำที่ออกมาจากกระบวนการผลิตโดยใช้ต่างจะมีความเป็นกรด-ด่างสูง มีสบู่ และมีแอลกอฮอล์ส่วนที่เหลือ มีน้ำมันบางส่วนติดมาด้วย ทำให้เป็นน้ำเสียที่มีค่าบีโอดีสูง ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดก่อนทิ้ง การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาก็มีข้อด้อยเช่นเดียวกับการใช้ต่าง จึงทำให้ปัจจุบันมีนักวิจัยหันมาวิจัยการใช้เอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซลมากขึ้น แม้ว่าจะต้องใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยานานกว่า (ประมาณ 12 ชั่วโมง) และเอนไซม์ก็มีราคาแพงกว่า แต่ข้อดีก็คือปฏิกิริยาเกิดได้ที่อุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส จึงใช้พลังงานต่ำกว่าในการผลิตไบโอดีเซล และการพยายามใช้เทคนิคการตรึงเอนไซม์ เพื่อที่จะลดการสูญเสียเอนไซม์ไปกับน้ำล้าง และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

4. สภาวะที่ใช้ในการผลิต ซึ่งหมายถึงถึงอุณหภูมิ ความดัน หรือค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้กรดหรือต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ถ้าหากที่ความดันบรรยากาศ จะต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 90-120 องศาเซลเซียส โดยปฏิกิริยาที่ใช้กรดจะต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่าปฏิกิริยาที่ใช้ต่างเล็กน้อย ส่วนปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะใช้อุณหภูมิในช่วง 40 – 50 องศาเซลเซียส เมื่ออยู่ในความดันบรรยากาศ แต่ต้องควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของสารให้อยู่ในช่วงที่เอนไซม์ทำงานได้ ซึ่งอยู่ในช่วง pH 6-8 นอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ต้องการตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ต้องทำในสภาวะเหนือวิกฤต (Kusdiana and Saka, 2001, และ Demirba, 2002) ซึ่งจะให้ไบโอดีเซลที่มีการปนเปื้อนน้อยกว่า แต่ใช้พลังงานในการผลิตมากกว่าแบบอื่น

5. อัตราส่วนเชิงโมลระหว่างน้ำมัน และแอลกอฮอล์ เมื่อดูจากการดุลปฏิกิริยาในสมการที่ 1 พบว่าต้องใช้แอลกอฮอล์ 3 โมลต่อกรดไขมัน 1 โมล แต่ในทางปฏิบัติแล้ว จำเป็นต้องใช้อัตราส่วนของแอลกอฮอล์มากกว่า stoichiometric ratio เนื่องจากว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เป็นปฏิกิริยผันกลับได้ จึงจำเป็นต้องใช้สารตั้งต้นตัวหนึ่งให้มากเกินไป เพื่อที่จะได้ผลลัพท์ปฏิกิริยาไปทางขวาและเกิดผลิตภัณฑ์ที่มากที่สุดได้ การใช้แอลกอฮอล์ที่มากเกินไปทำให้ต้องมีการกำจัดออกหลังปฏิกิริยาลิ้นสุด โดยแอลกอฮอล์จะแยกชั้นออกจากไบโอดีเซลโดยการตั้งให้แยกชั้น ซึ่งจะแยกได้ง่ายถ้าใช้แอลกอฮอล์ที่มีความแรงขั้วสูง หรือพวก primary alcohol เช่นเมทานอล หรือเอทานอล ในรายงานวิจัยของ Lang และ

คณะ (Lang et al., 2001) แนะนำว่าควรใช้แอลกอฮอล์ต่อกรดไขมันในอัตราส่วน 6:1 เมื่อใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ถ้าใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอาจต้องใช้อัตราส่วนที่สูงกว่า และอาจสูงถึง 15:1 [Noureddini H. et al., 2005]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถลดปฏิกิริยาข้างเคียง และของเสีย ลดพลังงานที่ใช้ แต่ยังมีสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติม เช่นการลดระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา หรือสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหัวข้อถัดไปจะมุ่งประเด็นไปที่เอนไซม์

2.2 เอนไซม์ไลเปส

1 ข้อมูลทั่วไป: เอนไซม์ไลเปสมีชื่อเรียกตามระบบของ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) ซึ่งเป็นกลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในไขมัน และมีชื่อตามรหัส คือ EC.3.1.1.3 ซึ่งชื่อตามระบบนี้จะความหมายรวมถึง โมโนกลีเซอริเดส ไลเปสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ให้เป็น โมโน หรือไดกลีเซอไรด์ ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบในร่างกายสัตว์ และมนุษย์ เพื่อย่อยไขมันที่บริโภคเข้าไป ภายหลังจะมีการใช้ไลเปสในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร โดยจะมาใช้ในกระบวนการหมัก โดยที่นำไลเปสเนื่องจากจะทำหน้าที่ผลิตกลิ่นและรสในอาหาร (เป็นสารพวกเอสเทอร์) โดยมีรสเฉพาะตัวทำให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เช่นในผลิตภัณฑ์การทำเนยแข็ง ,เค้ก และช็อกโกแลต เป็นต้น โดยในระยะเริ่มแรกนั้นผลิตไลเปสได้จากเมล็ดพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลือง และถั่วเหลือง ในปัจจุบันไลเปสที่ใช้ในอุตสาหกรรม จะเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย หรือ รา ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas fluorescens*, *Candida rugosa*, *Rhizopus delemar*, และ *Mucor javanicus* เพราะไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าไลเปสจากพืชหรือสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็ว เพาะเลี้ยงได้ง่าย และสามารถเลือกความจำเพาะของเอนไซม์ได้ดีกว่า

2 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อแต่ละชนิดจะมีคุณลักษณะและความสามารถในการย่อยกรดไขมันในปฏิกิริยาได้ต่างกัน ขึ้นอยู่กับกลุ่มของกรดไขมัน ตำแหน่งที่เข้าทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ และสภาวะแวดล้อม ซึ่งจะแบ่งเป็นย่อยๆ ได้ดังนี้

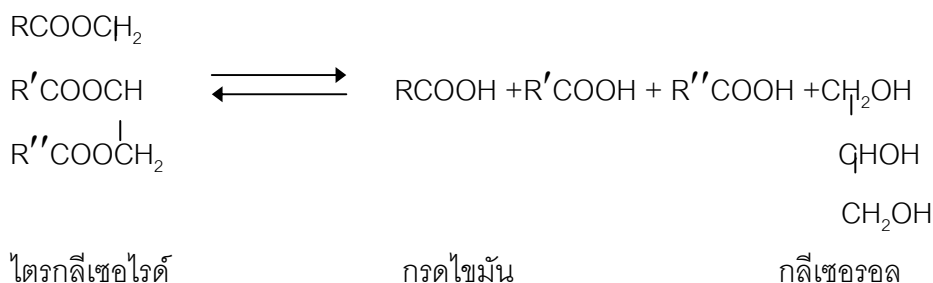
2.1 ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ไลเปสมีความสามารถในการไฮโดรไลสสารตั้งต้นกลุ่มไขมัน โดยเป็นความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่มีต่อกลุ่มไขมัน (lipid class specificity) คือสารตั้งต้นที่เป็นโมโนหรือไดหรือไตรเอทิลกลีเซอรอลความสามารถในการเร่งปฏิกิริยามีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งของไลเปส เช่นไลเปสจาก *Penicilium sp.* จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนกลีเซอรอล แต่ถ้าเมื่อสารตั้งต้นเป็นไดหรือไตรเอทิลกลีเซอรอลค่า activity จะลดลง แต่ในความจำเพาะของไล

เปส *Pseudomonas fluorescens* นอกจากจะขึ้นอยู่กับกลุ่มของไขมันแล้วยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิด้วย (Malcata et al., 1990)

2.2 ความจำเพาะต่อตำแหน่ง สามารถที่จะจำแนกไลเปสได้ 2 กลุ่มคือ

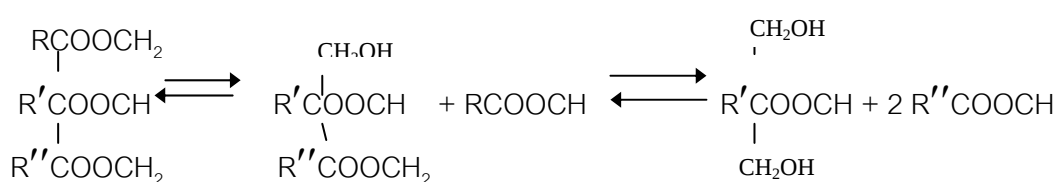
-ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ซึ่งกลุ่มนี้จะย่อย ไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารกึ่งกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea* , *Corynebacterium acnes* *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* (Malcata et al., 1990)

ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์จะเข้าทำปฏิกิริยาดังสมการข้างล่าง



รูปที่ 2.2 ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

-ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3) ไตรกลีเซอไรด์และ 2 โมโนกลีเซอไรด์ แต่ 1,2 (2,3) ไตรกลีเซอไรด์และ 1,3 ไตรกลีเซอไรด์จะไม่คงตัวถ้ามีการบ่มเป็นเวลานานพอจะเกิดขบวนการอะซิลไมเกรชัน (Acyl migration) ย่อยไตรกลีเซอไรด์ต่อ ทำให้ได้โมโนกลีเซอรอล 2 ตัว ซึ่งจะนับว่าเป็นการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเหมือนกับแบบแรก ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus nige* , *Mucor javanicus*, และ *Rhizopus spp.* เป็นต้นไลเปสจะเข้าทำปฏิกิริยาดังสมการด้านล่าง



รูปที่ 2.3 แสดงไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

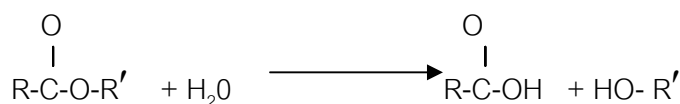
2.3 ความจำเพาะต่อกรดไขมัน กลไกของไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันขึ้นอยู่กับกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C_8) บางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลาง ($C_8 - C_{14}$) และบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดยาว (ตั้งแต่ C_{14} เป็นต้นไป) อัตราการไฮโดรไลส์กรดไขมันชนิดต่างๆของไลเปสแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น ไลเปสจาก *Candida parapolitytica* สามารถไฮโดรไลส์ไตรคาไพริน (tricaprylin, C_{10}) ได้เร็วกว่า แต่ไฮโดรไลส์พวงเมธิลบิวทีเรต (methyl butyrate, $C_{4:0}$), เมธิลคาโปรเอท (methyl caproate, $C_{8:0}$) และโมโนโอเลอิน (monoolein) ได้ค่อนข้างช้า แสดงว่า ไลเปสจาก *Candida parapolitytica* นี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลางมากกว่าขนาดสั้นและขนาดยาว

2.4 ความจำเพาะต่อสเตอริโอเคมี สารที่เป็นสเตอริโอเคมีสทรีเป็นสารประกอบที่มีลำดับของพันธะโคเวเลนต์มีตำแหน่งของ atom inspace สลับกันและพบว่า ไลเปสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อสเตอริโอเคมีแตกต่างกัน เช่น ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความจำเพาะที่ sn-1 เช่นไลเปสจาก *Humicola langginosa* และ *P. fluorescens* เป็นต้น

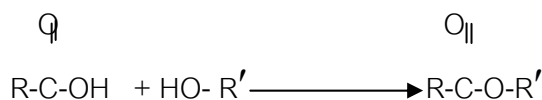
3 ปฏิกริยาของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสจะทำปฏิกิริยาต่อกรดไขมันได้หลายรูปแบบ คือ

- ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ

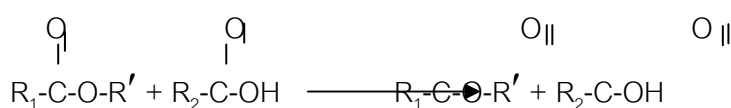


- ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาสังเคราะห์พันธะเอสเทอร์กลับคืนมา

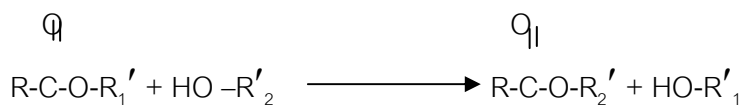


- ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เป็นปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ข้ามชนิดของกรดไขมัน จะแบ่งเป็น 4 ปฏิกิริยาย่อยดังนี้

