



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญา

วิศวกรรมเคมี

วิศวกรรมเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้สถิติในการหาปัจจัยที่เหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันทานตะวันและ
เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

Statistical Application to obtain the Optimum Condition of Biodiesel production from
Sunflower Oil and Immobilized Lipase

นามผู้วิจัย นายกิตติพล กสิภาร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กานติส สุตสาคร, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานพ เจริญไชยตระกูล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ฝั่งผาย พรรณวดี, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้สถิติในการหาปัจจัยที่เหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันทานตะวันและเอนไซม์
ไลเปสที่ถูกต้อง

Statistical Application to obtain the Optimum Condition of Biodiesel production from
Sunflower Oil and Immobilized Lipase

โดย

นายกิตติพล กสิการ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2552

กิตติพล กลสิการ 2552: การใช้สถิติในการหาปัจจัยที่เหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมัน
ทานตะวันและเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ปริณญวณวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)
สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ประชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์เพ็ญจิต
ศรีนพคุณ, Ph.D. 140 หน้า

การวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก จุลินทรีย์
Pseudomonas fluorescens บนเม็ดโกลโดซานด้วยวิธีห่อหุ้มโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Two-way
ANOVA ซึ่งพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่า 396 หน่วยต่อกรัมที่สภาวะดังนี้ อัตราส่วนโดยน้ำหนัก
ของสารละลายโกลโดซานต่อเอนไซม์ไลเปสคือ 1:150 อัตราส่วนของผงโกลโดซานต่อสารละลายกรดอะซิติก
(1.5% v/v) คือ 1.5% w/v

การทดลองส่วนที่สองคือการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส โดยปัจจัยที่ศึกษา
ได้แก่ อุณหภูมิของปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ร้อยละโดยน้ำหนัก
ของน้ำ ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายรวม โดยผลทาง
สถิติแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิของปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ
ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง คือ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซลที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย
เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง การออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนองของ Box-Behnken ถูกใช้ศึกษาสภาวะที่
เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล ผลจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แสดงว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดี
เซลคือ 30 °C อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันคือ 6:1 และร้อยละโดยน้ำหนักของ
เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงคือ 50% จะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์คือ 30.7% ซึ่งค่าทางตัวเลขมีความสอดคล้องกับผล
การทดลอง โดยจะได้ค่าเฉลี่ยร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ในสภาวะที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง
14.81-31.40 ที่ระดับความเชื่อมั่น 98.5%

การทดลองส่วนที่สามใช้วิธีอัตราการผลิตปฏิกิริยาเริ่มต้นเพื่อหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของ
ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลจากสภาวะที่เหมาะสมในการตรึง
เอนไซม์และการผลิตไบโอดีเซล สมการอัตราที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับกลไกการเร่งปฏิกิริยาด้วย
เอนไซม์แบบปิงปอง ไบไบ ที่มีการยับยั้งแบบแข่งขันด้วยเมทานอล โดยพบว่าค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จาก
โปรแกรมคอมพิวเตอร์จะให้ค่าที่ดีกว่าวิธีกราฟ ทั้งนี้จะได้ค่า K_m ของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอล คือ
12.81 มิลลิโมล และ 68.36 มิลลิโมลตามลำดับ และจะได้ค่า K_i ของเมทานอล คือ 13.84 มิลลิโมล

Kittipon Kasipar 2009: Statistical Application to obtain the Optimum Condition of Biodiesel production from Sunflower Oil and Immobilized Lipase. Doctor of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Associate Professor Penjit Srinopakun, Ph.D. 140 pages.

This research was divided into three parts. The first part applied the Two-way ANOVA method to optimize the immobilization condition of *Pseudomonas fluorescne's* Lipase on chitosan bead by an entrapment technique. The maximum immobilized Lipase activity of 396 unit/g was obtained from the following conditions; 1:150 weight fraction of the chitosan solution and Lipase, 1.5% w/v of the chitosan powder and acetic acid solution (1.5% v/v).

The second part was carried out to determine the optimum condition for the biodiesel production using the prepared immobilized Lipase. The experimental factors namely the reaction temperature, the methanol to oil molar ratio, the percentage of water, the percentage of immobilized Lipase and the percentage of co-solvent were screened using Plankett Burman experimental design. The statistical results showed that the reaction temperature, the methanol to oil molar ratio and the percentage of immobilized Lipase were the important experimental factors on the immobilized Lipase biodiesel production. Then the Box Behnken response surface method was used to obtain the optimum condition of the biodiesel production which was 30°C, 6:1 of methanol to oil molar ratio and 50% wt of the immobilized Lipase. The fatty acid methyl ester suggested by the statistical method at the optimum biodiesel production condition was 30.7%. As expected, the result from the statistical model agreed well with the experimental result. The mean mass percent of methyl ester from this condition was ranging from 14.81 to 31.40 at 98.5% confidential level.

The third part was applying an initial rate method to attain the kinetic model of transesterification reaction between the sunflower oil and methanol at the optimum immobilization and biodiesel production conditions. From the experiment, it is shown that the reaction rate followed the Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by methanol. Then the kinetic parameters were determined by the EXCEL computer program and the graphical method. Interestingly, the values estimated from the EXCEL program were more realistic than the graphical method. The K_m values acquired from the EXCEL program for sunflower oil and methanol were 12.81 mmol and 68.36 mmol, respectively. Nevertheless, the competitive inhibition by methanol was evident with the high inhibition constant of K_i value at 13.84 mmol.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กานติส สุธาสคร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานพ เจริญไชยตระกูล กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. พินทุ์สุดา วีรวัฒน์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมเคมีทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและตลอดจนให้คำแนะนำในสิ่งต่างๆ และขอขอบคุณ คุณลลิตา อัดนโธ ผู้เชี่ยวชาญด้านการผลิตไบโอดีเซล จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการเสร็จลุล่วงไปได้ ขอขอบคุณสำนักคอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับการสนับสนุน โปรแกรม Minitab รุ่นที่ 13 ในการทำงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย และสมาชิกในกลุ่มวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่าน

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ที่ได้อบรมและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

กิตติพล กสิภาร

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(10)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	87
สรุป	87
ข้อเสนอแนะ	89
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	90
ภาคผนวก	96
ภาคผนวก ก การหาความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล และค่ากิจกรรมของเอนไซม์	97
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ข้อมูลจากการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA	103
ภาคผนวก ค การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน	107
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์การถดถอยสำหรับการออกแบบการทดลอง แบบ Plankett-Burman และการออกแบบการทดลอง พื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken	115

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(10)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	87
สรุป	87
ข้อเสนอแนะ	89
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	90
ภาคผนวก	96
ภาคผนวก ก การหาความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล และค่ากิจกรรมของเอนไซม์	97
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ข้อมูลจากการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA	103
ภาคผนวก ค การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน	107
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์การถดถอยสำหรับการออกแบบการทดลอง แบบ Plankett-Burman และการออกแบบการทดลอง พื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken	115

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของสมการในการออกแบบการทดลอง พื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken	122
ภาคผนวก ฉ การหาช่วงความเชื่อมั่นของร้อยละ โดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ ที่ผลิตด้วยสภาวะที่เหมาะสม	127
ภาคผนวก ช การหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น	137
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	140

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไป	7
2	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืช	7
3	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล	8
4	ข้อดีและข้อเสียของวิธีการตรึงเอนไซม์แบบจับบนตัวพาหะ	14
5	การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส	33
6	เวลาในการปรากฏของสารต่างๆในโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และ ไตรกลีเซอไรด์ในไบโอดีเซลตัวอย่าง	37
7	สภาวะของการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส	40
8	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงตามการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA	41
9	การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจากผลการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA	42
10	สภาวะในการทดลองตามการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman และร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้	48
11	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปัจจัยหลักจากการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman	49
12	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปัจจัยหลัก และปัจจัยร่วมจากสมการเชิงเส้นที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman	51
13	สภาวะในการทดลองตามการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken	59
14	ค่าทางสถิติที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken	60
15	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	การเปรียบเทียบแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบต่างๆ	64
17	อุณหภูมิของปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปส	66
18	ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส	78
19	ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์โดยใช้วิธีทางกราฟและวิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์	86
ตารางผนวกที่		
ก1	วิธีการเตรียมสารละลายพารา-ไนโตรฟินอล (<i>p</i> -NP) สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานสารพารา-ไนโตรฟินอลสำหรับหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	98
ก2	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการหาค่าความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอลเพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกต้อง	101
ข1	วิธีการหาค่าสถิติสำหรับการทดสอบความแปรปรวนสำหรับการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA	105
ค1	วิธีการเตรียมสารมาตรฐานของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์	108
ค2	ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟของสารต่างๆในการสร้างกราฟมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์	109
ง1	ผลการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman	116
ง2	ผลการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken	119
จ1	การทดสอบความไม่สมบูรณ์ของแบบจำลอง และ ข้อมูลการทดลอง	124
จ2	ค่าสถิติของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken	126
ฉ1	ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทดลองในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการออกแบบการทดลองพื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken	134

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์	6
2 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์	10
3 การเปลี่ยนแปลงพลังงานภายในของระบบที่มีปฏิกริยาเคมีเกิดขึ้น	11
4 การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมโยง	15
5 การตรึงเอนไซม์แบบห่อหุ้ม	15
6 โครงสร้างทางเคมีของไคติน	16
7 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	16
8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกริยาเริ่มต้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นเริ่มต้นชนิดเดียว	18
9 ความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ กับ $1/[S]$ ตามวิธีของ Lineweaver-Burk	19
10 กลไกการเข้าทำปฏิกริยาแบบสุ่ม	20
11 กลไกการเข้าทำปฏิกริยาแบบเป็นลำดับ	20
12 กลไกการเข้าทำปฏิกริยาแบบป้องกัน	21
13 กลไกของปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์และเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปส	22
14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในสภาวะการตรึงตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA	44
15 ค่ากลาง ค่ามากที่สุดและค่าน้อยที่สุดของข้อมูลค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA	45
16 การกระจายของข้อมูลแบบปกติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA	46
17 กราฟของพารามิเตอร์ของการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman	52
18 การกระจายแบบปกติของอิทธิพลปัจจัยต่างๆ ในการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman	52
19 อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	อิทธิพลร่วมของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman	56
21	ตำแหน่งของการทดลองแบบ Box-Behnken สำหรับ 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง	58
22	(ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ต่อ <i>FAME</i> ที่ $IM = 50$ (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ต่อ <i>FAME</i> ที่ $IM = 50$	67
23	(ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ต่อ <i>FAME</i> ที่ $IM = 30$ (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ต่อ <i>FAME</i> ที่ $IM = 30$	68
24	(ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ต่อ <i>FAME</i> ที่ $IM = 10$ (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ <i>FAME</i> ที่ $IM = 10$	69
25	(ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ <i>FAME</i> ที่อุณหภูมิ 50 °C (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ <i>FAME</i> ที่อุณหภูมิ 50 °C	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
26	(ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ <i>FAME</i> ที่อุณหภูมิ 40° ซ (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ต่อ <i>FAME</i> ที่อุณหภูมิ 40° ซ	72
27	(ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ <i>FAME</i> ที่อุณหภูมิ 30° ซ (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ต่อ <i>FAME</i> ที่อุณหภูมิ 30° ซ	73
28	(ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ <i>FAME</i> ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล ต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 6:1 (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ <i>FAME</i> ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล ต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 6:1	75
29	(ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ <i>FAME</i> ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล ต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 3.75:1 (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ <i>FAME</i> ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล ต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 3.75:1	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
30	(ก) กราฟของพื้นที่ผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ <i>FAME</i> ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล ต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 1.5:1 (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ <i>FAME</i> ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล ต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 1.5:1	77
31	ช่วงค่าเฉลี่ยที่แท้จริงของค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากสถานะที่เหมาะสม ($T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 6:1$ $IM = 50$)	79
32	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นกับความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและความเข้มข้นของเมทานอลตั้งแต่ 20-200 มิลลิโมลาร์	80
33	ความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_i$ และ ส่วนกลับของความเข้มข้นน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน	81
34	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{K_{m, Tri}}{V_{max}} \left(1 + \frac{[MeOH]}{K_{i, MeOH}} \right)$ และ ความเข้มข้นของเมทานอล	82
35	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{K_{m, Tri}}{V_{max}} \left(1 + \frac{[MeOH]}{K_{i, MeOH}} \right)$ และ ความเข้มข้นของเมทานอลเมื่อพิจารณาถึงข้อมูลที่มีความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 200 มิลลิโมลาร์	83
36	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\left(\frac{K_{m, MeOH}}{V_{max} [MeOH]} + \frac{1}{V_{max}} \right)$ และ ส่วนกลับความเข้มข้นของเมทานอล	84
37	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\left(\frac{K_{m, MeOH}}{V_{max} [MeOH]} + \frac{1}{V_{max}} \right)$ และ ส่วนกลับของความเข้มข้นเมทานอลเมื่อพิจารณาถึงข้อมูลที่มีความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 20 100 และ 200 มิลลิโมลาร์	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาค่าความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล	99
ค1 กราฟมาตรฐานเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์	109
ค2 โครมาโตแกรมที่น้ำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 0 มิลลิกรัม	110
ค3 โครมาโตแกรมที่น้ำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 9.72 มิลลิกรัม	110
ค4 โครมาโตแกรมที่น้ำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 19.44 มิลลิกรัม	111
ค5 โครมาโตแกรมที่น้ำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 29.16 มิลลิกรัม	111
ค6 โครมาโตแกรมที่น้ำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 38.90 มิลลิกรัม	112
ค7 โครมาโตแกรมที่น้ำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 48.60 มิลลิกรัม	112
ค8 โครมาโตแกรมของไบโอดีเซลตัวอย่าง $T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 1:6$ $IM = 30$	114
ฅ1 โครมาโตแกรมของไบโอดีเซลสำหรับยืนยันสถานะที่เหมาะสม ($T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 1:6$ $IM = 30$) ตัวอย่างที่ 1	128
ฅ2 โครมาโตแกรมของไบโอดีเซลสำหรับยืนยันสถานะที่เหมาะสม ($T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 1:6$ $IM = 30$) ตัวอย่างที่ 2	130
ฅ3 โครมาโตแกรมของไบโอดีเซลสำหรับยืนยันสถานะที่เหมาะสม ($T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 1:6$ $IM = 30$) ตัวอย่างที่ 3	132
ช1 วิธีการหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ของสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์	138
ช2 วิธีการหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ 10 มิลลิโมลของน้ำมันเมล็ดดอก ทานตะวัน และ 37.5 มิลลิโมลของเมทานอล ที่ 30°C	139