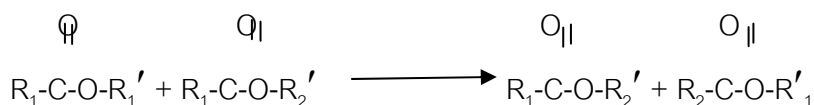
- Acidolysis



- Alcoholysis



- Esterexchange (interesterrification)



- Aminolysis



ปฏิกิริยาเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้พร้อมกัน แต่จะเกิดปฏิกิริยาใดมากน้อย ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมและปริมาณสารเช่น ถ้ามีน้ำอยู่ในปฏิกิริยามาก (มีค่า a_w สูง) จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดี แต่ในการผลิตไบโอดีเซลจะไม่ต้องการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพราะจะไปแข่งขันกับปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน จึงจำเป็นต้องจำกัดปริมาณน้ำ หรือลดปริมาณให้น้อยที่สุด แต่ก็ไม่สามารถลดปริมาณน้ำทั้งหมดลงได้ เพราะเอนไซม์จะทำงานได้ (มี activity) ในระบบจำเป็นต้องมีน้ำอยู่ด้วย (Halling, 1997)

4 การใช้ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล จะมีได้สองวิธีคือ การใช้แบคทีเรียทั้งตัวเพื่อผลิตเอนไซม์ในกระบวนการ (intracellular enzyme) และการสกัดใช้เอนไซม์แล้วจึงนำมาใช้ในกระบวนการผลิต (extracellular enzyme) ซึ่งการใช้เอนไซม์จะมีทั้งการใช้เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ที่ถูกตรึง โดยส่วนใหญ่แล้วจะมีการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงมากกว่า เนื่องจากสามารถใช้เอนไซม์ได้หลายครั้ง และเอนไซม์ยังสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ดีกว่า แต่การตรึงเอนไซม์อาจทำให้มีการสูญเสีย activity ไปได้บางส่วน

2.3 แบบจำลองกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

แบบจำลองที่ใช้อธิบายกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลจะใช้แบบจำลองแบบปิงปอง ไบ-ไบ (ping pong bi bi) เนื่องจากสารตั้งต้นจะมีสองตัวคือน้ำมันพืช และแอลกอฮอล์ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน และน้ำมันพืชที่ถูกย่อย เช่นถ้าสารตั้งต้นเป็นไตรกลีเซอไรด์ ผลิตภัณฑ์ที่

เหลือจะเป็นไดกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ก็จะเป็นสารตั้งต้นต่อไป เนื่องจากในกรณีนี้สารตั้งต้นตัวที่สองคือเอธานอล ซึ่งPizarro (2003) กล่าวว่าป็นพืชต่อเอนไซม์น้อยกว่าเมธานอล เราจึงตั้งสมมติฐานว่า สารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ไม่เป็นพืชต่อเอนไซม์ จึงสามารถใช้สมการปึงปองไบ ไบ แบบไม่มีสารยับยั้งมาใช้อธิบายแบบจำลองกิจกรรมเอนไซม์ได้ดังนี้

$$v = \frac{V_{\max} AB}{K_A B + K_B A + AB}$$

ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องมีเพียงบทความเดียวที่มีการหาค่าคงที่กิจกรรมเอนไซม์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล แต่เนื่องจากว่าในงานวิจัยชิ้นนั้นใช้เมทิลลซิติเตแทนแอลกอฮอล์ แต่เมทิลลซิติเตเป็นพืชต่อเอนไซม์ Xuและคณะจึงใช้แบบจำลองปึงปองไบ ไบ ชนิดมีสารตั้งต้นเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาแทน (Xu,2005)

เอกสารอ้างอิง

Al-Widyan M I. and Al-Shyoukh A O., **Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel**, *Bioresource Technology*, 85, 2002, p 253-256

Antolín G., F. V. Tinaut, Y. Briceño, V. Castaño, C. Pérez and A. I. Ramírez, **Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification** , *Bioresource Technology*, 83(2), June 2002, Pages 111-114

Demirba A., **Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol** , *Energy Conversion and Management*, 43(17), November 2002, Pages 2349-2356

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

Goodrum J W., **Volatility and boiling points of biodiesel from vegetable oils and tallow**, *Biomass and Bioenergy*, 22, 2002, p 205-211

Gryglewicz S., **Rapeseed oil methyl esters preparation using heterogeneous catalysts**, *Bioresource Technology*, 70(3), December 1999, Pages 249-253

Iso M., Baoxue Chen, Masashi Eguchi, Takashi Kudo and Surekha Shrestha, **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase**, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), 20 November 2001, Pages 53-58

Kalam M. A. and H. H. Masjuki, **Biodiesel from palm oil-an analysis of its properties and potential** , *Biomass and Bioenergy*, 23(6), December 2002, Pages 471-479

Kim H J, Bo-Seung Kang, Min-Ju Kim, Young Moo Park, Deog-Keun Kim, Jin-Suk Lee and Kwan-Young Lee, **Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogeneous base catalyst**, *Catalysis Today*, 93-95, 1 September 2004, Pages 315-320

Knothe G., **Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters**, *Fuel Processing Technology*, 2004,

Kusdiana D. and Saka S., **Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol**, *Fuel*, 80(5), April 2001, Pages 693-698

Lang X., Dalai A K., Bakshi N N., Reaney., and Hertz P B., **Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils**, *Bioresource Technology*, 80, 2001, p 53-62

May C Y., Liang Y C., Foon C S, Ngan M A., Hook C C., and Basiron Y., **Key fuel properties of palm oil alkyl esters**, *Fuel*, 2005,

Noureddini H., X. Gao and R.S. Philkana, **Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil**, *Bioresource Technology*, 96(7), May 2005, Pages 769-777

Pizarro, A V. L and Enoch Y. Park , **Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth**, *Process Biochemistry*, 38(7), 2003, Pages 1077-1082

Saka S. and Kusdiana D., **Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol**, *Fuel*, 80(2), January 2001, Pages 225-231

Pramanik K., **Properties and use of jatropha curcas oil and diesel fuel blends in compression ignition engine**, *Renewable Energy*, 28(2), February 2003, Pages 239-248

Vincente G., Martinez M. and Aracil J., **Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts system**, *Bioresource Technology*, 92, 2004, page 297-305

Xu Y., Du W., and Liu D., **Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor**, *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 32, 2005, Pages 241-245

Zhang Y., M. A. Dubé, D. D. McLean and M. Kate, **Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment**, *Bioresource Technology*, 89(1), August 2003, Pages 1-16

Zullaikah S., Lai C., Vali S R, and JuY., **A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil**, *Bioresource Technology*, 2005, In press

บทที่ 3

ปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์เนื่องจากการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเอนไซม์ไลเปสนั้นเอนไซม์จะทำหน้าที่ไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เป็นกรดไขมันซึ่งเพื่อทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์จนได้เอทิลเอสเทอร์ได้และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสขึ้นอยู่กับภาวะต่างๆ ในการดำเนินปฏิกิริยาเช่น ความเร็วรอบในการเขย่าและอุณหภูมิ [2]พบว่าความเร็วรอบในการเขย่าและอุณหภูมิมีผลต่อ Novozym 435 [4] เอนไซม์ไลเปส ผลิตจาก *Pseudomonas fluorescens* เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์โดยจะเกิดปฏิกิริยาเป็นแบบสุ่มและสามารถไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ถึง 58.8-78.9% [5] ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger* , *Mucor javanicus* *Rhizopus spp.*จะมีความจำเพาะในการตัดกรดไขมันจากตำแหน่ง1และ3บนไตรกลีเซอไรด์ทำให้ได้ปริมาณกรดไขมันแต่ละชนิดต่างๆแม้ว่าจะใช้น้ำมันจากพืชชนิดเดียวกัน[7] การใช้เอนไซม์อิสระในปฏิกิริยานั้นจะมีข้อเสียคือไม่สามารถที่จะนำเอนไซม์มาใช้ใหม่ได้และแยกเอนไซม์อิสระออกจากผลิตภัณฑ์นั้นทำได้ยากจึงได้มีวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ (Immobilized enzyme)[3]เพื่อสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ใช้วิธีการตรึงรูปแบบห่อหุ้มด้วยเจล[8] หรือ (Gel entrapping) เป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปเพราะสามารถทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากซึ่งมักจะใช้อัลจิเนตเพื่อเป็นเจลที่ใช้ในการห่อหุ้มเอนไซม์เนื่องจากอัลจิเนตเป็นสารจากธรรมชาติ ไม่มีพิษและราคาถูก น้ำมันปาล์ม ที่มักถูกเลือกใช้เป็นสารตั้งต้นใช้ในการผลิตเอสเทอร์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานภายในประเทศไทย น้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันคือ กรดไมริสติก(Myristic acid)1-6%กรดสเตียริก(Stearic acid)1-6 %กรดปาล์มมิติก(Palmitic acid)32-46%ในรูปของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดโอเลอิก(Oleic acid) 40-52%กรดไลโนลีนิก(Linoleic acid)5-7%ในรูปของกรดไขมันไม่อิ่มตัวรวมตัวอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์แต่อาจอยู่ในรูปกรดไขมันอิสระในปริมาณ 3-5%น้ำมันปาล์มดิบ เมื่อผ่านกระบวนการกำจัดสีแล้ว จะมีลักษณะเป็นของเหลวผสมเป็นของแข็งสีขาวหรือสีเหลืองมีชื่อว่า น้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวซึ่งมักจะนำมาใช้ในการผลิตเอสเทอร์ของแข็งด้านล่าง คือ ปาล์มสเตียริน (palm stearin) ของเหลวด้านบน คือ ปาล์มโอเลอิน (palm olein)

โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ และความเร็วของปฏิกิริยา ได้แก่ ชนิดของสารตั้งต้น ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อปริมาณเอนไซม์ ความเป็นพิษ ค่าความเป็นกรดต่างในขณะเกิดปฏิกิริยา อุณหภูมิขณะที่ใช้ทำปฏิกิริยา ความเป็นอิสระของเอนไซม์ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์จากน้ำมันปาล์มต่างๆเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์โดยอาศัยเอนไซม์ไลเปส

วิธีการทดลอง

วัตถุดิบและสารเคมี

- น้ำมันปาล์มทางการค้า (ชื่อทางการค้ามรกต)
- น้ำมันมะกอก
- น้ำมันปาล์มดิบแยกยางเหนียว จากบริษัท ชุมพรอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม จำกัด (มหาชน)

ซึ่งมีส่วนประกอบของกรดไขมัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียว

ส่วนประกอบของกรดไขมัน	ร้อยละกรดไขมัน
<u>กรดไขมันอิ่มตัว</u>	
กรดลอริก	0.2
กรดไมริสติก	0.8
กรดปาล์มมิติก	41.1
กรดสเตียริก	3.8
กรดอราซิดิก	0.2
<u>กรดไขมันไม่อิ่มตัว</u>	
กรดโอเลอิก	43.6
กรดไลโนลีนิก	9.6
กรดไลโนลีนิก	0.1
อื่นๆ	0.5

วิเคราะห์ : กรมวิทยาศาสตร์บริการ

- เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* (Fluka Co.,Ltd. ประเทศ
สหพันธ์รัฐสวิส)

- กรดโอเลอิกเกรดวิเคราะห์
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
- สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน
- เอทานอล 95%
- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เกรดวิเคราะห์
- โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ($\text{KC}_6\text{O}_4\text{H}_7$)
- โซเดียมอัลจิเนต
- แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

- อะซิโตน

- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)

การเตรียมเอนไซม์

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปส (10 w/v) ใน 0.1 โมล ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 แบ่งเป็นสองส่วนโดยส่วนแรกใช้เป็นเอนไซม์อิสระ ส่วนที่สองใช้วิธีตรึงเอนไซม์ในอัลจิเนตโดยใช้วิธีแบบห่อหุ้มด้วยเจล (gel entrapping) หยดโซเดียมอัลจิเนตด้วยเข็มฉีดยาลงในสารละลายกระด้างแคลเซียมคลอไรด์ 10% w/v ล้างด้วย 0.1 โมล ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 3 ครั้งๆ ละ 1 มล. เพื่อให้ได้เอนไซม์ตรึงรูปทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 -3.0 มม. เมื่อยังไม่ใช้จะเก็บรักษาไว้ใน 0.1 โมล ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 27 °ซ (หรือเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำทดลอง)

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้างจากการตรึงรูปในน้ำมันชนิดต่าง ๆ