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$^{\circ}\text{ซ}$	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม
มก./มล.	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
มล.	=	มิลลิลิตร
a_X	=	ความชันของกราฟมาตรฐาน
A_{is}	=	พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน
A_{FAME}	=	พื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์
b_X	=	จุดตัดแกนวายของกราฟมาตรฐาน
β_0	=	สัมประสิทธิ์ของเทอมค่าคงที่ของแบบจำลอง
β_i	=	สัมประสิทธิ์เชิงเส้นของแบบจำลอง
β_{ii}	=	สัมประสิทธิ์เชิงกำลังสองของแบบจำลอง
β_{ij}	=	สัมประสิทธิ์เชิงปัจจัยร่วมของแบบจำลอง
CS	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายรวม
df	=	Degree of freedom
ξ_i	=	ปัจจัยของการทดลองชนิดที่ i
FAME	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์
F_B	=	Block F-value
F_{Tr}	=	Treatment F-value
H_0	=	สมมติฐานหลัก
H_1	=	สมมติฐานวิจัย
IM	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง
$K_{m,tri}$	=	ค่าคงที่ของไมเคลลิสของไตรกลีเซอไรด์
$K_{m,MeOH}$	=	ค่าคงที่ของไมเคลลิสของเมทานอล
$K_{i,MeOH}$	=	ค่าคงที่การยับยั้งปฏิกิริยาของเมทานอล
α	=	ระดับนัยสำคัญ
α_i	=	อิทธิพลหลักของปัจจัย A
γ_i	=	อิทธิพลหลักของปัจจัย B

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

M	=	ความเข้มข้น (โมลต่อลิตร)
MO	=	อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน
MS	=	Mean square
MS(B)	=	Block mean square
MS(E)	=	Error mean square
MS(Tr)	=	Treatment mean square
[MeOH]	=	ความเข้มข้นของเมทานอล
μ	=	ค่าเฉลี่ยของประชากร
$\mu\text{mol/ml}$	=	ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
P	=	ค่าสถิติ P
pH	=	ค่าความเป็นกรดต่าง
p-NPP	=	พารา-ไนโตรฟินิล ปาล์มมิเตด
p-NP	=	พารา-ไนโตรฟินอล
R^2	=	ค่าสหสัมพันธ์ของแบบจำลอง
$R^2\text{-adj}$	=	ค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้ค่าของแบบจำลอง
S	=	ค่าผิดพลาดมาตรฐาน
SS(B)	=	Sum of square of block
SS(E)	=	Sum of square of error
SS(T)	=	Sum of square total
SS(Tr)	=	Sum of square of treatment
STTP	=	โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต
[Sunflower oil]	=	ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน
T	=	อุณหภูมิ
T	=	ค่าสถิติ T
[Trigly]	=	ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์
U	=	หน่วยของกิจกรรมการเร่งด้วยเอนไซม์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

V_i	=	อัตราการเกิดปฏิกิริยา
V_i^e	=	อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลอง
V_i^m	=	อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์
V_{max}	=	อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด
%v/v	=	ร้อยละโดยปริมาตรต่อปริมาตร
W	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำ
W_{FAME}	=	น้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ (mg)
$\bar{x}$	=	ค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง
y	=	ค่าตอบสนองจากการทดลอง
$\hat{y}$	=	ค่าตอบสนองจากแบบจำลอง

การใช้สถิติในการหาปัจจัยที่เหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันทานตะวันและ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกต้อง

Statistical Application to obtain the Optimum Condition of Biodiesel production from Sunflower Oil and Immobilized Lipase

คำนำ

ในปัจจุบันมนุษย์ใช้ทรัพยากรธรรมชาติต่างๆทั้งรูปแบบ อาหาร แร่ธาตุ และพลังงาน แต่เนื่องจากประชากรมนุษย์เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างมากในระยะเวลาอันสั้น ทำให้ทรัพยากรธรรมชาติลดลงจนก่อให้เกิดปัญหาความขาดแคลนทรัพยากรธรรมชาติต่างๆ ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่ง คือ การขาดแคลนแหล่งพลังงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดแคลนเชื้อเพลิงที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมันก๊าดโซลิน (Gasoline Oil) และน้ำมันดีเซล (Diesel Oil) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำมันดีเซลซึ่งถูกใช้ในปริมาณมากในแต่ละปี เนื่องจากเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงหลักในภาคการขนส่งและการผลิต ประกอบกับพลังงานทดแทนที่ใช้ทดแทนเชื้อเพลิงที่ได้จากฟอสซิลที่นำมาใช้ทดแทนน้ำมันก๊าดโซลิน และดีเซล เช่น ก๊าซธรรมชาติที่อาจหมดไปได้ในอนาคตอันใกล้ ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาและวิจัยหาแหล่งเชื้อเพลิงทดแทนใหม่ๆเพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิง ซึ่งแนวทางที่ดีประการหนึ่งคือการนำพลังงานที่ไม่มีวันหมดไปมาใช้ทดแทน (พิสมัย, 2544)

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นเชื้อเพลิงทดแทนที่มีศักยภาพ และมีข้อดีในหลายประการ เช่น วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตสามารถผลิตได้จากแหล่งพลังงานที่ไม่มีวันหมดไป เช่น น้ำมันจากพืช และเมื่อเผาไหม้ในเครื่องยนต์จะก่อให้เกิดคาร์บอนมอนอกไซด์ อนุภาคฝุ่นผงขนาดเล็ก และสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้ในปริมาณต่ำ การผลิตไบโอดีเซลสามารถทำได้ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันจากพืช สัตว์ หรือจุลสาหร่าย กับแอลกอฮอล์ โดยจำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้เร็วขึ้น โดยตัวเร่งปฏิกิริยามีหลายชนิดได้แก่ ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด เบส และตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปสเป็นต้น

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมหลายประเภท ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเกษตร เอนไซม์ไลเปสสามารถนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซลเพื่อ

ทดแทนตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดหรือเบส โดยถึงแม้ว่าตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด หรือเบสมีข้อดี คือ สามารถให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในปริมาณสูง แต่อย่างไรก็ดีตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด หรือเบสยังพบว่ามีข้อเสียอีกหลายประการเช่น ใช้อุณหภูมิระหว่างทำปฏิกิริยาค่อนข้างสูงคือสูงกว่า 60°ซ ซึ่งจำเป็นต้องมีการอุ่นน้ำมันก่อนทำปฏิกิริยา ทำให้ต้องใช้พลังงานในการผลิต อีกทั้งตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดหรือเบส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบเอกพันธ์ (Homogenous Catalyst) จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการแยกเอาตัวเร่งปฏิกิริยาออกจากผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้อาจทำการแยกด้วยน้ำ ทั้งนี้ น้ำล้างผลิตภัณฑ์ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยากรดหรือเบสอยู่เมื่อถูกปล่อยให้ปนเปื้อนไปกับสิ่งแวดล้อมอาจก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมาได้ ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสมีข้อดีหลายประการคือ สามารถเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิปกติ จึงไม่จำเป็นต้องใช้พลังงานในการอุ่นน้ำมัน อีกทั้งสามารถดึงเอนไซม์ไลเปสในวัสดุได้หลายชนิดซึ่งทำให้สามารถแยกเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงออกจากผลิตภัณฑ์ได้สะดวกและสามารถใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงซ้ำได้หลายครั้ง นอกจากนี้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไม่จำเป็นต้องล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยน้ำทำให้ลดต้นทุนที่เกิดจากการบำบัดน้ำทิ้งจากการผลิตไบโอดีเซลได้

โดยปกติงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสมีตัวแปรที่ต้องศึกษาหลายตัวแปร งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายประการหนึ่ง คือ สามารถเป็นแนวทางให้ผู้วิจัยศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสสามารถพิจารณาได้ว่าควรศึกษาปัจจัยใดเป็นสำคัญ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยสามารถลดจำนวนปัจจัยที่ศึกษาลงได้ โดยอาศัยวิธีการทางสถิติแต่ยังคงทำให้งานวิจัยที่ได้มีคุณภาพและใช้ทรัพยากรในการวิจัยประหยัดและมีประสิทธิภาพสูงสุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สถิติด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงโดยใช้สถิติด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman
3. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงโดยใช้สถิติด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken
4. เพื่อศึกษาหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* โดยปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วย อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายไกลโคซาน และ ร้อยละโดยปริมาตรของกรดอะซิติก
2. ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่
 - อุณหภูมิ ในช่วง 30 – 50 °C
 - อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ในช่วง 1.5:1 – 6:1
 - ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ในช่วง 10 – 50
 - ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายร่วม (นอร์มอล-เฮกเซน) ในช่วง 0 – 10
 - ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำ ในช่วง 0 – 6

3. สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ สภาวะต่างๆ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่

อุณหภูมิ ในช่วง 30 – 50 °C

อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ในช่วง 1.5:1 – 6:1

ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ในช่วง 10 – 50

4. ศึกษาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

การตรวจเอกสาร

1. ไขมันและน้ำมัน

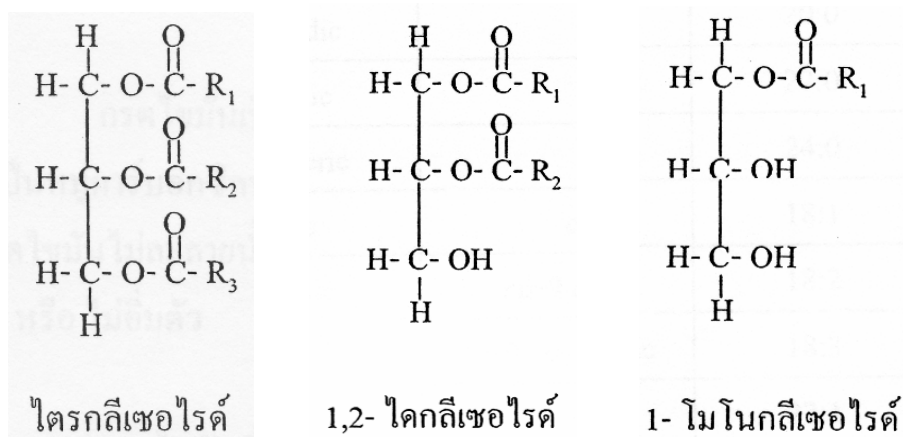
ไขมันและน้ำมันที่พบในสัตว์และพืชเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำโดยเป็นของผสมของไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) 90 – 98% ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) และ โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) ปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ยังอาจประกอบด้วยกรดไขมันอิสระ (Fatty acid) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างการเก็บรักษา ทั้งนี้องค์ประกอบต่างๆของสารในไขมันและน้ำมันเป็นดังนี้

1.1 ไตรกลีเซอไรด์

ไตรกลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันจำนวน 3 โมเลกุล และ กลีเซอรอลจำนวน 1 โมเลกุล โดยปกติไขมันที่พบในธรรมชาติซึ่งสามารถจำแนกตามแหล่งที่มาได้ 2 แหล่งคือ น้ำมันจากพืชซึ่งมักประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ซึ่งมักประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว และน้ำมันจากสัตว์ซึ่งมักประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (Ma and Hanna, 1999)