เตรียมสารตั้งต้นซึ่งประกอบด้วย 1% w/v กัมอราบิกปริมาตร 10 มิลลิลิตร , 1M โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 19 มิลลิลิตร , 2% แคลเซียมคลอไรด์ปริมาตร 11 มิลลิลิตร และน้ำมันที่จะศึกษาปริมาตร 1 มิลลิลิตร [3] จากนั้นนำเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้างจากการตรึงรูปมาใส่ในสารตั้งต้นเขย่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 15 นาทีหยุดปฏิกิริยาและไตเตรทกับ 0.025 นอร์มอล โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

การศึกษาความเร็วรอบของการเขย่าที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันชนิดต่าง ๆ

เตรียมเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้างจากการตรึงรูปใส่ลงในสารตั้งต้นแต่ละชนิดที่มีปริมาตร 15 มล. ในขวดรูปชมพูนขนาด 125 มล. เขย่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 150, 200, 250, 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °ซ หากกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธี routine measurement of microbial lipase [2]

การศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันชนิดต่าง ๆ

เตรียมเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้างจากการตรึงรูปใส่ลงในสารตั้งต้นแต่ละชนิดปริมาตร 15 มล. ในขวดรูปชมพูนขนาด 125 มล. เขย่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 40, 45, 50 °ซ หากกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธี routine measurement of microbial lipase [2]

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

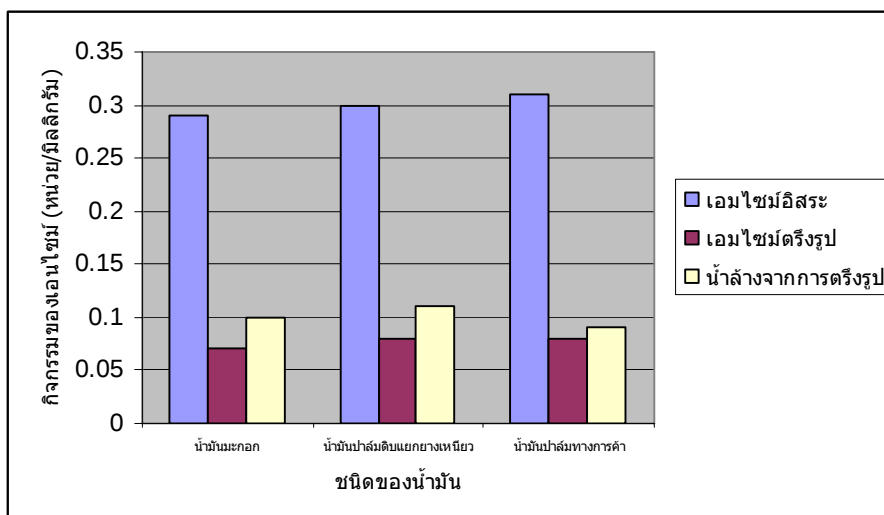
ลักษณะของเอนไซม์ตรึงรูป

ผลการศึกษาพบว่ารูปร่างของเอนไซม์ตรึงรูปมีลักษณะเป็นทรงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0 -3.0 มม. และมีปริมาณของเอนไซม์ตรึงรูปประมาณ 1.0 -2.0 กรัมหลังจากดำเนินปฏิกิริยาพบว่าขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลงเหลือประมาณ 1.0-1.5 มม. หรือขนาดเอนไซม์ตรึงรูปลดลงถึง 50 % และมี

รูปร่างไม่เป็นทรงกลม ส่วนของน้ำล้างจากการตรึงเอนไซม์อาจจะมีปริมาณของเอนไซม์ละลายอยู่ในน้ำล้างจึงทำให้ต้องศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ด้วย

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในน้ำมันชนิดต่างๆ

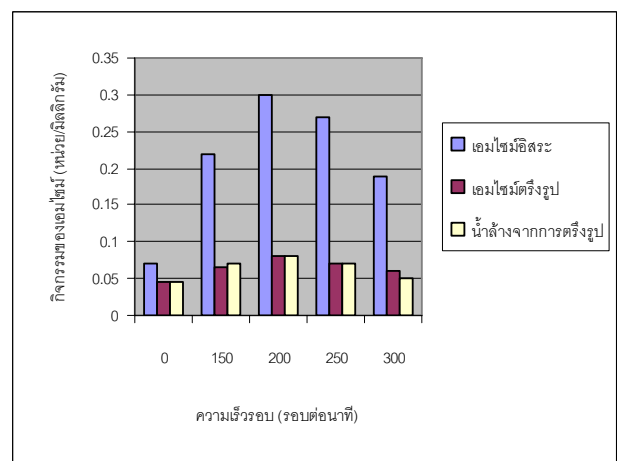
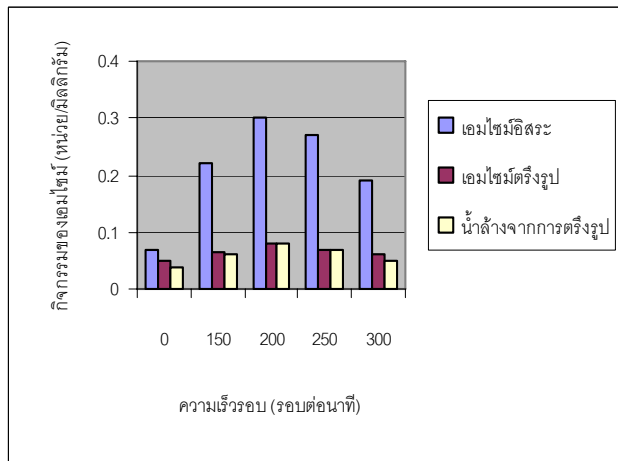
ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้างจากการตรึงรูปในน้ำมันปาล์มชนิดต่างๆ โดยใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปเติมลงในสารตั้งต้นของน้ำมันแต่ละชนิดจากนั้นไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีอุณหภูมิ 37 °C จากนั้นนำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปโดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ 1 หน่วย คือ ปริมาณกรดไขมัน 1 ไมโครโมลที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาการย่อยของน้ำมันที่ศึกษาในเวลา 1 ชั่วโมง[1] ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 1 พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มทางการค้าและน้ำมันมะกอกจึงทำให้เมื่อคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ที่มีต่อน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวแล้วจะได้ประสิทธิภาพสูงกว่า ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ต่อการการย่อยน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวต่อเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้างจากการตรึงรูปมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคือ 0.305 0.079 , 0.109 หน่วยต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์ ซึ่งสูงกว่าในสารตั้งต้นของของน้ำมันปาล์มทางการค้าและน้ำมันมะกอกในเวลา 15 นาทีโดยที่มีความสามารถของเอนไซม์อิสระในการย่อยน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มทางการค้าและน้ำมันมะกอกแตกต่างกันเล็กน้อยโดยย่อยน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มทางการค้า 1.32 เปอร์เซ็นต์และน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวได้ดีกว่าน้ำมันมะกอก 4.91 เปอร์เซ็นต์ กรณีความสามารถของเอนไซม์ตรึงรูปในการย่อยมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเอนไซม์อิสระคือน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มทางการค้า 2.53 เปอร์เซ็นต์และน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวได้ดีกว่าน้ำมันมะกอก 12.53 เปอร์เซ็นต์และกรณีความสามารถของน้ำล้างจากการตรึงรูปในการย่อยน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวได้ดีกว่าน้ำมันปาล์มทางการค้า 20.62 เปอร์เซ็นต์และน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวได้ดีกว่าน้ำมันมะกอก 10.09 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าเอนไซม์อิสระมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าเอนไซม์ตรึงรูปอยู่ 0.2971 หน่วยต่อมิลลิกรัมเอนไซม์หรือคิดเป็น 74.10 เปอร์เซ็นต์ในการตรึงรูปเอนไซม์จะใช้เอนไซม์อิสระ 1.15 กรัม นั้นส่วนของน้ำล้างจากการตรึงรูปมีเอนไซม์อิสระหลุดออกมาจากการตรึงรูปอยู่ 38.85 มิลลิกรัมและเอนไซม์ที่ตรึงรูปอยู่ 1.11 กรัม จะเห็นว่าการตรึงรูปแบบห่อหุ้มด้วยเจล หรือ (Gel entrapping) จะทำให้เอนไซม์อิสระหลุดออกจากการตรึงรูปคิดเป็น 3.37 เปอร์เซ็นต์และการตรึงรูปสามารถกักเอนไซม์ได้ 96.63 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารตั้งต้นน้ำมันแต่ละชนิด

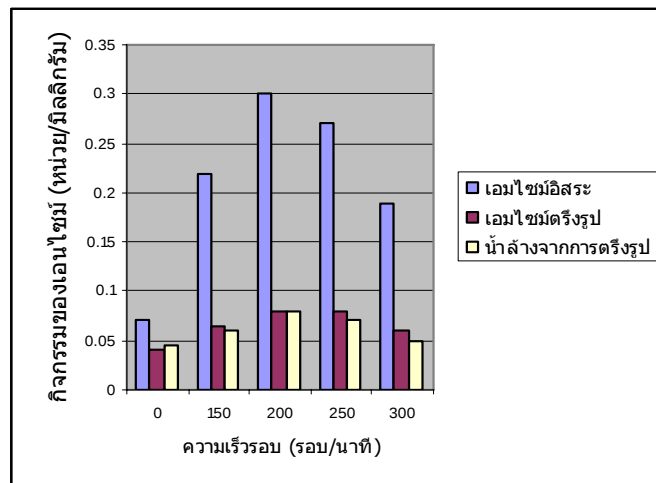
ผลของความเร็วยรอบของการเขย่า

ผลการศึกษาความเร็วยรอบในการเขย่าที่มีผลต่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำมันชนิดต่างๆโดยศึกษาความเร็วยรอบที่ 0,150,200,250,300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 40 °C จากนั้นหา กิจกรรมของเอนไซม์ ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 2 พบว่าที่ความเร็วยรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาทีนั้นมีค่า กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าความเร็วยรอบในการเขย่าอื่นๆ ทั้งในเอนไซม์อิสระ,เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้าง จากการตรึงรูปในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามลำดับดังนี้ 0.305 ,0.079 ,0.109 หน่วยต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์ในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มมีกิจกรรมของเอนไซม์ ตามลำดับดังนี้ 0.301 ,0.077 ,0.087 หน่วยต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์และสารตั้งต้นของน้ำมันมะกอกมีค่า กิจกรรมของเอนไซม์ตามลำดับดังนี้ 0.29 ,0.071 ,0.068 หน่วยต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์เนื่องจากอัตราเร็ว ที่ใช้ในการเขย่ามีผลต่อการกระจายตัวและการถ่ายเทมวลสาร(mass transfer)โดยพบว่าความเร็วยรอบใน การเขย่าที่ 100และ150 รอบต่อนาทีนั้นจะทำให้มีการกระจายตัวของสารน้อยและมีการถ่ายเทมวลสาร น้อยด้วย ที่ความเร็วยรอบในการเขย่า 250และ300รอบต่อนาทีนั้นเป็นความเร็วยรอบที่สูงเกินไปจึงจะทำให้ อากาศเข้าไปในสารละลายไลเปสระหว่างการค้าเนินปฏิกิริยาได้ง่ายทำให้เอนไซม์เกิดการออกซิเดชันได้ [1] และพบว่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิดที่ความเร็วยรอบต่างๆ ไปทางเดียวกัน[5]ในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียว,น้ำมันปาล์มและน้ำมันมะกอก



(ก)

(ข)



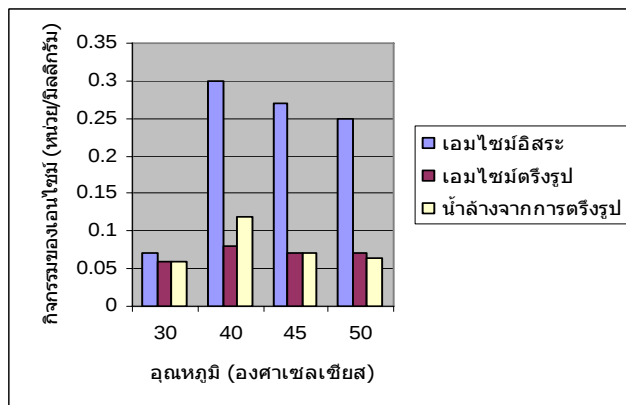
(ค)

รูปที่ 3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วรอบและกิจกรรมของเอนไซม์ (ก) น้ำมันปาล์มดิบแยกยางเหนียว (ข) น้ำมันปาล์มทางการค้า (ค) น้ำมันมะกอก