1.2 ไดกลีเซอไรด์และ โมโนกลีเซอไรด์

ไดกลีเซอไรด์และ โมโนกลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันจำนวนหนึ่งและสองโมเลกุลตามลำดับโดยยังคงมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อิสระเหลืออยู่ โดยไดกลีเซอไรด์และ โมโนกลีเซอไรด์จะเหลือหมู่ไฮดรอกซิลอยู่จำนวนหนึ่งและสองหมู่ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดย R_1 , R_2 และ R_3 คือกรดไขมัน



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์

1.3 กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ส่วนมากมีจำนวนคาร์บอนอะตอมระหว่าง 4-24 โดยปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิลปลายอีกข้างหนึ่งเป็นสายโซ่ยาวของไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้วซึ่งทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ โดยในธรรมชาติกรดไขมันจะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่โดยเป็นสายโซ่ยาวที่อิ่มตัวหรือไม่ก็ได้

ทั้งนี้กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์มักจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ระหว่าง 14-22 อะตอม โดยจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลระหว่าง 16 และ 18 จะพบได้มากที่สุด (คุชฎี, 2549) ลักษณะสำคัญประการหนึ่งของกรดไขมันคือเกลือของกรดไขมันสามารถสร้างไมเซลล์ในน้ำได้และไมเซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (อาภัสสร, 2537) ทั้งนี้โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไปแสดงได้ดังตารางที่ 1 และชนิดของกรดไขมันที่พบได้ทั่วไปในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ แสดงได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไป

Fatty acid	Structure name	Structure	Formula
Lauric	Decanoic	12:0	$C_{12}H_{24}O_2$
Myristic	Tetradecanoic	14:0	$C_{14}H_{28}O_2$
Palmitic	Hexadecanoic	16:0	$C_{16}H_{32}O_2$
Stearic	Octadecanoic	18:0	$C_{18}H_{36}O_2$
Arachidic	Elcosanic	20:0	$C_{20}H_{40}O_2$
Behenic	Docosanoic	22:0	$C_{22}H_{44}O_2$
Lignoceric	Tetracosanoic	24:0	$C_{24}H_{48}O_2$
Oleic	Cis-9- Octadecanoic	18:1	$C_{18}H_{34}O_2$
Linoleic	Cis-9,cis-12- Octadienoic	18:2	$C_{18}H_{32}O_2$
Linolenic	Cis-9,cis-12,cis-15- Octatrienoic	18:3	$C_{18}H_{30}O_2$
Erueic	Cis-13-Docosenoic	22:1	$C_{22}H_{42}O_2$

ที่มา: Srivastava and Prasad (2000)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืช

Vegetable oil	Fatty acid composition, wt%								
	16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	18:1	22:1	18:2	18:3
Corn	12	2	-	0	0	25	0	6	-
Cottonseed	28	1	0	0	0	13	0	58	0
Linseed	5	2	0	0	0	20	0	18	55
Peanut	11	2	1	2	1	48	0	32	1
Rapeseed	3	1	0	0	0	64	0	22	8
High oleic sunflower	5	2	Tr	0	0	79	0	13	0
Sunflower	6	3	0	0	0	17	0	74	0
Soya been	12	3	0	0	0	23	0	55	6

ที่มา: Srivastava and Prasad (2000)

2. ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือแอลคิลเอสเทอร์ (Alkyl Esters) ของกรดไขมัน สามารถผลิตได้จากไขมันหรือน้ำมันจากพืชหรือสัตว์ มีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้คือ มีความหนืดใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล มีความคงตัวคือมีการเปลี่ยนแปลงความหนืดน้อยมากเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง มีจุดวาบไฟที่สูงกว่าน้ำมันดีเซลจึงทำให้มีความปลอดภัยในการขนส่งและการจัดเก็บ มีธาตุออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 10 – 11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จึงทำให้การเผาไหม้ในเครื่องยนต์มีความสมบูรณ์มากกว่า ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไบโอดีเซลสามารถแสดงได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล

Vegetable Oil methyl ester	Kinematic viscosity (mm ² /s)	Cetane Number	Lower heating value (MJ/l)	Cloud point (°C)	Flash point (°C)	Density (g/ml)	Sulfur content (wt%)
Peanut ^a	4.9 (37.8°C)	54	33.6	5	176	0.883	-
Soybean ^a	4.5 (37.8°C)	45	33.5	1	178	0.885	-
Soybean ^b	4 (40.0°C)	45.7-46	32.7	-	-	0.880 (15°C)	-
Babassu ^a	3.6 (37.8°C)	63	31.8	4	127	0.879	-
Palm ^a	5.7 (37.8°C)	62	33.5	13	164	0.880	-
Palm ^b	4.3-4.5 (40°C)	64.3-70	32.4	-	-	0.872-0.877 (15°C)	-
Sunflower ^a	4.6 (37.8°C)	49	33.5	1	183	0.860	-
Tallow ^a	-	-	-	12	96	-	-
Rapeseed ^b	4.2 (40°C)	51-59.7	32.8	-	-	0.882	0.002
Used rapeseed ^c	9.8 (30°C)	53	36.7	-	192	0.895	0.0013
Used corn oil ^c	6.23 (30°C)	63.9	42.3	-	166	0.884	-
Diesel fuel ^b	1.2-3.5 (40°C)	51	35.5	-	-	0.830-0.840 (15°C)	0.05

ที่มา: ^aSrivastava and Prasad (2000) ^bVarese and Varese (1996) ^cYamane *et al.*, (2001)

ในปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลเป็นการนำน้ำมันพืช หรือสัตว์ตลอดจนน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้วมาผ่านการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยการทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์เช่นเมทานอล หรือ เอทานอล โดยปฏิกิริยานี้จำเป็นต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนให้เป็นแอลคิลเอสเทอร์และกลีเซอรอล

2.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

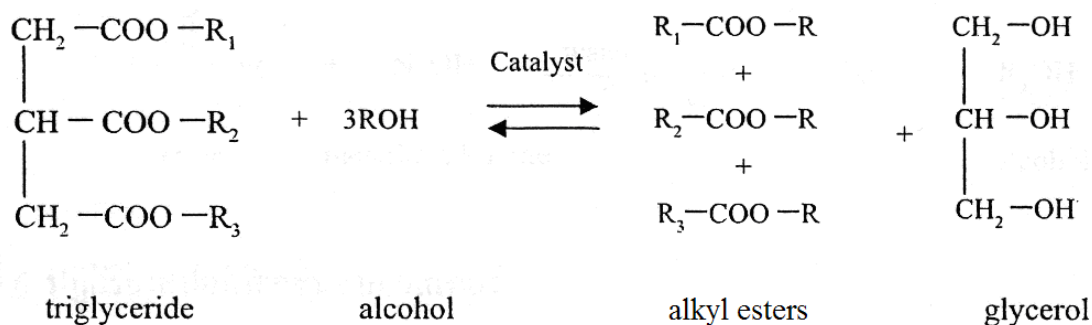
ในปัจจุบันมีวิธีการผลิตไบโอดีเซลหลายวิธี ทั้งนี้อาจแบ่งวิธีการผลิตได้เป็น 3 วิธี (Khan, 2002) คือ

2.1.1 การใช้โดยตรงและการผสม (Direct Use and Blending)

วิธีการใช้โดยตรงอาจสามารถเติมน้ำมันพืชบริสุทธิ์ได้โดยตรงกับเครื่องยนต์ดีเซล เนื่องจากในการออกแบบเครื่องยนต์ดีเซลตั้งแต่เริ่มต้นก็มีวัตถุประสงค์ให้ใช้น้ำมันพืชหรือสัตว์ในการเป็นเชื้อเพลิงอยู่แล้ว แต่ในอดีตน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมมีราคาถูกจึงทำให้มีการพัฒนาเครื่องยนต์ดีเซลให้เหมาะสมกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมมากกว่าที่จะใช้น้ำมันจากพืชและสัตว์โดยตรง ดังนั้นวิธีการใช้โดยตรงจึงอาจเหมาะกับเครื่องยนต์ดีเซลที่ใช้ในภาคอุตสาหกรรมเกษตรในครัวเรือน แต่อาจไม่เหมาะกับภาคอุตสาหกรรมขนส่ง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันจากพืชหรือสัตว์ที่ไม่ผ่านกระบวนการผลิตเป็นไบโอดีเซลอาจมีความหนืดสูง มีปริมาณกรดไขมันอิสระและยางเหนียวที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและพอลิเมอร์ไรเซชันในระหว่างการเก็บรักษา (Fukuda *et al.*, 2001) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการทดลองว่าการผสมน้ำมันพืชลงไปนํ้ามันดีเซลในอัตราส่วน น้ำมันพืชต่อน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 1:10 ถึง 2:10 สามารถนำไปใช้งานได้ (คุชฎี, 2549)

2.1.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification Reaction)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาเคมีระหว่างไขมันกับแอลกอฮอล์เพื่อเปลี่ยนรูปให้เป็นสารประกอบเอสเทอร์โดยมีผลิตภัณฑ์ร่วมคือกลีเซอรอล ซึ่งปฏิกิริยาทั่วไปแสดงได้ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์

ทั้งนี้ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกริยาผันกลับได้ โดยปฏิกริยาเริ่มจากไตรกลีเซอไรด์ถูกเปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ จากนั้นไดกลีเซอไรด์จะถูกเปลี่ยนเป็นโมโนกลีเซอไรด์ และ โมโนกลีเซอไรด์จะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอล ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์หนึ่งโมเลกุล โดยอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อไตรกลีเซอไรด์คือ 3:1 หรืออาจเพิ่มขึ้นเป็น 6:1 เพื่อเพิ่มผลผลิต ทั้งนี้ตัวเร่งปฏิกริยาที่ใช้อาจเป็น สารละลายกรด สารละลายเบส และเอนไซม์ไลเปส และแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกริยาได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และเอมิลแอลกอฮอล์

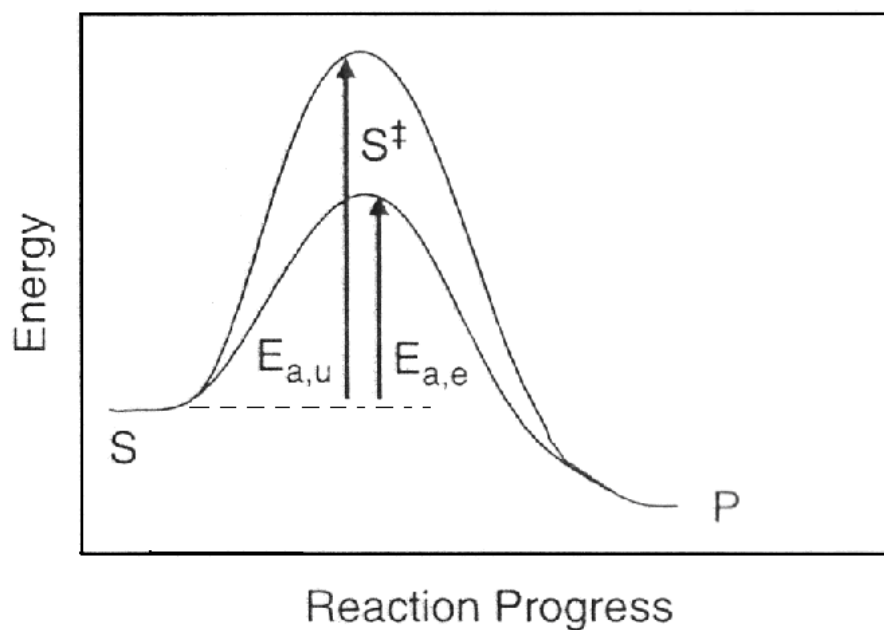
2.1.3 ปฏิกริยาเมทานอลเหนือวิกฤต (Supercritical Methanol)

ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเกิดได้โดยปราศจากตัวเร่งปฏิกริยาโดยใช้เมทานอลที่สภาวะเหนือวิกฤต ซึ่งจะต้องทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิและความดันสูงซึ่งอาจต้องทำให้ใช้ต้นทุนในการผลิตสูงเพื่อสร้างสภาวะดังกล่าว แต่มีข้อดีคือให้สารผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง (Nagesha *et al.*, 2004)

3. เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสถูกจัดเป็นเอนไซม์ประเภท Triglycerol Acylhydrolases ตาม The International Union of Biochemistry (IUB) System มีรหัสเป็น EC.3.1.1.3 โดยทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายโมเลกุลของน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล ปฏิกริยาการย่อยสลายนี้สามารถผันกลับได้ในระบบที่มีน้ำน้อย (Microaqueous) หรือในระบบของตัวทำละลายอินทรีย์ โดยปฏิกริยาผันกลับได้นี้พบได้ทั้งสองปฏิกริยาชื่อปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและเอสเทอร์ฟิเคชัน

เอนไซม์ไคเลเปสมีคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพโดยทำหน้าที่ลดพลังงานกระตุ้น (Activation Energy) ของปฏิกิริยา ทั้งนี้ทำให้ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้เร็วขึ้นแต่ไม่ทำให้สมดุลเคมีของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไป (Marangoni, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงพลังงานภายในของระบบที่มีปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้น

ที่มา: Marangoni, 2003

- เมื่อ S = สารตั้งต้น
 P = สารผลิตภัณฑ์
 $E_{a,e}$ = พลังงานกระตุ้นเมื่อมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบ
 $E_{a,u}$ = พลังงานกระตุ้นที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
 $S^\ddagger$ = สารตั้งต้นในสถานะกระตุ้น

ทั้งนี้ข้อดีของปฏิกิริยาเคมีที่มีการเร่งด้วยเอนไซม์ที่ดีกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีชนิดอื่นคือ

(Lee, 1992)

1. เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นสูง
2. เอนไซม์มีเสถียรภาพดีเมื่อมีการเกาะบนตัวพาหะ
3. อัตราการเกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ที่มักจะมีค่าสูงกว่าปฏิกิริยาชนิดเดียวกันที่ถูกเร่งโดยตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี
4. สภาวะของปฏิกิริยาเช่นอุณหภูมิ ความดัน และค่าความเป็นกรดและด่างมักเป็นสภาวะไม่รุนแรง
5. สามารถพัฒนาให้ใช้เอนไซม์หลายชนิดในปฏิกิริยาเดียวกันได้
6. ผลิตภัณฑ์มักไม่ปนเปื้อนไปด้วยเอนไซม์จึงเหมาะกับการผลิตอาหารและยา
7. สามารถหยุดปฏิกิริยาได้ง่ายโดยการแยกเอาเอนไซม์ออกไปโดยเฉพาะเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวพาหะ
8. สามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย

3.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของน้ำมันหรือไขมันในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงสามารถพบเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (ณัฏฐภัทร, 2547)

3.1.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (Animal Lipase)

เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ชนิดแรกที่มนุษย์ค้นพบคือเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน (Pancreatic Lipase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลไขมันในระบบย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเอนไซม์ชนิดดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่ผลิตโดยเนื้อเยื่อ (Tissue Lipase) ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สนใจเอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ตระกูล *Canine* เนื่องจากมีลำดับของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับเอนไซม์ไลเปสจากมนุษย์ ซึ่งอาจใช้ทดแทนเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์สำหรับมนุษย์ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้

3.1.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช (Plant Lipase)

เอนไซม์ไลเปสจากพืชพบได้ในส่วนต่างๆของพืชที่มีการสะสมน้ำมันเช่น ผลปาล์ม เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดดอกทานตะวัน มะกอก ข้าวสาลี และข้าวเจ้าเป็นต้น ซึ่งเอนไซม์

ไลเปสที่ผลิตจากพืชจะมีความจำเพาะต่อซับสเตรตสูง มีสมบัติจำเพาะซึ่งไม่สามารถพบคุณลักษณะดังกล่าวในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และจุลินทรีย์

3.1.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (Microbial Lipase)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นมีความหลากหลายมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสจากสัตว์และพืช นอกจากนี้ยังสกัดออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ได้สะดวกกว่าการสกัดจากเนื้อเยื่อของสัตว์และพืช จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

3.2 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อกรดไขมันตำแหน่งที่ 1 ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ทำให้สามารถจำแนกชนิดของเอนไซม์ไลเปสได้เป็นสามกลุ่ม (Macrae, 1983) คือ

กลุ่มที่หนึ่ง คือ เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ 1 และ 3 ซึ่งไฮโดรไลสไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันอิสระและ 1,2- หรือ 2,3-ไดกลีเซอไรด์ และได้ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอลที่อาจไม่เสถียร และหากใช้เวลาในการย่อยนานขึ้นจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรอลและ 1- หรือ 3-โมโนเอซิลกลีเซอรอล แต่ถ้าให้ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus arrhizus* และ เอนไซม์ไลเปสจากรำข้าวเป็นต้น

กลุ่มที่สอง คือ เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ สามารถย่อยได้เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล แต่อาจพบไดกลีเซอไรด์ และ โมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางระหว่างปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้เช่น ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphyococcus aureus* และ เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของสุกรเป็นต้น

กลุ่มที่สาม คือ เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มักไม่แสดงคุณสมบัตินี้ แต่อาจมีจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *Geotrichum candidum* ที่สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันสายโมเลกุลยาวที่ประกอบด้วยพันธะคู่ที่เป็น cis-form ในตำแหน่งที่ 9

3.3. เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากหรือไม่ได้เลย (ปราณี, 2535) วิธีจับตรึงเอนไซม์แบ่งได้ดังนี้

3.3.1 วิธีจับบนตัวพาหะ (Carrier Binding Method)

วิธีจับบนตัวพาหะเป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุดในเทคนิคการตรึงเอนไซม์ ในวิธีการดังกล่าว เอนไซม์จะถูกจับอยู่บนตัวพาหะโดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของตัวพาหะ วิธีการนี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธีซึ่งข้อดีและข้อเสียของแต่ละวิธีแสดงได้ในตารางที่ 4

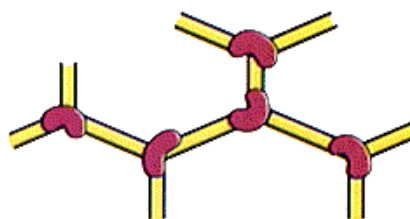
ตารางที่ 4 ข้อดีและข้อเสียของวิธีการตรึงเอนไซม์แบบจับบนตัวพาหะ

วิธีการ	ข้อดี	ข้อเสีย
การดูดซับทางกายภาพ	1. มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์หลังการตรึงน้อยมาก 2. ง่ายและราคาถูก	1. อาจเกิดการคายซับของโปรตีนจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเป็นกรดและด่าง
การสร้างพันธะโควาเลนต์	1. เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีความเสถียรสูง ทำให้ลดโอกาสที่เอนไซม์จะถูกชะไปเมื่อป้อนสารตั้งต้นผ่านเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้	1. ราคาสูง 2. ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อาจเปลี่ยนแปลงเนื่องจากพื้นที่ว่างไวต่อปฏิกิริยาอาจเปลี่ยนแปลงเนื่องจากเกิดพันธะโควาเลนต์
การสร้างพันธะไอออนิก	1. สภาพในการตรึงไม่รุนแรง เหมือนกับการสร้างพันธะโควาเลนต์ 2. มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงน้อยมาก	1. อาจเกิดการสูญเสียเอนไซม์ โดยเฉพาะสารตั้งต้นที่มีความแรงของไอออนสูงหรือมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างมาก

ที่มา: Lee (1992)

3.3.2 วิธีเชื่อมไขว้ (Cross Link Method)

วิธีเชื่อมไขว้เป็นวิธีที่อาศัยพันธะโควาเลนต์ระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยกันซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ได้ ทั้งนี้การจับแบบเชื่อมไขว้เป็นการจับกันแบบสามมิติดังแสดงในภาพที่ 4

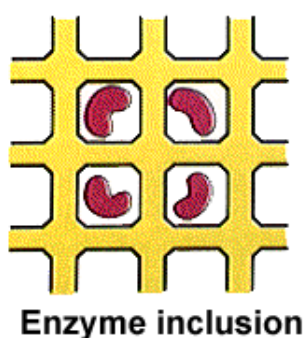


ภาพที่ 4 การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมไขว้

ที่มา: http://www.agen.ufl.edu/%7Echyn/age4660/lect/lect_21/FG12_017.GIF

3.3.3 วิธีการห่อหุ้ม (The Entrapment Method)

วิธีการห่อหุ้มเป็นวิธีที่ตรึงเอนไซม์บนโครงผลึกของพอลิเมอร์หรือเมมเบรน ซึ่งสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 5 ซึ่งอาจแบ่งได้เป็นสองวิธีคือ วิธีการห่อหุ้มในโครงผลึก (ภาพที่ 5 ก) และวิธีห่อหุ้มในแคปซูล (ภาพที่ 5 ข)



(ก) ในพาหะแบบโครงผลึก



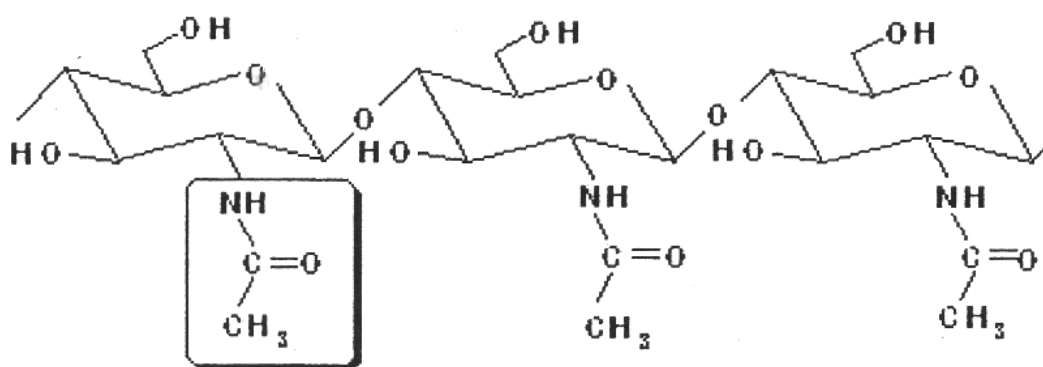
(ข) ในพาหะแบบแคปซูล

ภาพที่ 5 การตรึงเอนไซม์แบบห่อหุ้ม

ที่มา: http://www.agen.ufl.edu/%7Echyn/age4660/lect/lect_21/FG12_017.GIF

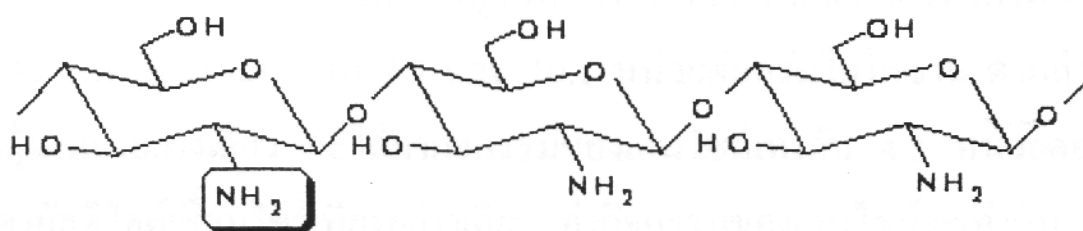
3.4 การใช้ไคโตซานเป็นตัวพุงสำหรับเอนไซม์

ไคโตซานเป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติที่มีมากที่สุดในโลกรองจากเซลลูโลส รู้จักเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีธาตุไนโตรเจนเกาะอยู่ในโมเลกุล ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่ acetyl ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ออกตั้งแต่ร้อยละ 50 ขึ้นไป และมีคุณสมบัติละลายได้ในกรดอ่อน โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซานแสดงได้ดังภาพที่ 6 และ 7



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของไคติน

ที่มา: ประภัสสร (2548)



ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ที่มา: ประภัสสร (2548)

Juang *et al.*, (2001) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ Acid phosphatase บนไคโตซานโดยใช้กลูตาอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 5000 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสถานะในการตรึง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 377 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 5 อุณหภูมิ 4 °ซ และใช้เวลาในการตรึง 18 ชั่วโมง จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อนาที

Pereira *et al.*, (2003) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* และไลเปส *Porcine pancreas* บนไคโตซานด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ โดยใช้ไคโตซานชนิดแผ่นและชนิดเม็ด ที่อัตราส่วนระหว่างไคโตซานต่อไลเปสเท่ากับ 1:0.25 โดยใช้เวลาในการตรึง 3 ชั่วโมงพบว่าเมื่อใช้ไคโตซานชนิดเม็ดในการตรึงไลเปสทั้ง 2 ชนิด จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเมื่อใช้ไคโตซานชนิดแผ่น โดยไลเปสจาก *Candida rugosa* จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 42.7 หน่วยต่อมิลลิกรัม ส่วนไลเปสจาก *Porcine pancreas* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 42.6 หน่วยต่อมิลลิกรัม

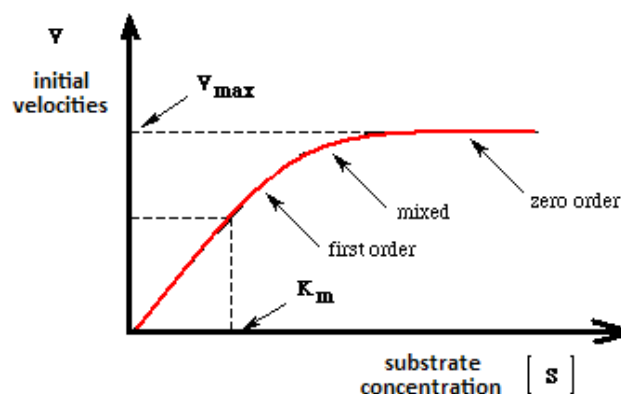
Chiou and Wu (2004) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* บนไคโตซานโดยใช้คาร์บอกซีมาดในการกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลของไคโตซาน เนื่องจากโครงสร้างของไคโตซานประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลจำนวน 2 หมู่ ทำให้เอนไซม์สามารถยึดจับบนไคโตซานได้เพิ่มขึ้นที่สถานะการตรึงคือความเข้มข้นของคาร์บอกซีมาด 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พีเอช 6 อุณหภูมิ 25 °ซ พบว่าจะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 3.28 หน่วยต่อกรัมไคซาน

4. จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์

จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากข้อมูลจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาจะถูกใช้ในการออกแบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Doran,1995) ทั้งนี้ในการหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์นิยมใช้วิธีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น (Initial Rate Method) เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์มีข้อจำกัดอยู่ประการหนึ่งคือจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่ค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นได้มากที่สุดค่าหนึ่งเท่านั้น เมื่อความเข้มข้นเกินกว่าค่านี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะมีค่าคงที่ ทั้งนี้ชนิดของจลนพลศาสตร์ถูกพิจารณาตามชนิดของกลไกของปฏิกิริยาได้ดังนี้

4.1 จลนพลศาสตร์ของสารตั้งต้นชนิดเดียว

จลนพลศาสตร์ของสารตั้งต้นชนิดเดียวเป็นจลนพลศาสตร์อย่างง่าย ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ด้วยสมการของไมเคิลลิส และ เมนเทน (Michaelis and Menten) ซึ่งได้แบ่งช่วงของการเกิดปฏิกิริยาเป็น 3 ช่วงคือช่วงของความเข้มข้นเริ่มต้นของสารตั้งต้นมีค่าต่ำ จะได้อัตราการเร็วปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นแบบอันดับที่หนึ่ง แต่เมื่อถึงความเข้มข้นเริ่มต้นที่สูงพอเป็นค่าหนึ่งอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นอันดับที่ศูนย์ ในขณะที่ช่วงการเปลี่ยนแปลงจะมีอันดับของปฏิกิริยาเป็นแบบผสม (Barker and Leach, 1993) ทั้งนี้ภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นเริ่มต้นชนิดเดียว

ที่มา: http://osp.mans.edu.eg/medbiochem_mi/Cources/Biochemistry/1st_year_medicine/

Enzymes /files/figures/13_7.gif

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

โดยที่ V = อัตราการเกิดปฏิกิริยา

$V_{\max}$ = อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด

K_m = ค่าคงที่ของไมเคิลลิส

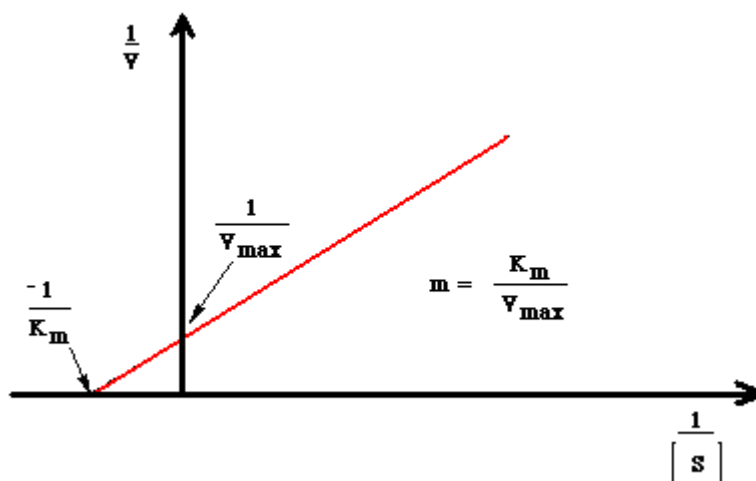
$[S]$ = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

สมการดังกล่าวเรียกว่าสมการของไมเคิลลิสและเมนเทน เพื่อหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์

สมการที่ (1) ถูกจัดรูปใหม่ตามวิธีการของไลวีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk) ดังนี้

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ กับ $1/[S]$ จะได้ $K_m/V_{\max}$ คือความชันของกราฟ (m) และ $1/V_{\max}$ คือจุดตัดแกน y ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ กับ $1/[S]$ ตามวิธีของ Lineweaver-Burk

ที่มา: http://osp.mans.edu.eg/medbiochem_mi/Cources/Biochemistry/1st_year_medicine/

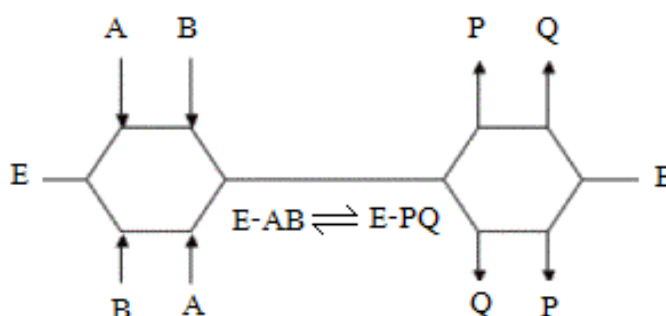
Enzymes/files/figures/l3_8.gif

4.2 จลนพลศาสตร์ของสารตั้งต้นสองชนิด

ปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลเป็นปฏิกิริยาที่มีสารตั้งต้นสองชนิด คือ ไตรกลีเซอไรด์ และ แอลกอฮอล์ ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาของสารตั้งต้นสองชนิดแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (Barker and Leach, 1993) คือ

กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาแบบสุ่ม (Random-sequential Bi Bi Mechanism)

กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาแบบสุ่มของสารตั้งต้น A และ B ที่เข้าจับกับพื้นที่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ก่อนที่สารผลิตภัณฑ์ P และ Q จะเกิดขึ้น โดยที่สารตั้งต้น A และ B จะเข้าจับกับพื้นที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาแบบสุ่มทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ P และ Q ที่เกิดขึ้นเป็นแบบสุ่มด้วยโดยภาพที่ 10 แสดงกลไกของปฏิกิริยาแบบสุ่ม

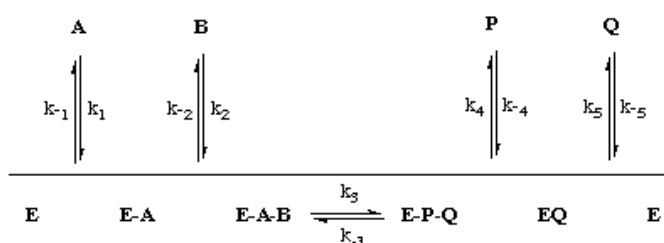


ภาพที่ 10 กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาแบบสุ่ม

ที่มา: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/transkinetics/random.GIF>

กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาแบบเป็นลำดับ (Ordered Bi Bi Mechanism)

กลไกชนิดนี้สารตั้งต้น A และ B ที่เข้าจับกับพื้นที่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ ก่อนที่สารผลิตภัณฑ์ P และ Q จะเกิดขึ้น โดยที่สารตั้งต้น A และ B จะเข้าจับกับพื้นที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาแบบตามลำดับกล่าวคือสารตั้งต้น A ต้องเข้าจับกับพื้นที่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาก่อนสารตั้งต้น B แล้วทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ P และ Q ที่เกิดขึ้นตามลำดับ

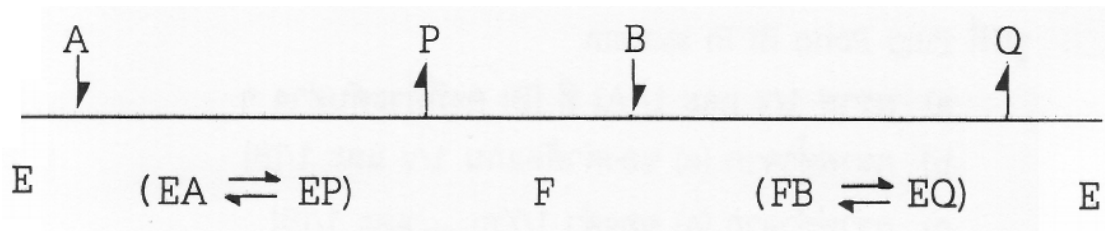


ภาพที่ 11 กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาแบบเป็นลำดับ

ที่มา: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/transkinetics/sequential.GIF>

กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาแบบปิงปอง (Ping Pong Bi Bi Mechanism)

กลไกชนิดนี้สารตั้งต้น A จะเข้าจับกับพื้นที่ที่ว่างไว้ต่อปฏิกิริยาแล้วจึงเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ P ก่อน จากนั้นสารตั้งต้น B จะเข้าจับกับพื้นที่ที่ว่างไว้ต่อปฏิกิริยาแล้วเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ Q ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาแสดงได้ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาแบบปิงปอง

ที่มา: ปราณี, 2535

ทั้งนี้มิงงานวิจัยหลายงานที่พบว่ากลไกการเร่งปฏิกิริยาของปฏิกิริยาของการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็นกลไกแบบปิงปอง ไบ ไบ (Hari and Karanth, 2001) ซึ่งการหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาหาได้ดังนี้

$$K_m^A = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad (3)$$

$$K_m^B = \frac{k_{-3} + k_4}{k_3} = \frac{[E']B}{[E'B]} \quad (4)$$

$$[E_T] = [E] + [EA] + [E'] + [E'B] \quad (5)$$

ทั้งนี้สมการแสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยากับความเข้มข้นของสารตั้งต้น A และ B เป็นดัง

สมการ

$$\frac{V_i}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{(k_4 / k_1)K_m^A[B] + K_m^B[A] + [A][B]\left(1 + \frac{k_4}{k_2}\right)} \quad (6)$$

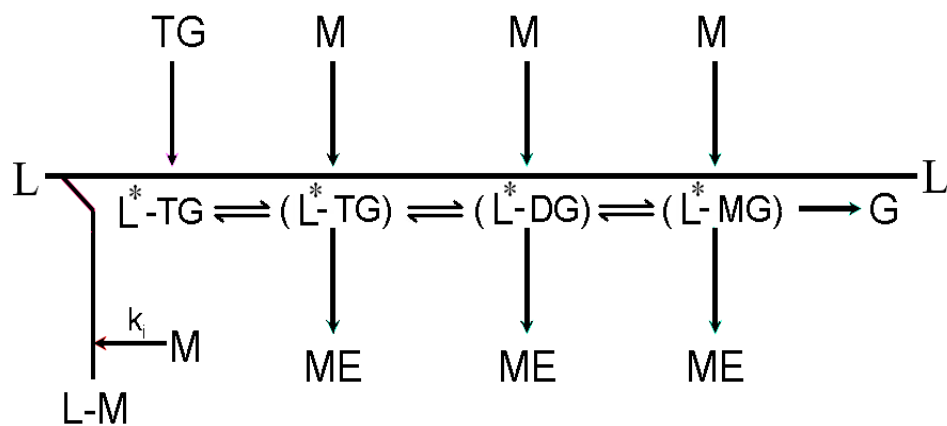
เมื่อ $V_{\max} = k_{cat} [E_T]$ และ $k_{cat} = k_4$ แต่อย่างไรก็ดีขั้นตอนกำหนดปฏิกิริยาคือขั้นตอนการเปลี่ยน EB ไปเป็น EQ จะได้ $k_2 \gg k_4$ ดังนั้นสมการปิงปอง สามารถลดรูปลงได้เป็น

$$\frac{V_i}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{\alpha K_m^A [B] + K_m^B [A] + [A][B]} \quad (7)$$

$$\text{เมื่อ } \alpha = k_4 / k_2$$

5. จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปส

กลไกการผลิตไบโอดีเซลจากไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์ จะเกิดการยับยั้งด้วยปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่เอนไซม์สามารถทนได้ การยับยั้งปฏิกิริยานี้พื้นที่ว่างไว้ในเอนไซม์ไลเปสจะถูกจับโดยโมเลกุลของแอลกอฮอล์แบบถาวรจึงทำให้ไม่สามารถใช้พื้นที่ว่างในการเร่งปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเมทานอลได้ ทั้งนี้สามารถเขียนกลไกของปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลจากไตรกลีเซอไรด์และเมทานอลได้เป็นดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 กลไกของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์และเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปส

เมื่อ L = ไลเปส M = เมทานอล TG = ไตรกลีเซอไรด์ ME = เมทิลเอสเทอร์

G = กลีเซอรอล L^*-TG = ไลเปส-ไตรกลีเซอไรด์คอมเพล็กซ์

L^*-DG = ไลเปส-ไดกลีเซอไรด์คอมเพล็กซ์

L^*-MG = ไลเปส-โมโนกลีเซอไรด์คอมเพล็กซ์

ที่มา: Kasipar *et al.*, (2007)

Combes and Marty (2002) และ Yuanyuan *et al.*, (2005) พบว่าจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์และเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสมีกลไกของปฏิกิริยาเป็นแบบปิงปอง ไบ ไบ (Ping Pong Bi Bi) ซึ่งค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นกับความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ และ เมทานอลเป็นไปดั่งสมการ

$$\frac{V_i}{V_{\max}} = \frac{[Trigly][MeOH]}{K_{m,Trigly}[MeOH] \left(1 + \frac{[MeOH]}{K_{i,MeOH}}\right) + K_{m,MeOH}[Trigly] + [Trigly][MeOH]} \quad (8)$$