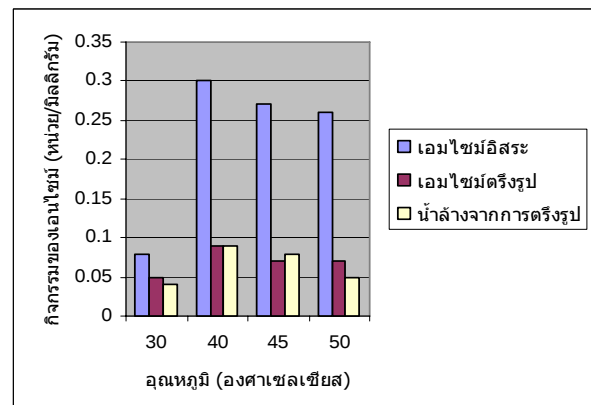
ผลของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์ไลเปสในน้ำมันชนิดต่างๆโดยใช้ อุณหภูมิคือ 30, 40, 45, 55 °C เป็นเวลา 15 นาที ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นหา กิจกรรมของเอนไซม์ ปกติแล้วเอนไซม์ไลเปสนั้นสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 30-40 °C [1] ถ้ามี อุณหภูมิสูงกว่าที่เหมาะสมจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์มีพลังงานมากเกินไปจนเกิดการสูญเสียสภาพของ เอนไซม์ และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescents* สามารถทนความร้อนได้อยู่เมื่ออุณหภูมิ 60 °C ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 60 เปอร์เซ็นต์ [6] ผลที่

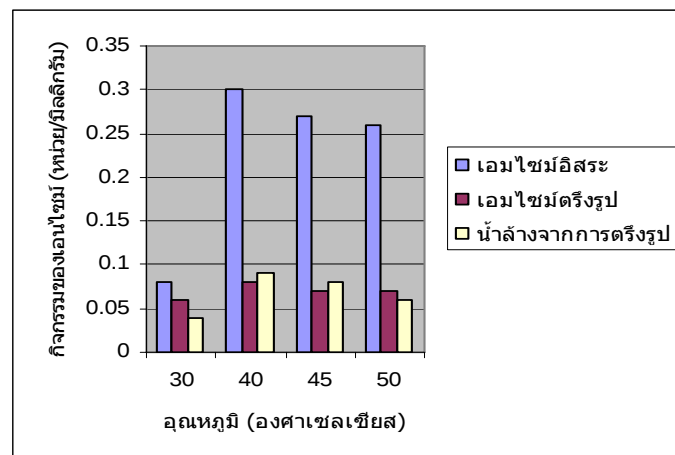
ได้แสดงดังรูปที่ 3 พบว่า อุณหภูมิ 40 °ซ เอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้างจากการตรึงรูปในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวมีกิจกรรมของเอนไซม์ตามลำดับดังนี้ 0.304 ,0.080 ,0.11 หน่วยต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์ในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามลำดับดังนี้ 0.32 ,0.078 ,0.089 หน่วยต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์และในสารตั้งต้นของมะกอกมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามลำดับดังนี้ 0.29 ,0.069 ,0.098 หน่วยต่อมิลลิกรัมของเอนไซม์และพบว่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิต่างๆไปทางเดียวกัน[5]ในสารตั้งต้นของน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะกอก



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและกิจกรรมของเอนไซม์ (ก) น้ำมันปาล์มดิบแยกยางเหนียว (ข) น้ำมันปาล์มทางการค้า (ค) น้ำมันมะกอก

สรุปผลการทดลอง

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปและน้ำล้างจากการตรึงรูปในสารตั้งต้นน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวจะสูงกว่าน้ำมันที่ทำการศึกษาอีก 2 ชนิดและค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระมากกว่าเอนไซม์

ตรึงรูปถึง 74.10 เปอร์เซ็นต์สภาวะที่มีทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาทีและอุณหภูมิ 40^oซ

เอกสารอ้างอิง

[1]เสาวนีย์ เหมทานนท์ ,2541.การใช้ไลเปสจาก *Candida cylindracea* เร่งปฏิกิริยากลีเซอไรไลซิสของน้ำมันหมูเพื่อผลิตโมโนกลีเซอไรด์. วิทยานิพนธ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[2] Charles L. San Clemente and Dharam V. Vadehra, Instrumental Assay of Microbial Lipase at Constant pH, 1967, Applied Microbiol. ,15(1): 110–113.

[3] Ganapati D. Yadav, Piyush S. Lathi, Lipase catalyzed transesterification of methyl acetoacetate with *n*-butanol,(2005) Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 32,107–113

[4] Mohame, Soumanou,Uwe T.Bornscheuer
Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl ester from sunflower oil (2003)
Enzyme and Microbial Technology,33: 97-103

[5]P. Ellaiah., T. Prabhakar, B. Ramakrishna, A. Thaer Taleb, K. Adinarayana ,(2004) ,
Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger* ,Process Biochemistry 39: 525–528

[6] Lee,Y.Y,M.Lamsa,A.Huhtalaand P.Linko (1989) Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil and 2-ethyl-1-hexanol.JAOCS71: 1411-1414

[7] Yuji Shimada, Yomi Watanabe, Akio Sugihara, Yoshio Tominaga, (2002)Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing ,Journal of Molecular Catalysis ,17 , 133–142

[8] ZoricaKnezevic,Aleksandra,Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system, 2002, Process Biochemistry, 38:313-318

บทที่ 4

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

การสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์โดยมีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Pseudomonas fluorescens* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะให้ปริมาณของเอทิลเอสเทอร์ในปริมาณที่ต่างกันในแต่ละภาวะต่างๆ ในการดำเนินปฏิกิริยา โดยสภาวะที่มีผลต่อการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่อัตราส่วนโดยโมล, อุณหภูมิ, ความเร็วรอบการเขย่าและ pH

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันกับแอลกอฮอล์มีผลต่อการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเนื่องจากปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาผันกลับได้ อัตราส่วนโดยโมลมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาไปข้างหน้า หรือลดปฏิกิริยาย้อนกลับ รวมทั้งผลักดันให้เกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ ซึ่งงานวิจัยของFukuda และคณะพบว่าอัตราส่วนระหว่างน้ำมันดอกทานตะวันต่อเมทานอลที่ให้ปริมาณเอสเทอร์สูงสุด คือเมื่อใช้อัตราส่วน 1:4.5 และใส่เอนไซม์ตรึงรูปของ *Rhizomucor miehei* ลงในน้ำมันประมาณ 5 ชั่วโมงก่อนที่จะใส่เมทานอลลงไป ปฏิกิริยานี้จะให้ค่าคอนเวอร์ชันมากกว่า80เปอร์เซ็นต์ (Fukuda, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อ Ganapati และคณะใช้ปฏิกิริยาในรูปแบบเดียวกันและเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับน้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน จะให้ผลที่ดีกว่า คือ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อเมทานอลที่เหมาะสมในการทดลองคือ 1 ต่อ 3.4 จะได้ปริมาณเอสเทอร์เท่ากับ 92.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 6 ชั่วโมง (Ganapati, 2001) ส่วนปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสระหว่างน้ำมันที่เหลือใช้ทางการค้ากับเมทานอลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาคือเอนไซม์ตรึงรูปจาก *Candida antarctica* โดยมีการเติมเมทานอลลงไปทีละน้อยเป็นระยะ ๆ พบว่า ระหว่างน้ำมันที่เหลือใช้ทางการค้ากับเมทานอลที่เหมาะสมคือ 1 ต่อ 3 (Ellaiyah, 2004)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจะแตกต่างกันไป เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิดนั้นสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน นอกจากนี้เอนไซม์ชนิดเดียวกันก็ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่างกันเมื่อใช้สารตั้งต้นแตกต่างกัน Shimada และคณะพบว่าช่วงอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันดอกทานตะวัน โดยการทดลองใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่สภาวะคงที่ แต่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในช่วงการใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 20ถึง60 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิปริมาณของเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นและเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่าได้ปริมาณของเอสเทอร์มากที่สุดคือ 29.9เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจะทำให้ปริมาณเอสเทอร์จะลดลง ส่วนในการทำปฏิกิริยาจากน้ำมันรำข้าวโดยใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกันในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของเอสเทอร์เกิดขึ้นสูงสุดที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตเอสเทอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 62.3เปอร์เซ็นต์และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจะทำให้ปริมาณเอสเทอร์จะลดลงเช่นกัน (Shimada,2002) และเมื่อ Chen-Jech-Wi ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกับ Shimada คือ

Candida antarctica ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพียง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างคือ 1 ต่อ 3 พบว่าจะให้ค่าคอนเวอร์ชันเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเมทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยานี้ (Chen-Jech-Wi, 2001)

ความเร็วรอบการเขย่าจะส่งผลต่อการถ่ายเทมวลของเอนไซม์ไลเปสตรังรูป Nouredдини ทำปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจากน้ำมันพืชโดยใช้ความเร็วในการกวนที่แตกต่างกันคือ ที่ความเร็วรอบ 150, 250, 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าช่วงแรกปริมาณเอสเทอร์เพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วรอบในการกวนเพิ่มขึ้น แต่แล้วปริมาณของเอสเทอร์กลับลดลงเมื่อความเร็วรอบสูงกว่า 250 รอบต่อนาที (Nouredдини .H, 2005)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิดมักจะทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดต่างค่าหนึ่ง ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส (Soumanou, 2003) Krishna และคณะพบว่าเมื่อปรับสารตั้งต้นให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 7.0 จะทำให้ปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส ระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองแยกยางเหนียวกับสารละลายเมทานอลในคลอโรฟอร์ม เกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่สุด เมื่อโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา คือเอนไซม์ตรังรูปจาก *Candida Antarctica* และค่อย ๆ เติมเมทานอลเป็นระยะ พบว่า ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 93.2 เปอร์เซ็นต์ (Krishna, 2001)

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์โดยอาศัยเอนไซม์ไลเปส

วิธีการทดลอง

1 วัตถุประสงค์และสารเคมี

1.1 การตรึงเอนไซม์

- เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* (Fluka Co., Ltd. ประเทศสมาพันธรัฐสวิส)

- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

- โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ($\text{KC}_6\text{O}_4\text{H}_7$)

- โซเดียมอัลจิเนต

- แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)

1.2 การสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

- สารมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี
- เอทิลปาล์มมิเตท ($C_{18}H_{36}O_2$)
- เอทิลโอเลอเทท ($C_{20}H_{38}O_2$)
- เมทิลเพนตะดิกาโนเอต ($C_{16}H_{32}O_2$)
- เฮกเซน (C_6H_{14})
- อะซิโตน (Acetone)

1.3 อุปกรณ์

- เครื่องเย้าควบคุมอุณหภูมิ
- แก๊สโครมาโตกราฟี VARIAN รุ่น CP 3800 ดีเทคเตอร์เป็นแบบ Flame Ionization (FID)
- คอลัมน์ Capillary column (DB-5 COLUMN 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร)

1.4 การเตรียมเอนไซม์

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปส (10% w/v) ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5) ใช้วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีกักในช่องตาข่ายของโซเดียมอัลจิเนต โดยการใช้เข็มฉีดยาหยดสารผสมเอนไซม์ไลเปสและโซเดียมอัลจิเนตลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (10% w/v) ล้างด้วย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5) ครั้งละ 1 มิลลิลิตร 3 ครั้ง จะได้เอนไซม์ตรึงรูปลักษณะทรงกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ทำการเก็บรักษาไว้ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส (ปรเมษฐ์ และ สิ้นสุภา, 2549)

1.5 การเตรียมน้ำมันปาล์มน้ำมันปาล์มโอลิอินโดยวิธี Crystallization

เตรียมน้ำมันปาล์มดิบที่แยกยางเหนียวต้มจนน้ำมันปาล์มแยกยางเหนียวละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นจนน้ำมันปาล์มแยกออกเป็น 2 ชั้น ทำการกรองแยกของเหลวใสที่เหลือส่วนบน (น้ำมันปาล์มโอลิอินดิบ) ไปใช้ในการทดลองต่อไป

2 สภาวะที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.1 ศึกษาอัตราส่วนโมลน้ำมันปาล์มโอลิอินต่อเอทานอลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