เมื่อ V_i	=	อัตราการเกิดปฏิกิริยา
$V_{\max}$	=	อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด
$[Trigly]$	=	ความเข้มข้นเริ่มต้นของไตรกลีเซอไรด์
$[MeOH]$	=	ความเข้มข้นเริ่มต้นของเมทานอล
$K_{m,Trigly}$	=	ค่าคงที่ของไมเคลลิสของไตรกลีเซอไรด์
$K_{m,MeOH}$	=	ค่าคงที่ของไมเคลลิสของเมทานอล
$K_{i,MeOH}$	=	ค่าคงที่การยับยั้งปฏิกิริยาของเมทานอล

โดยวิธีการที่ใช้ในการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆในสมการ (8) สามารถทำได้ 2 วิธีการคือ

5.1 วิธีการสร้างกราฟสองขั้นตอน (Double Reciprocal Plot)

วิธีกราฟเป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์ โดยเป็นวิธีการจัดรูปสมการ (8) ใหม่ได้ดังนี้

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_{m,Trigly}[MeOH]}{V_{\max}[Trigly][MeOH]} \left(1 + \frac{[MeOH]}{K_{i,MeOH}}\right) + \frac{K_{m,MeOH}[Trigly]}{V_{\max}[Trigly][MeOH]} + \frac{[Trigly][MeOH]}{V_{\max}[Trigly][MeOH]} \quad (9)$$

เมื่อจัดสมการให้อยู่ในรูปสมการเส้นตรงจะได้

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_{m, Tri}}{V_{max}} \left(1 + \frac{[MeOH]}{K_{i, MeOH}} \right) \cdot \left(\frac{1}{[Trigly]} \right) + \left(\frac{K_{m, MeOH}}{V_{max} [MeOH]} + \frac{1}{V_{max}} \right) \quad (10)$$

ทำการทดลองหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ เมทานอลที่แตกต่างกัน แล้วจึงสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{V_i}$ กับ $\frac{1}{[Trigly]}$ จะได้ความสัมพันธ์เป็น เส้นตรงที่มีค่าความชันคือ $\frac{K_{m, Tri}}{V_{max}} \left(1 + \frac{[MeOH]}{K_{i, MeOH}} \right)$ และจุดตัดแกนวายคือ $\left(\frac{K_{m, MeOH}}{V_{max} [MeOH]} + \frac{1}{V_{max}} \right)$ ทั้งนี้ความชันที่ได้จากสมการที่ 10 จะพบว่าเป็นฟังก์ชันกับความเข้มข้นของเมทานอล และ จุดตัดแกน ยายเป็นฟังก์ชันกับส่วนกลับของความเข้มข้นของเมทานอล

ดังนั้นเมื่อนำความชันและจุดตัดแกนวายที่ได้มาทำการสร้างกราฟซ้ำ (Double Reciprocal Plot) ทำให้สามารถหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอก ทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกดองได้

5.2 วิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์ (Computer Numerical Method)

วิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์เป็นวิธีที่ถูกเสนอโดย Combes and Marty (2002) เนื่องจาก พบว่าค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จากวิธีการสร้างกราฟสองชั้นตอนให้ค่าที่ผิดพลาดสูง โดยวิธีนี้ เป็นการพิจารณาผลต่างกำลังสองน้อยที่สุด (Least Square Method) ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จาก การทดลองกับค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการ (8) โดยทำ การสุ่มตัวเลขค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Excel (จงกล, 2549) ซึ่งสมการ สำหรับการพิจารณาผลต่างกำลังสองน้อยที่สุดแสดงได้ดังสมการ

$$Total\ error = \sum_i (v_i^e - v_i^m)^2 \quad (11)$$

เมื่อ

V_i^e = อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลอง

V_i^m = อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์

6. การออกแบบการทดลองทางสถิติ

การออกแบบการทดลองทางสถิติเป็นวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยซึ่งในทางสถิติจะเรียกว่าทรีตเมนต์ (Treatment) กับผลได้ของการทดลอง (Yield) ทั้งนี้การออกแบบการทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 3 ชนิดคือ

6.1 การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA อาศัยการทดสอบสมมติฐานดังนี้ (สุณี, 2547)

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$$H_1 : \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ของ } \mu_i \text{ และ } \mu_j$$

เมื่อ H_0 คือสมมติฐานหลัก

H_1 คือสมมติฐานทางเลือก หรือ สมมติฐานวิจัย

μ_i และ μ_j คือค่าเฉลี่ยของผลได้ของการทดลองที่ทำการทดลองเปลี่ยนทรีตเมนต์ ที่ i และ j ตามลำดับ

ทั้งนี้สมมติฐานหลัก (H_0) เป็นสมมติฐานที่ต้องทดสอบว่าสามารถปฏิเสธได้หรือไม่ โดยหากสามารถปฏิเสธได้แสดงว่าสมมติฐานเลือกหรือสมมติฐานวิจัยถูกต้อง และ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลง สถานะของทรีตเมนต์ทำให้ค่าเฉลี่ยผลได้เปลี่ยนไป

6.2 การออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

การออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman เป็นหนึ่งในวิธีการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial Design) ซึ่งเป็นการทดลองที่มีทรีตเมนต์ประกอบด้วยการรวมกันของระดับของปัจจัยตั้งแต่ 2 ปัจจัยขึ้นไป (วิจิตร, 2543)

การออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman อาศัยการทดสอบสมมติฐานดังนี้
(ประไพศรี และ พงษ์ชนัน, 2551)

การทดสอบสมมติฐานของปัจจัย A

$$H_0 : \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \dots = \alpha_k \quad (\text{ไม่มีอิทธิพลหลักของปัจจัย A})$$

$$H_1 : \alpha_i \neq 0 \text{ อย่างน้อย 1 ค่า}$$

การทดสอบสมมติฐานของปัจจัย B

$$H_0 : \gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \dots = \gamma_k \quad (\text{ไม่มีอิทธิพลหลักของปัจจัย B})$$

$$H_1 : \gamma_i \neq 0 \text{ อย่างน้อย 1 ค่า}$$

การทดสอบสมมติฐานของอิทธิพลร่วมระหว่างสองปัจจัย

$$H_0 : (\alpha\gamma)_{11} = (\alpha\gamma)_{12} = \dots = (\alpha\gamma)_{ij} \quad (\text{ไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย A และ B})$$

$$H_1 : (\alpha\gamma)_{ij} \neq 0 \text{ อย่างน้อย 1 ค่า}$$

เมื่อ H_0 คือสมมติฐานหลัก

H_1 คือสมมติฐานทางเลือก หรือ สมมติฐานวิจัย

α_i และ γ_j คืออิทธิพลหลักของปัจจัย A และ B ตามลำดับ

$(\alpha\gamma)_{ij}$ คืออิทธิพลร่วมของปัจจัย A และ B

6.3 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken เป็นการออกแบบการทดลองที่เหมาะสมสำหรับปัจจัยเชิงปริมาณ (Myers, 1979) เช่น เวลา อุณหภูมิ ความดัน ความเข้มข้น ฯลฯ การออกแบบการทดลองนี้อาศัยหลักการรวมของการทดลองแฟคทอเรียลผนวกกับจุดกึ่งกลาง ทำให้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken มีประสิทธิภาพสูงและสามารถประมาณค่าผลกระทบเชิงเส้น

ผลกระทบกำลังสอง และผลกระทบร่วมได้ (ประไพศรี และ พงษ์ชนัน, 2551) ซึ่งแสดงในรูปสมการได้ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (12)$$

ทั้งนี้การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken มีการทดสอบสมมติฐานดังนี้

6.3.1 การทดสอบสมมติฐานของสัมประสิทธิ์

การทดสอบสมมติฐานของสัมประสิทธิ์จะเป็นการทดสอบของสัมประสิทธิ์ในสมการที่ (12) ดังนี้

การทดสอบสัมประสิทธิ์สำหรับผลกระทบเชิงเส้น

$$H_0 : \beta_i = 0$$

$$H_1 : \beta_i \neq 0 \text{ อย่างน้อย 1 ค่า}$$

การทดสอบสัมประสิทธิ์สำหรับผลกระทบกำลังสอง

$$H_0 : \beta_{ii} = 0$$

$$H_1 : \beta_{ii} \neq 0 \text{ อย่างน้อย 1 ค่า}$$

การทดสอบสัมประสิทธิ์สำหรับผลกระทบอิทธิพลร่วมกัน

$$H_0 : \beta_{ij} = 0$$

$$H_1 : \beta_{ij} \neq 0 \text{ อย่างน้อย 1 ค่า}$$

6.3.2 การทดสอบสมมติฐานของความสมบูรณ์ของสมการ

$$H_0 = \text{ไม่มีความไม่สมรูประหว่างข้อมูลการทดลองกับสมการ}$$

$$H_1 = \text{มีความไม่สมรูประหว่างข้อมูลการทดลองกับสมการ}$$

7. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงด้วยการออกแบบการทดลองเชิงสถิติ

Shieh *et al.*, (2003) ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจาก *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM-77) จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันถั่วเหลือง และเมทานอลด้วยวิธีออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ของ 5 ปัจจัยอันได้แก่ เวลาในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วนโดยโมลของ เมทานอล ต่อน้ำมันถั่วเหลือง และปริมาณน้ำ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมได้แก่เวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 6.3 ชั่วโมง อุณหภูมิ 36.5 °C ปริมาณเอนไซม์ 0.9 BAUN (Batch Acidolysis Units NOVO) อัตราส่วนโดยโมลของ เมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 3.4:1 ปริมาณน้ำที่เติม 5.8% โดยได้ร้อยละการเปลี่ยนเป็น 92.2

Hari *et al.*, (2001) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ไอโซเอมิลไอโซบิวทีเรตจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจาก *Rhizomucor miehei* จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของกรดไอโซบิวทีริก และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในนอร์มอลเฮกเซน ด้วยวิธีออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนองของ 4 ปัจจัยอันได้แก่ เวลาในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อซับสเตรต และปริมาณซับสเตรต โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิมีผลทำให้สามารถเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้สูงขึ้น แต่ทำให้ได้ปริมาณการเปลี่ยนรวมไม่เปลี่ยนแปลง โดยพบว่าผลได้มีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 40 °C โดยสภาวะที่เหมาะสมคือ อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อซับสเตรตคือ 19.6 กรัมต่อโมล ความเข้มข้นของซับสเตรตคือ 2.5 มิลลิโมลาร์ เวลาในการทำปฏิกิริยาคือ 18 ชั่วโมง และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาคือ 26.5 °C

Chiang *et al.*, (2003) ได้ศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของ ซีเอส-3-เฮกเซน-1-ออล และไตรอซีดิน ในนอร์มอลเฮกเซนด้วยวิธีออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนองของ 5 ปัจจัยอันได้แก่ เวลาในการทำปฏิกิริยา (8 – 24 ชั่วโมง) อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (25-65 °C) ปริมาณเอนไซม์ (0.02-0.1 BAUN) อัตราส่วนโดยโมลของซีเอส-3-เฮกเซน-1-ออล ต่อไตรอซีดิน (1:1 – 3:1) ปริมาณน้ำ (10-20%) ต่อร้อยละการเปลี่ยนโดยโมลของ 3-เฮกเซน-1 ออล อะซิเตด โดยพบว่าอุณหภูมิของปฏิกิริยาและอัตราส่วนโดยโมลของซับสเตรตเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปฏิกิริยาโดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิของปฏิกิริยา 19.2 ชั่วโมง อุณหภูมิของปฏิกิริยาคือ 48.5 °C ปริมาณเอนไซม์ 0.09 BANU

อัตราส่วนโดยโมลของชั้นเสตรทคือ 2.5:1 และปริมาณน้ำที่เติมคือ 7.85% โดยได้ปริมาณค่าการเปลี่ยนเป็น 82.1%

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุดิบ

- 1.1 น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน บริษัทธนกรจำกัด
- 1.2 เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผงจาก *Pseudomonas fluorescens*

Food grade Fluka, Switzerland

- 1.3 ไคโตซานชนิดแผ่น, food grade

2. สารเคมีในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

- 2.1 กรดอะซิติก: Analytical grade, Ajax Fine chem., Australia , purity > 99.9%
- 2.2 กลูตาอิลลิไซด์เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์: Analytical grade, Merck, Germany
- 2.3 โซเดียมไตรฟอสเฟต: **Analytical grade, Merck, Germany**
- 2.4 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (KH_2PO_4) : Analytical grade,

Ajax Fine chem., Australia

- 2.5 ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (K_2HPO_4) : Analytical grade,

Ajax Fine chem., Australia

3. อุปกรณ์ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

- 3.1 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 41
- 3.2 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter): model 420A, Orion,

4. สารเคมีที่ใช้ในการผลิตและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

- 4.1 เมทานอล: Analytical grade, Merck, Germany, purity > 99.9%
- 4.2 เฮกเซน: Analytical grade, J.T. Baker, USA, purity > 99.9%
- 4.3 N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA): Analytical grade,