เตรียมน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบและเอทานอล ที่อัตราส่วนโมลน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบต่อเอทานอล ดังนี้ 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 เติมน้ำมันไลเปสตรึงรูป 2.5 กรัมลงในน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาตัดสายไตรกลีเซอไรด์ เติมน้ำมันแอลกอฮอล์ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอินที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ตามอัตราส่วนต่างๆ

2.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

เตรียมน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบและเอทานอลที่อัตราส่วนโมลน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบต่อเอทานอลที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์มากที่สุดจากการทดลองที่ 2.3.1 เดิมเอนไซม์ไลเปสตรังรูป 2.5 กรัมลงในน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบเขย่า ด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เปลี่ยนแปรอุณหภูมิดังนี้ 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส

2.3 ศึกษาความเร็วรอบการเขย่าที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

เตรียมน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบและเอทานอล ที่อัตราส่วนโมลน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบต่อเอทานอลที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์มากที่สุดจากการทดลองที่ 2.4.1 เดิมเอนไซม์ไลเปสตรังรูป 2.5 กรัมลงในน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบ เดิมเอทานอล ลงในน้ำมันปาล์มโอลิอินที่มีเอนไซม์ไลเปสตรังรูป เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิใช้อุณหภูมิที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์มากที่สุดจากการทดลองที่ 2.4.2 เปลี่ยนแปรความเร็วรอบการเขย่าดังนี้ 150 200 250 และ 300 รอบต่อนาที

2.4 ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

เตรียมน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบและเอทานอล ที่อัตราส่วนโมลน้ำมันปาล์มโอลิอินดิบต่อเอทานอลที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์มากที่สุดจากการทดลองที่ 2.4.1 เดิมเอนไซม์ไลเปสตรังรูปที่เตรียมจาก 0.1 M phosphate buffer pH 5.0 7.0 7.5 และ 9.0 ปริมาณ 2.5 กรัมลงในน้ำมัน เดิมเอทานอล เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิใช้อุณหภูมิที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์มากที่สุดจากการทดลองที่ 2.4.2 และความเร็วรอบการเขย่าที่ให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์มากที่สุดจากการทดลองที่ 2.4.3

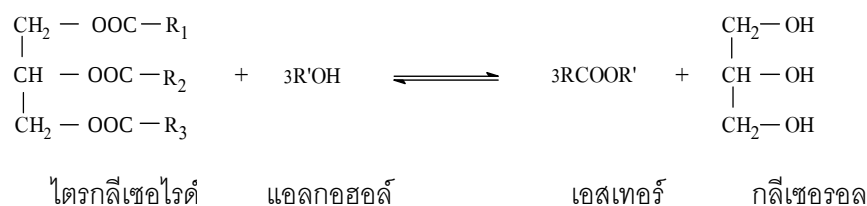
2.5 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอทิลเอสเทอร์

ซึ่งสารตัวอย่าง 15 mg เดิม Internal Standard (เมทิลเพนตะดิกาโนเอต) 50 μL ปรับปริมาตรด้วย n- Hexane จนได้ปริมาตรรวม 500 μL การทดลองนี้ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี VARIAN รุ่น CP 3800 ดีเทคเตอร์เป็นแบบ Flame Ionization (FID) ที่อุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียส ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซพา อัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ Injection 275 องศาเซลเซียส ที่สภาวะอุณหภูมิกำหนด 3 ขั้นตอน คือ ที่ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพิ่มด้วยอัตรา 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 270 องศาเซลเซียสคงที่นาน 5 นาที

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล

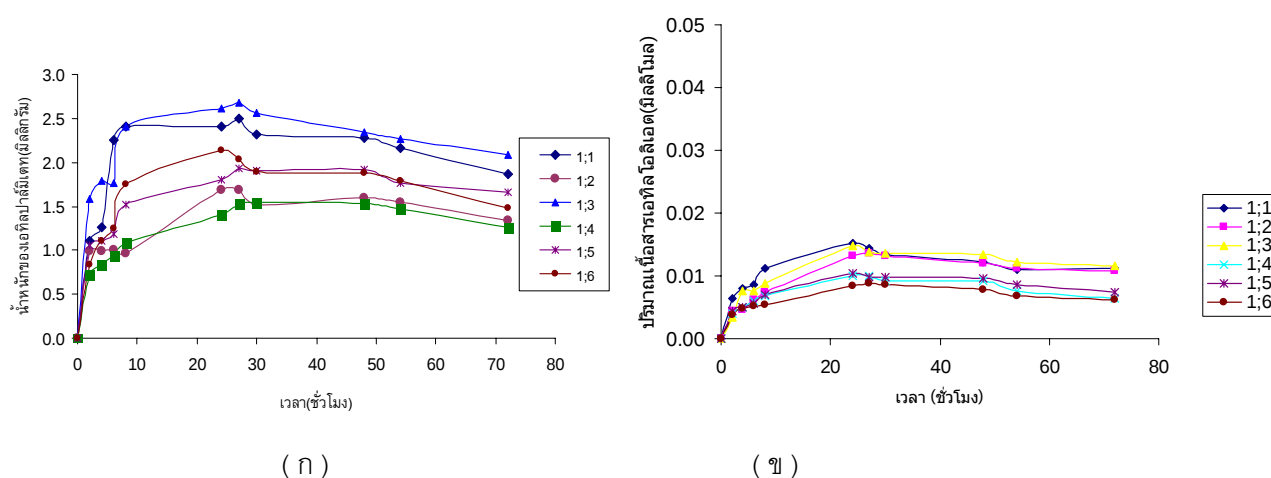
อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลที่มีต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามสมการปฏิกิริยาในรูปที่ 1 ซึ่งเป็นการบอกถึงดุลโมลระหว่างน้ำมันกับเอทานอล พบว่าสมดุลโมลระหว่างน้ำมันกับเอทานอลที่ใช้ควรจะเป็น 1:3 จะสามารถให้ปริมาณของเอทิลเอสเทอร์ที่มากกว่าสมดุลโมลอื่นและการทดลองของ Nouredini .H,(2005) ก็ยืนยันเช่นนั้น



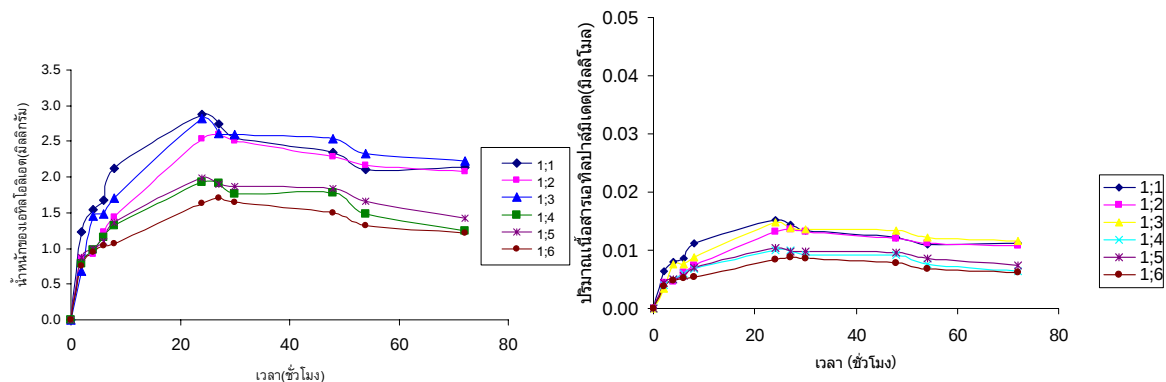
รูปที่ 4.1 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

ส่วนการทดลองนี้ทำการศึกษาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอลคือ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, และ 1:6 จากรูปที่ 4.2 และ 4.3 พบว่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล 1:3 จะให้เปอร์เซ็นต์ของเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอเลตได้สูงที่สุด เนื่องจากเป็นไปตามสมดุลโมลระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ในการทำปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

กรณีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล 1:1 จะมีเจลสีขาวของน้ำมันอยู่ทางด้านล่างเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสนั้นสามารถตัดสายโซ่ของไตรกลีเซอไรด์ได้ดีแต่ไม่สามารถที่จะทำปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ทันทีจึงทำให้กรดไขมันอิสระนั้นเกิดเป็นเจลสีขาว (Smith, 2003)



รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอทิลโอเลต ในหน่วยมวล (ก) และหน่วยโมล (ข) กับเวลาใน แต่ละอัตราส่วนน้ำมันปาล์มโอลิอินกับเอทานอล



(ก)

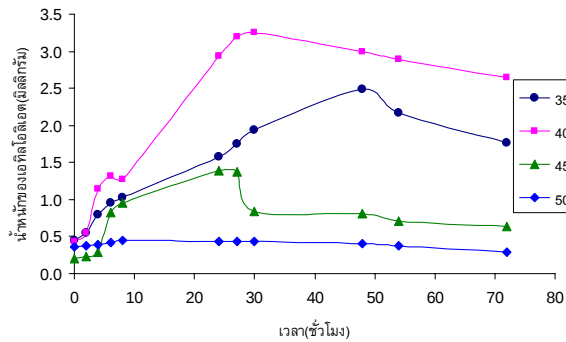
(ข)

รูปที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเอทิลปาล์มิตในหน่วยมวล (ก) และหน่วยโมล (ข) กับเวลาแต่ละอัตราส่วนน้ำมันปาล์มโอลีนีระหว่างกับเอทานอล

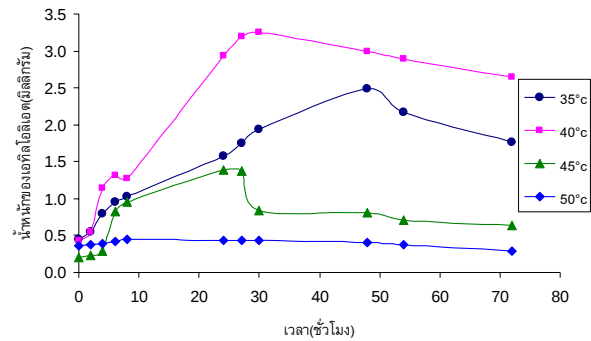
ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเนืองจากเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถทนต่ออุณหภูมิไม่เท่ากันเช่นจาก *Candida antarctica* มีความสามารถทนต่ออุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส (Chen-Jech-Wi,2001) ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescents* ความสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 – 45 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลง

ดังนั้นการทดลองนี้แสดงถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณของปริมาณเอทิลปาล์มิตและเอทิลโอลิเอตโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 35,40,45,50 องศาเซลเซียสจากรูปที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าอุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียสปริมาณเอทิลปาล์มิตและเอทิลโอลิเอตลดลงกว่า 3 เท่า เนื่องจากอุณหภูมียังไม่สูงที่จะทำให้ทำงานได้อย่างเต็มที่ และที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียสปริมาณเอทิลปาล์มิตและเอทิลโอลิเอตลดลงกว่า 20 เท่าเนื่องจากอุณหภูมิสูงทำให้เอนไซม์ไลเปสเสียสภาพจึงทำให้ประสิทธิภาพการทำงานต่ำลงโดยเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescents* จะสามารถมีประสิทธิภาพการทำงานไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส (Shimada,2002)

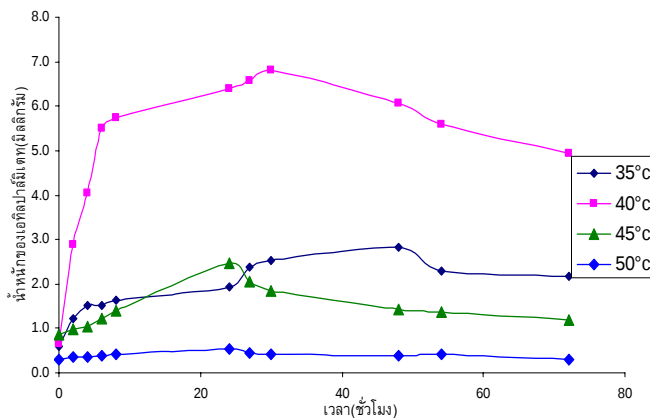


(ก)

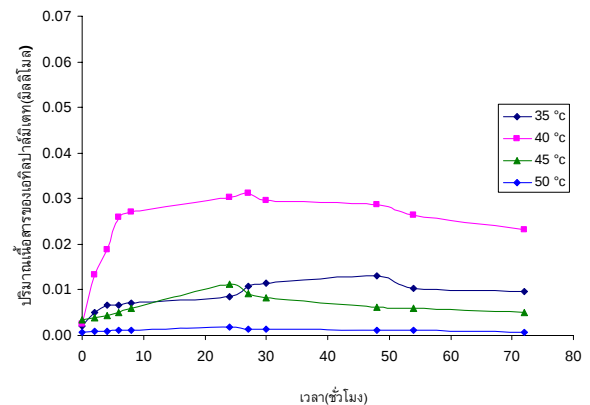


(ข)

รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักรีดเอทิลเอตในหน่วยมวล (ก) และหน่วยโมล (ข) กับเวลาแต่ละอุณหภูมิ



(ก)



(ข)

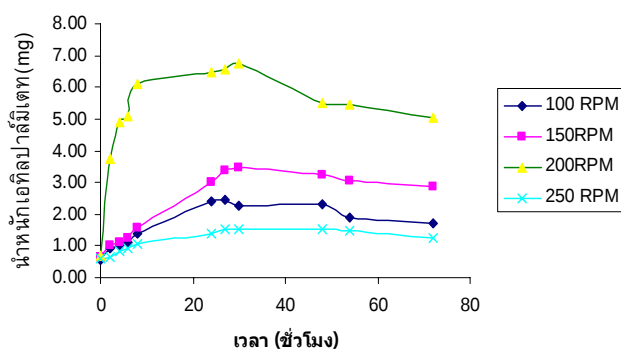
รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักรีดพาล์มิตเตทในหน่วยมวล (ก) และหน่วยโมล (ข) กับเวลาแต่ละอุณหภูมิ

ผลของความเร็รรอบการเขย่า

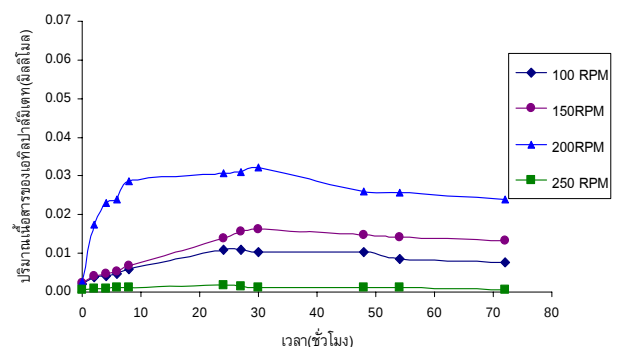
ความเร็รรอบการเขย่าส่งผลต่อการถ่ายเทมวลสารของปฏิกิริยา enzymatic ที่ตรึงรูปไว้ โดยเฉพาะต่อการส่งถ่ายปฏิกิริยาด้านนอกเมตเอนไซม์ตรึงรูป (external mass transfer) อัตราเร็วปฏิกิริยาอาจถูกควบคุมโดย external หรือ internal mass transfer limitation ถ้าปฏิกิริยาถูกควบคุมด้วย external mass transfer เมื่อใช้ความเร็รรอบการเขย่าเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการปั่นป่วนมากขึ้น จึงทำให้สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเพิ่มสูงขึ้น แต่จากหลายการทดลองที่ผ่านมาทำให้อัตราการกววนที่แตกต่างกัน (100 ถึง 300 รอบต่อนาที) แสดงถึงการไม่ใส่ใจต่อการจำกัดการแพร่ภายนอก และคิดว่า external mass transfer ไม่มีอิทธิพลต่อความเร็วของปฏิกิริยา แต่การทดลองส่วนใหญ่ก็ใช้ความเร็รรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที เพื่อ

ป้องกันการแตกของเม็ดเอนไซม์ตรึงรูป (Sylvie ,2005) ซึ่งที่ความเร็วรอบการเขย่านี้พบว่ามีความสะดวกมากสำหรับการศึกษาทางจุลศาสตร์ของการสังเคราะห์เอสเทอร์ต่อไปด้วย

ดังนั้นการทดลองนี้จะแสดงถึงผลของความเร็วรอบการเขย่าที่มีต่อปริมาณของปริมาณเอทิลปาล์มิเตตและเอทิลโอเลต ความเร็วรอบการเขย่าในการทดลอง คือ 100, 150, 200, และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ จากรูปที่ 4.6 และ 4.7 พบว่าความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาทีจะให้ผลที่ดีที่สุดเนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปมีการถ่ายเทมวลสารได้ดีจึงสามารถทำงานได้อย่างเต็มที่ พบว่าความเร็วรอบการเขย่า 100 , 150 รอบต่อนาทีปริมาณของเอทิลเอสเทอร์ลดลง 2 เท่า เนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปนั้นไม่สามารถถ่ายเทมวลสารได้ดีที่ความเร็วรอบต่ำ และพบว่าความเร็วรอบการเขย่า 250 รอบต่อนาทีปริมาณของเอทิลเอสเทอร์ลดลง 3 เท่า เนื่องจากที่ความเร็วรอบการเขย่าสูงจะก่อให้เกิดการปั่นป่วนมากเกินไปจนทำให้ประสิทธิภาพการทำงานได้ต่ำลง

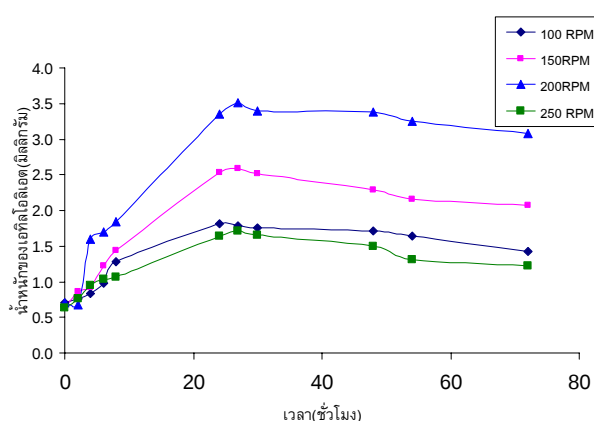


(ก)

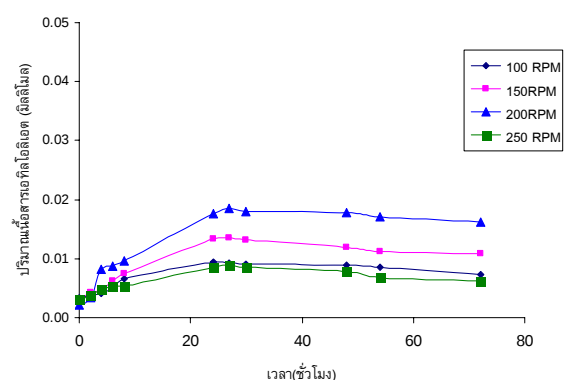


(ข)

รูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเอทิลปาล์มิเตตในหน่วยมวล (ก) และหน่วยโมล (ข) กับเวลาแต่ละความรอบการเขย่า



(ก)



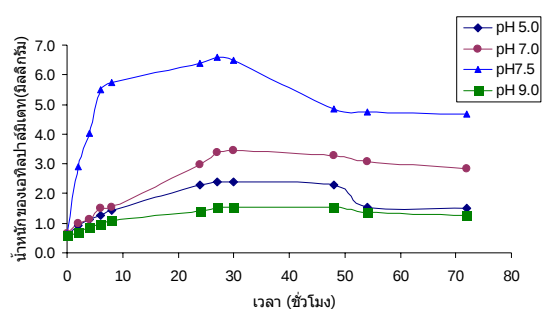
(ข)

รูปที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเอทิลโอเลตในหน่วยมวล (ก) และหน่วยโมล (ข) กับเวลาแต่ละความรอบการเขย่า

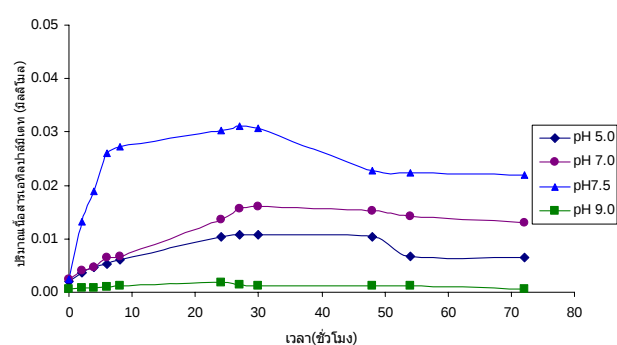
ผลของค่า pH ในการตรึงรูปเอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของการสังเคราะห์เอสเทอร์มักจะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดต่างช่วงหนึ่ง ถ้าค่า pH มีค่าต่ำหรือสูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์บางส่วนหรือเอนไซม์ทั้งหมดสภาพการทำงานเพราะ ไฮโดรเนียมไอออน หรือไฮดรอกไซด์ไอออนจะทำลายโครงสร้างตติยภูมิของเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสูญเสียสภาพการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ดังนั้นการทดลองนี้แสดงถึงผลของค่า pH ที่มีต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Pseudomonas fluorescens* โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันคือ 5.0, 7.0, 7.5, 9.0 จากรูปที่ 4.8 และ 4.9 แสดงถึงผลของค่า pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ตรึงรูปเอนไซม์ที่มีต่อปริมาณเอทิลปาล์มิเตทและเอทิลโอเลเอตที่ผลิตได้ พบว่าการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปลดลงเหลือ 30 เปอร์เซ็นต์ของผลได้สูงสุดเมื่อค่า pH มีค่าต่ำกว่า 7.0 และสูงกว่า 7.5 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Soumanou และคณะซึ่งพบว่า pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 7.0 – 7.5 เนื่องจากเอนไซม์ ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0-7.5 (Soumanou,2003)

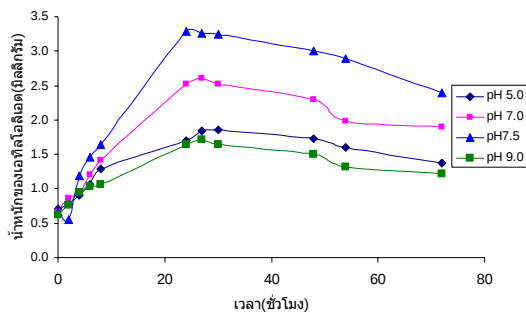


(ก)

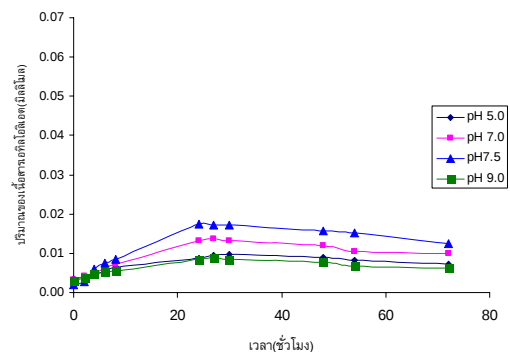


(ข)

รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเอทิลปาล์มิเตทในหน่วยมวล (ก) และหน่วยโมล (ข) กับเวลาแต่ละความรอบการเขย่า



(ก)



(ข)

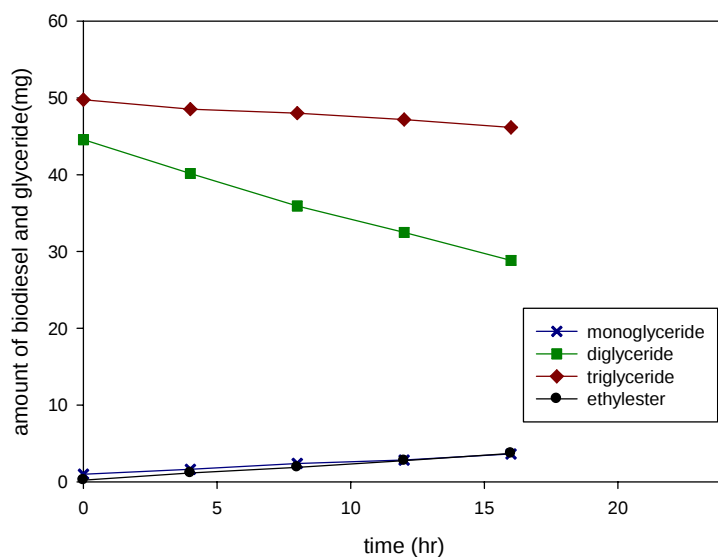
รูปที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเอทิลโอเลตในหน่วยมวล (ก) และหน่วยโมล (ข) กับเวลาแต่ละความรอบการเขย่า

การศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายเอนไซม์ไลเปส

ในกรณีนี้เราใช้แบบจำลองปิงปอง ไป-ไปในการอธิบายแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของปฏิกิริยารานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเอธานอล โดยจะให้สารตั้งต้นของเอนไซม์คือไตรกลีเซอไรด์และเอธานอล เนื่องจากว่าปฏิกิริยาการย่อยไตรกลีเซอไรด์เป็น limiting step ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 4.10 ซึ่งแสดงปริมาณ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ที่เหลือยู่ระหว่างทำปฏิกิริยา พบว่าไตรกลีเซอไรด์จะมีปริมาณมากที่สุดในทุก ๆ ช่วงเวลาเกิดปฏิกิริยา นั้นแสดงถึงว่าขั้นตอนการย่อยไตรกลีเซอไรด์เป็นขั้นตอนกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา เมื่อเราใส่ผลการทดลองลงในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

$$v = \frac{V_{\max} AB}{K_A B + K_B A + AB}$$

แล้วใช้โปรแกรมเอกเซลร่วมกับวิซวลเบสิกเพื่อหาค่าคงที่ของปฏิกิริยา เราจะได้ค่าคงที่ของปฏิกิริยาดังนี้ $K_A = 0.5 \text{ mol/L}$ $K_B = 1.5 \text{ mol/L}$ และ $V_{\max} = 1.6 \text{ mmol/L.h}$. เมื่อ A คือไตรกลีเซอไรด์ และ B คือเอธานอล



รูป 4.10 ปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และเอธิลเอสเทอร์ระหว่างการทำปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเอนไซม์ไลเปส

สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันกับเอทานอลคือ 1:3 อุณหภูมิคือ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่าคือ 200 รอบต่อนาที และ pH ของการตรึงรูปคือ 7.5 แต่ปฏิกิริยาที่ได้ก็ยังไม่ให้ปริมาณเอสเทอร์เพียง 20 เปอร์เซ็นต์จากค่าเอสเทอร์สูงสุดที่ควรได้ตามทฤษฎี

เอกสารอ้างอิง

ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม และสินศุภา จุ้ยจุลเจิม .2549. "การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารตั้งต้นน้ำมันปาล์ม" วารสารวิจัยฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล 2549;10(1):15-20

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

Ellaiiah P., T. Prabhakar, B. Ramakrishna, A. Thaer Taleb, K. Adinarayana ,Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger* .Process Biochemistry .,2004; 39: 525–528.

Fukuda Hideki Akihiko Kondo and Hideo Noda ,Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. Journal of Bioscience and Bioengineering., 2001;92(5):405- 416.

Ganapati D,K. Manjula Devi Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfurylbutyrate: comparison and kinetic modeling. Chemical Engineering Science.,2004;59: 373 – 383.

Krishna S Hari. and N.G.Karant, **Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate a kinetic study.** Biochimica et Biophysica Acta.,2001;1547: 262-267

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

Samukawa Taichi, Masaru kaieda,Takeshi Matsumoto Kazuhiro Ban Akihiko Kondo et al. **Pretreatment of Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Plant Oil** Journal of Bioscience and Bioengineering.,2000;90(2) : 180-183.

Shimada Yuji, Yomi Watanabe, Akio Sugihara, Yoshio Tominaga, **Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing** ,Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.,2002;17: 133–142.

Smith, K. W. (2001). Crystallization of Palm Oil and Its Fraction, 357-361. by Nissim, G. and Kiyotaka, S., Collector. **Crystallization Process in Fats and Lipid Systems.** Marcel Dekke, NewYork

Soumanou Mohame,Uwe T.Bornscheuer, **Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl ester from sunflower oil.** Enzyme and Microbial Technology.,2003;33: 97-103.

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

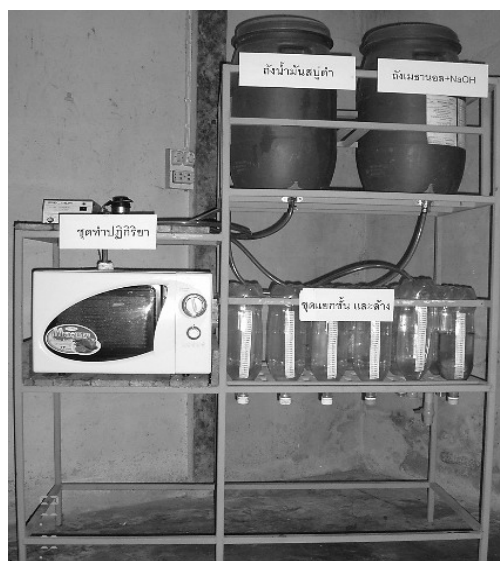
บทที่ 5

การผลิตไบโอดีเซลแบบกึ่งต่อเนื่อง

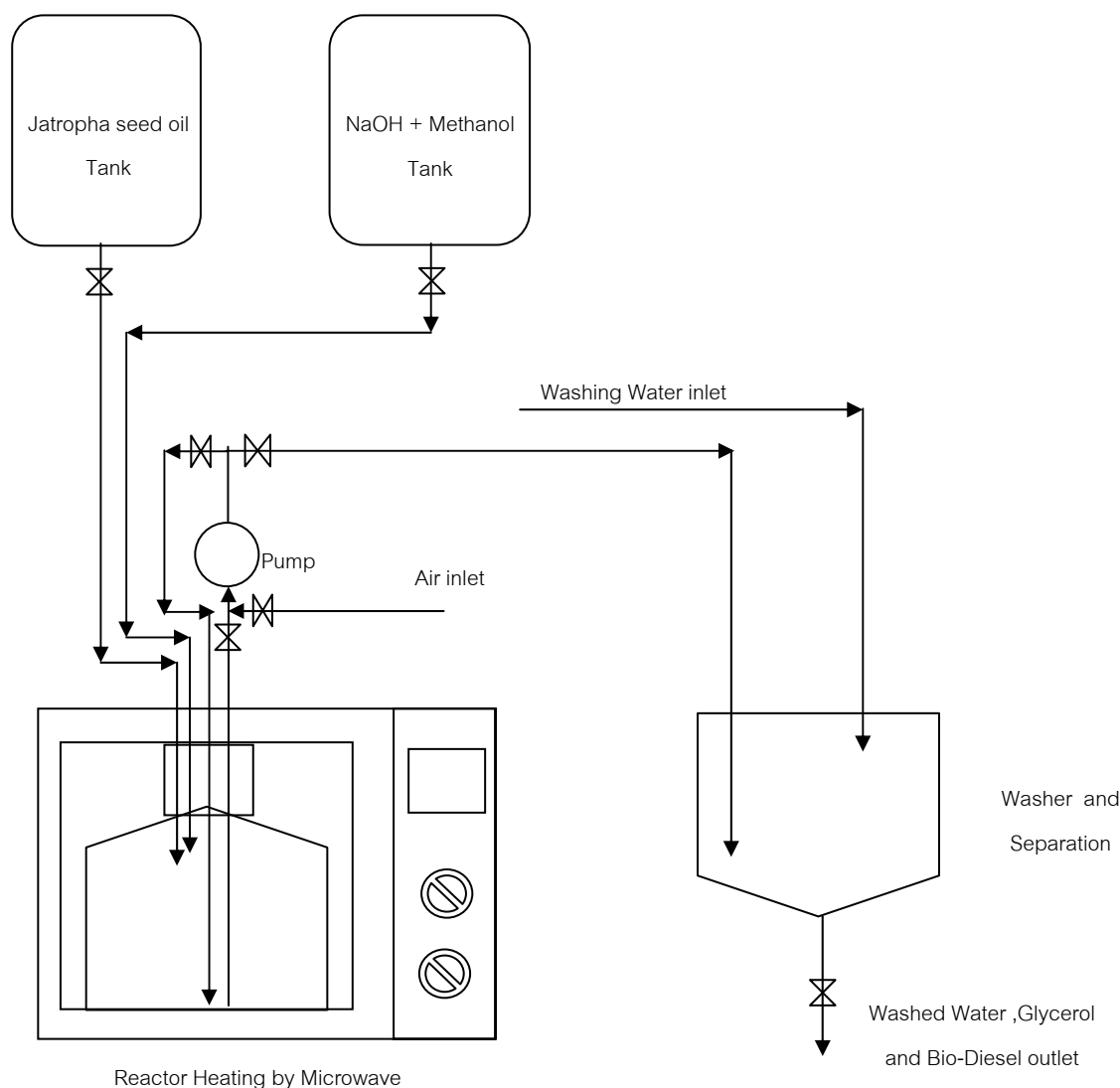
เนื่องจากการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะให้ผลผลิตเอสเทอร์ต่ำคือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการผลิตนานคือไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง จึงทำให้การพิจารณาใช้เอนไซม์มาผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องยังไม่ได้ผล จึงทำให้ต้องกลับไปใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นด่าง คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์แทน แต่เนื่องจากปฏิกิริยานี้มักต้องใช้วิธีกวนอย่างรุนแรงและทำในถังกวนโดยต้องมีเวลาในการทำปฏิกิริยาไม่น้อยกว่า 1-2 ชั่วโมง จึงทำให้วิธีนี้ไม่เหมาะกับการทำปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง ได้มีการทำวิจัยโดยดร.สิทธิพันธ์ ท่อแก้ว และคณะจากภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ พบว่าการใช้ไมโครเวฟมาเป็นแหล่งให้ความร้อน จะช่วยให้การเกิดปฏิกิริยาได้ดี และรวดเร็วโดยไม่ต้องใช้การกวน โดยปฏิกิริยานี้เกิดภายในเวลาเพียง 5 นาที จึงทำให้ไม่ต้องกังวลกับเวลาและวิธีการกวนที่ต้องใช้ ในงานวิจัยนี้จึงใช้แนวความคิดที่จะนำไมโครเวฟมาเป็นแหล่งให้ความร้อน และประกอบถังปฏิกรณ์ และระบบการผลิตไบโอดีเซลทั้งหมดให้สามารถทำไบโอดีเซลแบบกึ่งต่อเนื่องได้

การออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ผู้วิจัยได้ออกแบบสร้างเครื่องผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและให้ความร้อนในการทำปฏิกิริยาด้วยคลื่นไมโครเวฟ ประกอบด้วยอุปกรณ์ต่างๆ ดังนี้ ถังเก็บน้ำมันสบู่ดำดิบ ถังเก็บสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และเมทานอล ชุดให้ความร้อนด้วยเตาไมโครเวฟและทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นขวดแก้วที่บรรจุไว้ในตู้ไมโครเวฟ ป้อนสำหรับปั้มน้ำมันสบู่ดำ ชุดแยกชั้น และล้าง ดังรูป 5.1 โดยมีแผนผังการทำงานดัง รูป 5.2



รูป 5.1 แสดงเครื่องผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไมโครเวฟเป็นแหล่งให้ความร้อน



รูป 5.2 แสดงผังการทำงานของเครื่องผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ

การทดสอบความสามารถในการให้ความร้อนแก่น้ำมันและการควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ไมโครเวฟ

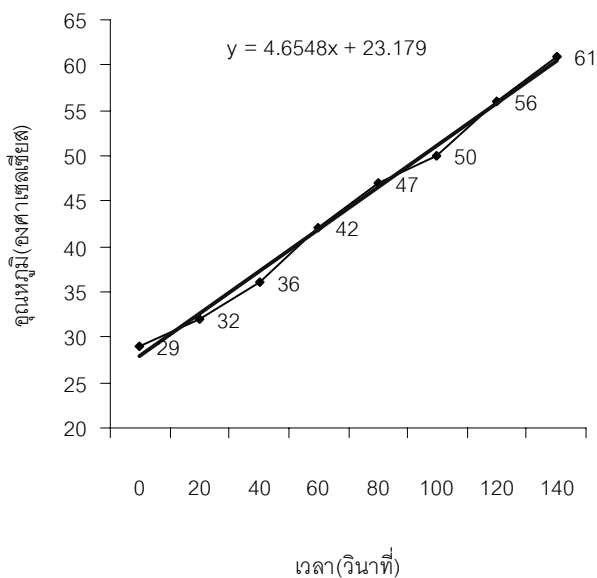
ทดสอบความสามารถในการให้ความร้อนแก่น้ำมัน

ในการทดลองศึกษาผลการให้ความร้อนแก่น้ำมันสบู่ดำดิบ ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ระดับพลังงานสูงสุด (high) ของไมโครเวฟ ณ เวลาต่างๆ ดังนี้คือ 20, 40, 60, 70, 80, 100, 120 และ 140 วินาที แต่จะครั้งจะนำน้ำมันออกแล้วใส่น้ำมันลงไปใหม่ทุกครั้ง และบันทึกผลของอุณหภูมิ ณ เวลาต่างๆที่กำหนด

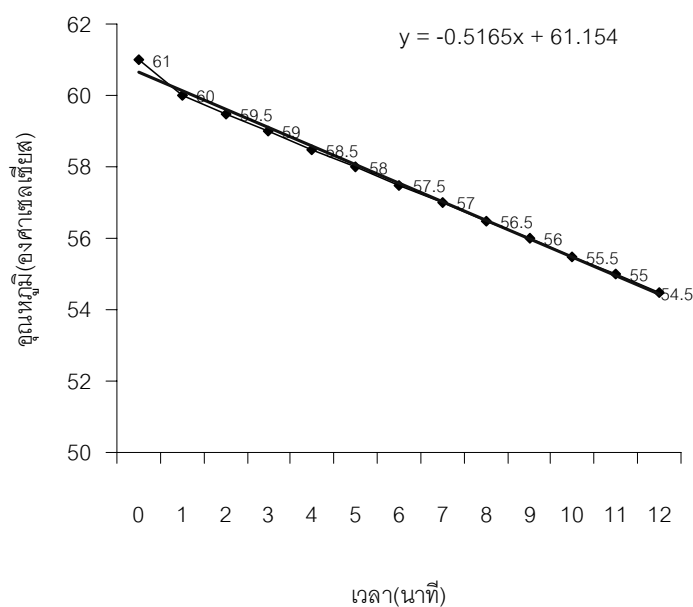
ทดสอบการลดลงของอุณหภูมิของน้ำมันหลังการหยุดให้ความร้อน

ในการทดลองศึกษาผลการลดลงของอุณหภูมิหลังจากให้ความร้อนแก่น้ำมันสบู่น้ำดิบ ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ระยะเวลา 120 วินาที และมีการกวนโดยการปั๊มอากาศเข้าไปในน้ำมัน จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส

นำผลการทดลองที่ได้ มาพล็อตกราฟหาความสัมพันธ์การเพิ่มอุณหภูมิและการลดลงของ อุณหภูมิ เพื่อควบคุมอุณหภูมิโดยการควบคุมที่เวลาการให้ความร้อน



รูป 5.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิกับระยะเวลา



รูป 5.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของอุณหภูมิกับระยะเวลา

จากกราฟในรูป 5.3 และ 5.4 จะพบว่า เราสามารถควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 60 องศาเซลเซียส บวกลบไม่เกิน 2 องศาเซลเซียสได้ด้วยการตั้งไมโครเวฟที่พลังงานสูงสุดและเริ่มเปิดเครื่องเป็นเวลา 2 นาที แล้วหยุดแล้วเริ่มเปิดใหม่สลับหยุดทุก ๆ 1 นาที ซึ่งเราสามารถใช้อัตโนมัติ digital time controller อย่างง่าย ๆ ได้

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล

การหาอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

ในการทดลองศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่มีต่อปริมาณไบโอดีเซล อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาในการทดลองอยู่ระหว่าง 48 ถึง 61 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะมีการควบคุมให้อยู่ในช่วง 48-50, 54-56 และ 59-61 องศาเซลเซียส ในแต่ละการทดลอง อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองไม่ควรสูงเกิน 64.7 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นจุดเดือดของเมทานอล โดยกำหนดให้ปริมาณเมทานอล ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คงที่ เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา และเวลาที่ใช้คือ 4, 8, 12 และ 16 นาที โดยกำหนดให้ปริมาณของเมทานอล ตัวเร่งปฏิกิริยา และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา คงที่

จากตาราง 5.1 จะแสดงผลของเวลาและช่วงอุณหภูมิที่ดีที่สุด ซึ่งจากตารางพบว่าในเวลา 8 นาที ที่มีการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลิตไบโอดีเซลได้สูงที่สุดจากน้ำมัน 1 กิโลกรัม ซึ่งจะได้ปริมาณไบโอดีเซล 1.13 ลิตร และจากการทดสอบทางเคมีพบว่าไบโอดีเซลที่ได้มีปริมาณเอสเทอร์ไม่ต่ำกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ในทุกกรณี คุณสมบัติอื่น ๆ ทางเชื้อเพลิงจะแสดงในตาราง 5.2

จากผลการทดสอบพบว่า การนำน้ำมันสนูปดำดิบมาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทำให้คุณสมบัติทางด้านเชิงกล และทางกายภาพดีขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำมันสนูปดำดิบที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำมันสนูปดำดิบมีโมเลกุลใหญ่ และเมื่อผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะทำให้ น้ำมันสนูปดำดิบมีโมเลกุลเล็กลงจึงทำให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซล เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ได้กับน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลพบว่า มีค่าอยู่ในช่วงที่กำหนดของกรมธุรกิจพลังงาน

ตาราง 5.1 แสดงผลการหาความเหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสุญุดำดิบโดยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและให้ความร้อนในการทำปฏิกิริยาด้วยคลื่นไมโครเวฟ

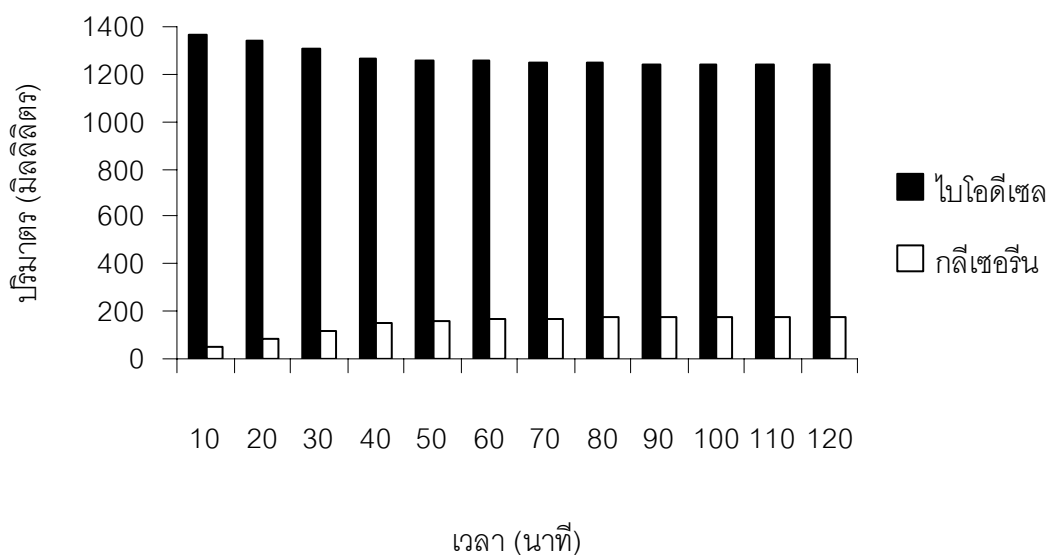
ครั้งที่	อุณหภูมิ (⁰ c)	เวลา (min)	น้ำมัน สุญุดำ (g)	เมธานอล (g)	โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (g)	ผลได้ ของไบโอดีเซล(g)	ของผสม กลีเซอริน (g)	การ สูญเสีย (g)	เปอร์เซ็นต์ ผลได้ของไบ โอดีเซล
1	54-56	4	1,000	150	10	795	350	15	79.5
2	54-56	4	1,000	200	10	950	247	13	95.0
3	54-56	4	1,000	250	10	875	370	15	87.5
4	54-56	4	1,000	200	5	923	266	16	92.5
5	54-56	4	1,000	200	10	958	242	10	95.8
6	54-56	4	1,000	200	15	715	485	15	71.5
7	54-56	4	1,000	200	10	941	259	10	94.1
8	54-56	8	1,000	200	10	975	225	10	97.5
9	54-56	12	1,000	200	10	960	235	15	96.0
10	54-56	16	1,000	200	10	878	318	14	87.8
11	48-50	8	1,000	200	10	846	385	15	84.6
12	54-56	8	1,000	200	10	945	220	13	94.5
13	59-61	8	1,000	200	10	976	220	11	97.6

ตาราง 5.2 แสดงคุณสมบัติของน้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลกับคุณสมบัติไบโอดีเซลจากการทดลอง

คุณสมบัติ	มาตรฐานที่ใช้	มาตรฐานของน้ำมัน เชื้อเพลิงดีเซล		น้ำมัน สุญุดิบ	ไบโอดีเซลที่ได้ จากการ ทดลอง
		หมุนเร็ว	หมุนช้า		
ความหนืดที่ 40C (c.St.)	ASTM D88	1.8-4.1	8.0	5.8	4.0
จุดวาบไฟ (C)	ASTM D93	>52	>52	N.A.	N.A.
จุดเท็ดว (C)	ASTM D97	<10	<16	9	7
ค่าความร้อน (KJ/g)	ASTM D240	46.80	-	38.50	42.00
ความถ่วงจำเพาะ(ที่ 60 F)	ASTM D1298	0.81-0.87	0.92	0.9	0.86
จุดขุ่นตัว (C)	ASTM D2500	<10	<16	12	10

ผลการแยกชั้นระหว่างระหว่างไบโอดีเซลกับกลีเซอริน

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังนี้คือ ช่วง 60 องศาเซลเซียส น้ำมัน 1 กิโลกรัม โดยปริมาณเมทานอล 200 กรัม ตัวเร่งปฏิกิริยา 10 กรัม และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 8 นาที ผลการแยกชั้นระหว่างระหว่างไบโอดีเซลกับกลีเซอริน ในระยะเวลา ต่างๆ หลังจากการหยุดการกวนและการให้ความร้อน น้ำมันจะเริ่มแยกตัวเป็น 2 ชั้น โดยที่กลีเซอรินอยู่ด้านล่างและไบโอดีเซลอยู่ด้านบนของถังตกตะกอน เมื่อเวลาผ่านไปชั้นที่เป็นกลีเซอริน อยู่ด้านล่าง จะมีปริมาณมากขึ้นและไบโอดีเซลอยู่ด้านบนของถังตกตะกอนจะลดลงจนในที่สุดจะลดลงจนถึง ระยะเวลาหนึ่งนั่นก็คือ 90 นาที แสดงในรูป 5.3 ต่อจากนั้นทั้งไบโอดีเซลและกลีเซอรินจะมีปริมาณคงที่



รูป 5.3 แสดงการแยกชั้นระหว่างไบโอดีเซลกับกลีเซอริน

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า limiting step ของการผลิตไบโอดีเซลจะอยู่ที่ ขั้นตอนการรอกการแยกไบโอดีเซลออกจากกลีเซอริน ดังนั้นการออกแบบเครื่องจักรเพื่อช่วยให้กลีเซอรินแยกได้เร็วขึ้นจะทำให้การผลิตไบโอดีเซลเกิดแบบต่อเนื่องได้ เครื่องจักรในอุตสาหกรรมที่มีการแยกของเหลวที่มีความหนาแน่นแตกต่างกัน ได้แก่ ไฮโดรไซโคลน เครื่องเซนติฟิวแบบต่อเนื่อง แต่เครื่องจักรเหล่านี้มีราคาแพง เราอาจใช้วิธีการสร้างถังแยกชั้นไบโอดีเซลหลายๆถัง (7ถัง) แล้วใช้ไมโครเวฟ 1 เครื่อง จะทำให้ผลิตไบโอดีเซลได้ ประมาณ 8 ลิตรต่อชั่วโมง โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชุดนี้

สรุปผลการทดลอง

เราสามารถผลิตไบโอดีเซลกึ่งต่อเนื่องโดยใช้อุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมา ประกอบด้วยถังป้อนสาร ไมโครเวฟให้ความร้อน ถังรอกลิเซอรินแยกชั้น พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลที่มีปริมาณเอสเทอร์ไม่ต่ำกว่า 95 เปอร์เซ็นต์และมีคุณสมบัติอยู่ในมาตรฐานที่กรมธุรกิจพลังงานกำหนด โดยมีกำลังการผลิตไบโอดีเซล ประมาณ 8 ลิตรต่อชั่วโมง จากน้ำมันพืชประมาณ 8 กิโลกรัมต่อชั่วโมง สภาวะที่ใช้ผลิตคือ ทำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยน้ำหนักระหว่างน้ำมันพืชกับเมทานอลคือ 1 กิโลกรัมต่อเมทานอล 200 กรัม หรือสัดส่วนโดยโมลประมาณ 1:6 ใช้พลังงานไมโครเวฟระดับสูงสุด เปิดปิดตามช่วงเวลา ทุก ๆ 1 นาที โดยไมโครเวฟที่ใช้มีกำลังไฟ 800 วัตต์