Fluka, Switzerland, purity > 99.9%

- 4.4 นอร์มอล-เฮปเทน: Analytical grade, Labscan, Ireland, purity > 99.0%

4.5 ไตรแคปรีน: Analytical grade, Merck, Germany, purity > 99.9%

4.6 ไพรีดีน: Analytical grade, Analar, England, purity > 99.5%

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

5.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี: model Shimadzu 1200, Japan

5.2 คอลัมน์ DB-5HT, J&W, USA

5.3 เครื่องเขย่าแบบปรับอุณหภูมิได้ (Incubator shaker): model SK2-DO, CTL

5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): model PLC-012, GEMMY, Taiwan

5.5 เครื่องผสม (Vertex mixture): model KMC-1300V, Vision, Korea

5.6 ขวด vial ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

5.7 Syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร หัวเข็มขนาด 23G

5.8 อ่างควบคุมอุณหภูมิ : model SBD 50-Cold, Heto, Denmark

6. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

6.1 4-paranitrophenyl palmitate: Analytical grade, Merck, Germany, purity > 99.9%

6.2 2-โพรพานอล: Analytical grade, J.T. Baker, USA, purity > 99.8%

6.3 Triton X-100: General purpose grade

6.4 Gum Arabic: Analytical grade, Fluka, France

6.5 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต: Analytical grade, Merck, Germany

7. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

7.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) : model Anthelie Advanced, Secoman, France

7.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าสถิตยี่ห้อ Sartorius : model BL210S, Sartorius, Goettingen, Germany

วิธีการ

1. วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วนประกอบด้วย ส่วนแรกเป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในวิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนเม็ดโคโนซานด้วยวิธีห่อหุ้มโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA โดยทำการศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสกับสารละลายโคโนซานที่ 1:100 1:150 และ 1:200 กับร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตรของผงโคโนซานกับสารละลายกรดอะซิติกที่ 1 1.5 และ 2 ตามลำดับ ส่วนที่สองเป็นการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซล และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลในการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโคโนซานด้วยวิธีห่อหุ้มด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman และการออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนองด้วยวิธีของ Box-Behnken โดยการทดลองส่วนสุดท้ายเป็นการศึกษาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนโคโนซานด้วยวิธีห่อหุ้ม

1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์คือ 2,200 หน่วยต่อกรัม ถูกใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA โดยการเตรียมสารละลายโคโนซาน 3 ความเข้มข้นคือความเข้มข้นที่ 1 ทำละลายผงโคโนซาน 1 กรัมในสารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 1 โดยปริมาตรจำนวน 100 มล. ความเข้มข้นที่ 2 ทำละลายผงโคโนซาน 1.5 กรัมกับสารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 1.5 โดยปริมาตร 100 มล. และความเข้มข้นที่ 3 ทำละลายผงโคโนซาน 2 กรัมกับสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 2 โดยปริมาตร 100 มล. จากนั้นทำละลายเอนไซม์ไลเปสที่ปริมาณต่างๆในสารละลายกรดอะซิติก ร้อยละ 1 โดยปริมาตรแล้วทำละลายในสารละลายโคโนซานจากทั้ง 3 ความเข้มข้นข้างต้นจนมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสกับสารละลายโคโนซานเป็น 1:100 1:150 และ 1:200 ตามลำดับ ทั้งนี้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA แสดงได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

ร้อยละโดยปริมาตรของ สารละลายกรดอะซิติก	อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายไคโตซาน		
	1:100	1:150	1:200
1	y_{11}	y_{12}	y_{13}
1.5	y_{21}	y_{22}	y_{23}
2	y_{31}	y_{32}	y_{33}

หมายเหตุ ปริมาณผงไคโตซานในสารละลายไคโตซานที่ร้อยละ 1 โดยปริมาตรคือ 1 กรัม
 ปริมาณผงไคโตซานในสารละลายไคโตซานที่ร้อยละ 1.5 โดยปริมาตรคือ 1.5 กรัม
 และปริมาณผงไคโตซานในสารละลายไคโตซานที่ร้อยละ 2 โดยปริมาตร คือ 2 กรัม
 และ y_{ij} คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้

สารละลายเอนไซม์ไลเปสในไคโตซานถูกหดยด้วยเข็มฉีดยาขนาด 23G ลงในสารละลาย 0.136 โมลาร์ของสารละลายโซเดียมไทรพอลิฟอสเฟต (ซึ่งเตรียมได้โดยละลายโซเดียมไทรพอลิฟอสเฟต ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2) จากนั้นทำการแช่เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 75 นาที แล้วจึงล้างเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง 2 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 แล้วจึงนำไปศึกษาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงได้ต่อไป

1.2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอก

ทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดไคโตซานด้วยวิธีห่อหุ้ม

น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน เมทานอล เฮกเซน น้ำ และ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในปริมาณตามอัตราส่วนที่กำหนดในการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman ถูกผสมในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิซึ่งควบคุมอุณหภูมิในช่วง 30-50 °C อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงหยุดการเขย่าและกรองแยกสารละลายออกจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที สารละลายที่ได้จะแยกเป็นสองชั้น นำสารละลายไปอังไอน้ำด้วยอ่างน้ำควบคุม

อุณหภูมิที่ 65° ซ เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อระเหยเฮกเซน จากนั้นแยกสารละลายส่วนบนเก็บไว้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในขั้นตอนต่อไป

1.3 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโศโคซานด้วยวิธีห่อหุ้ม

น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน เมทานอล และเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในปริมาณตามอัตราส่วนที่กำหนดในการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ถูกผสมในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นถูกนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิซึ่งควบคุมอุณหภูมิในช่วง 30-50° ซ อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงหยุดการเขย่าและกรองแยกสารละลายออกจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที สารละลายที่ได้จะแยกเป็นสองชั้น จากนั้นแยกสารละลายส่วนบนเก็บไว้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในขั้นตอนต่อไป

1.4. การศึกษาหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

จลนพลศาสตร์ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการออกแบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ (Hari and Karanth, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการออกแบบขนาดของถังปฏิกรณ์ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นและปริมาณตามต้องการ

อัตราการเกิดปฏิกิริยาถูกศึกษาด้วยวิธีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น (Initial rate method) ซึ่งเป็นการหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาในสถานะที่เริ่มทำปฏิกิริยา ในการทดลองนี้ทำการแปรค่าความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน 5 7 10 และ 12 มิลลิโมลาร์ และเมทานอลแปรค่าที่ 20 37.5 50 62.5 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง 1 กรัม ซึ่งน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน เมทานอล และ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในปริมาณต่างๆถูกใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ จากนั้นทำการหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้

2. วิธีวิเคราะห์

2.1 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) เป็นค่าที่ใช้แสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในงานวิจัยนี้มี 2 ส่วนคือการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดถูกใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารพารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตด (p-NPP) ให้เป็นสารพารา-ไนโตรฟีนอล (p-NP) ซึ่งการหาค่ากิจกรรมทำได้โดยการเตรียมสารตั้งต้น A ซึ่งเป็นการทำละลายสารพารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตด (p-NPP) 30 มิลลิกรัม ใน 2-โพรพานอล 10 มิลลิลิตร และเตรียมสารตั้งต้น B ซึ่งเตรียมได้โดยทำละลาย 0.4 กรัมของ Triton-X-100 กับ 0.1 กรัมของ Gum Arabic ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย A และ B ด้วยอัตราส่วนโดยปริมาตรเป็น 1:9 ทั้งนี้หนึ่งหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสถูกนิยามดังนี้

หนึ่งหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส คือปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการผลิต 1 ไมโครโมลของ พารา-ไนโตรฟีนอล ต่อเวลาที่ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

2.1.1 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระกระทำตามวิธีของ Winkler and Struckmann (1979) ดังนี้

1. ชั่ง 0.05 กรัมของเอนไซม์ไลเปส เติม 10 มิลลิลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.01 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ปริมาตร 1.99 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร เติมสารตั้งต้น 2 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
3. ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.2 มิลลิลิตร เติม 2.9 มิลลิลิตรของตัวหยุดปฏิกิริยาแล้วหาการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หาความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟีนอล (p-NP) จากกราฟมาตรฐานที่แสดงในภาคผนวก ก1

2.1.2 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระกระทำตามวิธีของ Winkler and Struckmann (1979) ดังนี้

1. ชั่ง 0.01 กรัมของเอนไซม์ไลเปส เติม 2 มิลลิลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 เติมสารตั้งต้น 2 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
2. เติม 3 มิลลิลิตรของตัวหยุดปฏิกิริยา และ 13 มิลลิลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 นำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หาความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล (p-NP) จากกราฟมาตรฐานที่แสดงในภาคผนวก ก1

2.2 วิธีการหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในสารละลาย

ชั่งสารละลายที่จะวิเคราะห์ประมาณ 50 มิลลิกรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (จุดบันทึกค่าที่แน่นอนไว้) เติม 50 ไมโครลิตรของไตรแคปรีน (Tricaprin) ความเข้มข้น 8 มก./มล. ของไพรีดิน โดยสารละลายไตรแคปรีนทำหน้าที่เป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) จากนั้นเติม 100 ไมโครลิตรของสาร MSTFA ผสมสารอย่างรุนแรงแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นจึงเติมเฮปเทน 8 มิลลิตร แล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ซึ่งมีสภาวะดังนี้

คอลัมน์ DB-5HT ขนาดยาว 15 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร

แก๊สตัวพา ไนโตรเจน

ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีด 1 ไมโครลิตร

ตัวตรวจวัด Flame ionized detector (FID) มีอุณหภูมิ 380°ซ

การตั้งอุณหภูมิ

อุณหภูมิคงที่ 50°ซ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มด้วยอัตรา 15°ซ ต่อนาที จนมีอุณหภูมิที่ 180°ซ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 7°ซ ต่อนาที จนมีอุณหภูมิ 230°ซ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10°ซ ต่อนาที จนมีอุณหภูมิ 370°ซ ทั้งนี้เวลาในการปรากฏของสารต่างๆในโครมาโตแกรมแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เวลาในการปรากฏของสารต่างๆในโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

ตารางที่ 6 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ในไบโอดีเซลตัวอย่าง

สาร	เวลาปรากฏ (นาที)
กลีเซอรอล (glycerol)	3.8
เมทิลลิโนเลอเทท (Methyl linoleate)	9.9
1-โมโนไมริสทีล-เรค-กลีเซอรอล (1-monomyristyl-rac-glycerol)	12.3
เฮปตะเดคาโนอิก เมทิลเอสเทอร์ (Heptadecanoic methyl ester) (as methyl ester standard)	14.8
โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride)	16.0
ไตรแคปริน (Tricaprin) (as internal standard)	21.6
ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride)	24.5-25.8
ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) (as triolein)	30.1-32.7

ที่มา: AOCS, Official Method Ce 1-62

การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์พิจารณาได้จากเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก ค

ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สามารถหาได้จากสมการ

$$W_{FAME} = a_x \times \left(\frac{A_{FAME}}{A_{is}} \right) + b_x \quad (13)$$

เมื่อ

W_{FAME}	=	น้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ (มก.)
a_x	=	ความชันของกราฟมาตรฐาน
A_{FAME}	=	พื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์
A_{is}	=	พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน
b_x	=	จุดตัดแกนวายของกราฟมาตรฐาน

ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในสารละลายหาได้จากสมการ

$$\frac{\text{ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์}}{\text{เมทิลเอสเทอร์}} = \frac{\text{น้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ (มก.)} \times 100}{\text{น้ำหนักของสารตัวอย่าง (มก.)}} \quad (14)$$

ผลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วนประกอบด้วย ส่วนแรกเป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนเม็ดโคโคซานด้วยวิธีห่อหุ้มโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA ส่วนที่สองเป็นการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซล และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลในการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโคโคซาน ด้วยวิธีห่อหุ้มด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman และการออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนองด้วยวิธีของ Box-Behnken โดยการทดลองส่วนสุดท้ายเป็นการศึกษาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ เมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนโคโคซานด้วยวิธีห่อหุ้ม

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สถิติด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์นับเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตไบโอดีเซล เอนไซม์ที่ถูกตรึงที่มีคุณสมบัติที่ดี คือ ต้องมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง มีความเสถียร และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Balaraman and Soundar, 2004) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งถูกตรึงในสภาวะต่างๆดังแสดงในตารางที่ 7 โดยสภาวะดังกล่าวได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

ตารางที่ 7 สภาวะของการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

การ ทดลอง ที่	น้ำหนัก เอนไซม์ไลเปส (กรัม)	สารละลายไคโตซาน
1	1	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (1% w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 1% v/v กรดอะซิติก)
2	0.67	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (1% w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 1% v/v กรดอะซิติก)
3	0.5	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (1% w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 1% v/v กรดอะซิติก)
4	1	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (1.5 %w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 1.5 %v/v กรดอะซิติก)
5	0.67	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (1.5 %w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 1.5 %v/v กรดอะซิติก)
6	0.5	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (1.5 %w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 1.5 %v/v กรดอะซิติก)
7	1	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (2%w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 2%v/v กรดอะซิติก)
8	0.67	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (2%w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 2%v/v กรดอะซิติก)
9	0.5	100 กรัมของสารละลายไคโตซาน (2%w/v ไคโตซานที่ทำละลายใน 2%v/v กรดอะซิติก)

เอนไซม์ที่ถูกตรึงในสภาวะดังกล่าวจะถูกนำไปศึกษาหาค่ากิจกรรมของการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของ พารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตด (p-NPP) และ 2-โพพานอล โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางสถิติมินิแทบ รุ่นที่ 13 ถูกใช้ในการศึกษาซึ่งการออกแบบการทดลองทำการศึกษาค่าอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสกับสารละลายไคโตซานเป็น 1:100 1:150 และ 1:200 และการเตรียมสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นของสารละลายกรดอะซิติกที่ร้อยละ โดยปริมาตรคือ 1 1.5 และ 2 ซึ่งในแต่ละการทดลองมีการทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงตามการออกแบบการทดลองแบบ

Two-way ANOVA

ร้อยละโดย ปริมาตร สารละลาย กรดอะซิติก	อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายไคโตซาน								
	1:100			1:150			1:200		
1	230	260	280	374	382	402	355	363	371
1.5	368	379	392	383	394	410	379	394	404
2	323	341	362	334	358	386	298	322	348

หมายเหตุ น้ำหนักผงไคโตซานในสารละลายไคโตซานที่ร้อยละโดยปริมาตรของ

สารละลายกรดอะซิติกที่ร้อยละ 1 1.5 และ 2 คือ 1, 1.5 และ 2 กรัมตามลำดับ

ข้อมูลจากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าสภาวะในการเตรียมเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีอิทธิพลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ รุ่นที่ 13 แสดงได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจากผล
การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

Source	Degree of freedom	SS	MS	F	P
%v/v (Treatment A)	2	18,897	9448.5	11.38	0.003
w/w (Treatment B)	2	15,740	7870	9.48	0.006
Error (E)	22	18,264	830.2		
Total	26	52,901.2			

เมื่อ SS = Sum square Treatment

MS = Mean square

$$F_A = \frac{MSA}{MSE} = \frac{9448.5}{830.2} = 11.38$$

$$F_B = \frac{MSB}{MSE} = \frac{7870}{830.2} = 9.48$$

P = โอกาสที่น้อยที่สุดที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักได้ในการทดสอบ
สมมติฐาน เมื่อสมมติฐานหลักนั้นถูกต้อง

จากค่าพารามิเตอร์ทางสถิติในตารางที่ 9 แสดงให้เห็นอิทธิพลของร้อยละโดยปริมาตรของสารละลายกรดอะซิติกที่ใช้ในการเตรียมสารละลายไคโตซาน (%v/v, Treatment A) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญทางสถิติต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ซึ่งแสดงได้ด้วยค่าสถิติ P ที่มีค่าเป็น 0.003 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีโอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อสมมติฐานหลักนั้นถูกต้องเพียง 0.003 และยังแสดงได้ว่าค่าสถิติ P ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.01 (ระดับนัยสำคัญ 99%) จึงสามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักได้ นั่นคือร้อยละโดยปริมาตรของสารละลายกรดอะซิติกที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย

ไคโตซาน (Treatment A) มีอิทธิพลต่อค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง จึงทำให้ไม่สามารถตัดปัจจัยนี้ออกไปได้

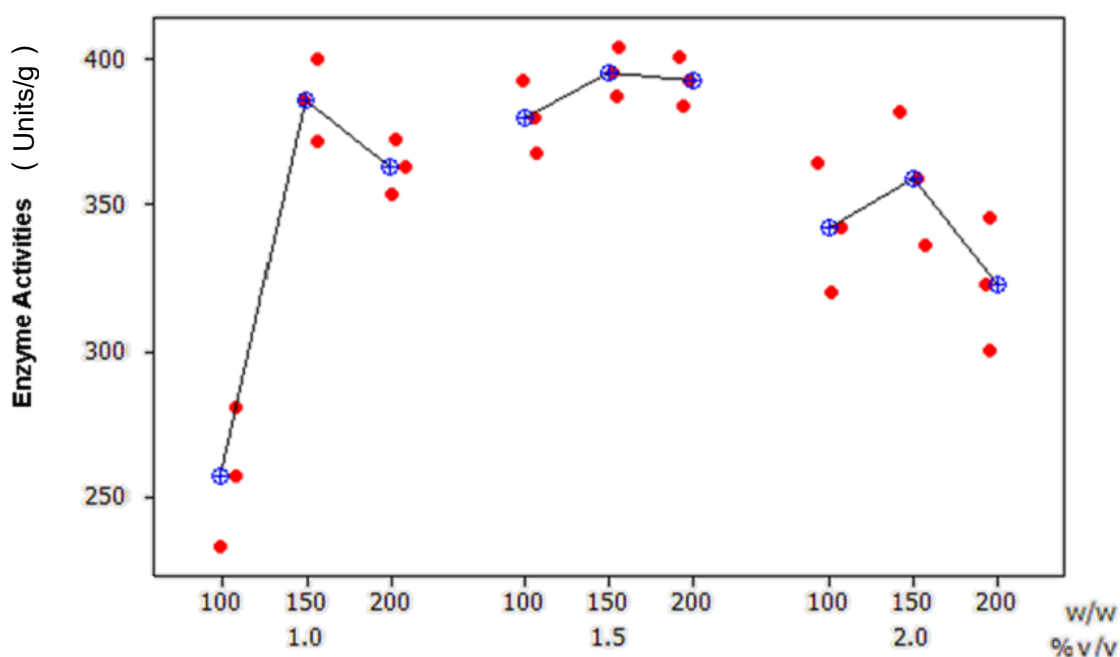
จากค่าสถิติ P ของอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายไคโตซาน (w/w, Treatment B) พบว่ามีค่าเป็น 0.006 แสดงให้เห็นว่ามีโอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อสมมติฐานหลักนั้นถูกต้องเพียง 0.006 และยังแสดงได้ว่าค่าสถิติ P ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.01 (ระดับนัยสำคัญ 99%) จึงสามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักได้ นั่นคืออัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายไคโตซานมีอิทธิพลต่อค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง จึงทำให้ไม่สามารถตัดปัจจัยนี้ออกไปได้

ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่สภาวะในการทดลองตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA จากกราฟแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* คือ ร้อยละโดยปริมาตรของสารละลายกรดอะซิติกที่ใช้ในการเตรียมสารละลายไคโตซานเป็น 1.5 และ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายไคโตซานเป็น 1:150 โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็น 396 หน่วยต่อกรัมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โดยที่สภาวะนี้ยังให้ลักษณะของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีความเสถียรมากที่สุด

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสภาวะที่ร้อยละโดยปริมาตรของสารละลายกรดอะซิติกที่ใช้ในการเตรียมสารละลายไคโตซานเป็น 1 และ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายไคโตซานเป็น 1:100 ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็น 256.7 โดยลักษณะของเม็ดเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงพบว่ามีลักษณะนิ่มและเปื่อยยุ่ยแตกง่ายไม่เป็นเม็ด อีกทั้งในขณะแยกเอาเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงออกจากสารละลายไตรฟอสเฟตตลอดจนการล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8 จำนวน 2 ครั้ง อาจมีการสูญเสียเอนไซม์ไลเปสไประหว่างกระบวนการดังกล่าวจึงทำให้ที่สภาวะดังกล่าวได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าต่ำกว่าสภาวะอื่นๆ

ในขณะที่ย่อยละลายโดยปริมาตรของสารละลายกรดอะซิติกที่ถูกใช้ในการเตรียมสารละลายไคโตซานเท่ากับ 2 จะพบว่าไคโตซานที่ใช้มีปริมาณมากเกินไปจนอาจทำให้โครงข่ายในการห่อหุ้มเอนไซม์มีความแน่นมากกว่าที่ร้อยละโดยปริมาตรเป็น 1.5 ซึ่งในทุกความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน เอนไซม์ไลเปสไม่มีการหลุดออกไปกับสารละลายระหว่างกระบวนการเตรียมเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

อย่างไรก็ตาม เอนไซม์อาจเสื่อมสภาพเมื่อถูกละลายในสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ โดยปริมาตรเป็น 1.5 จึงทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลง



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในสภาวะ

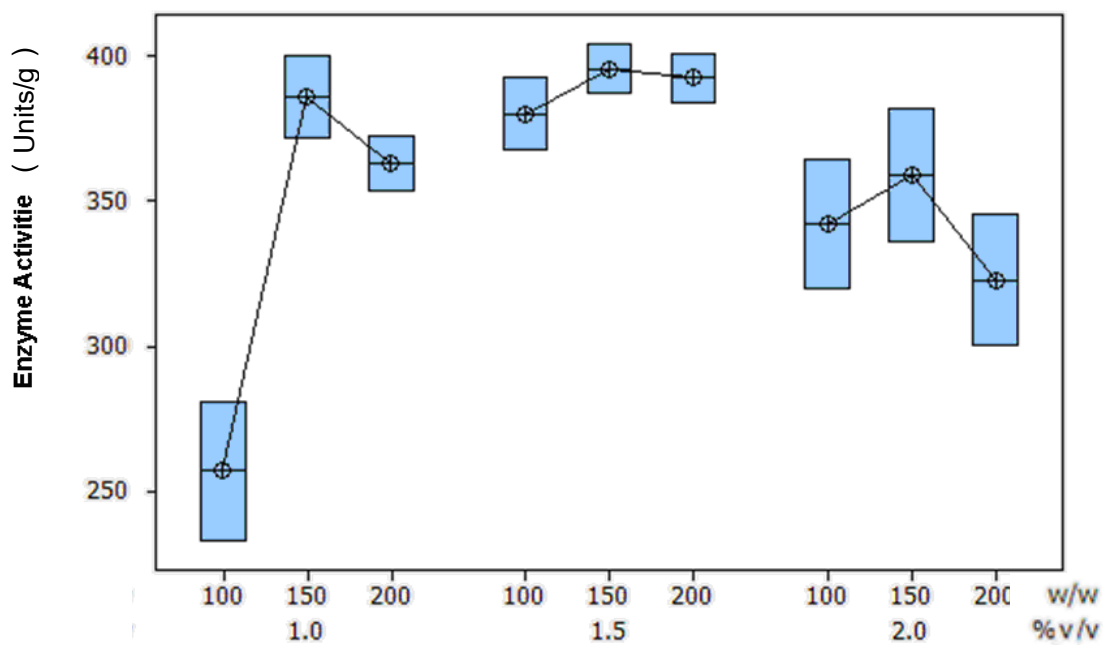
การตรึงตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

หมายเหตุ ● คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ได้จากการทดลอง

⊕ คือค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ได้จากโปรแกรม

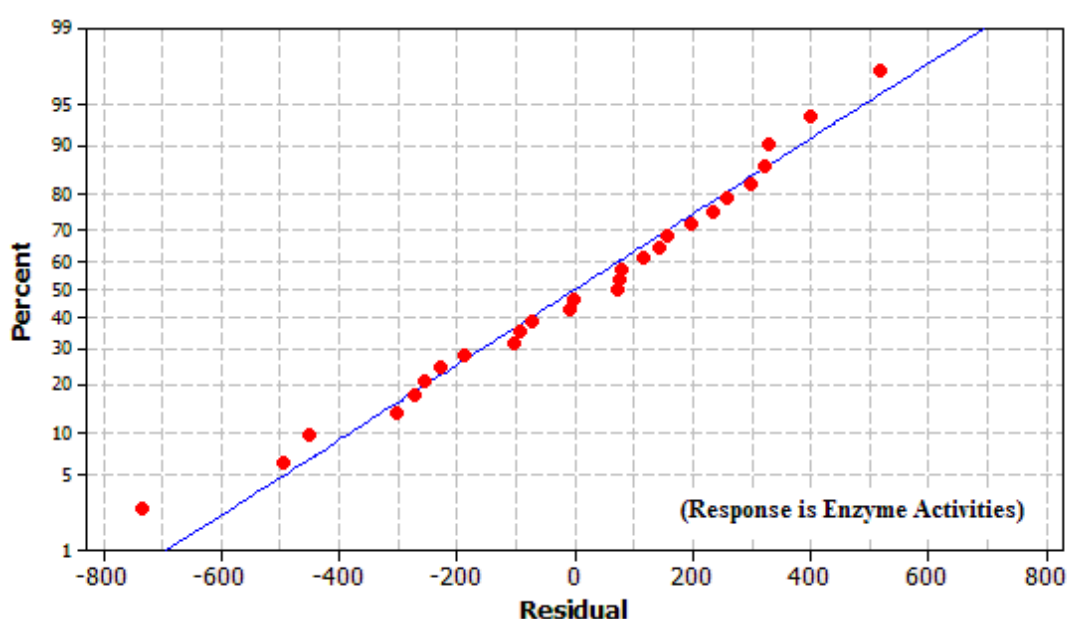
สถิติมินิแทบ รุ่นที่ 13

ภาพที่ 15 แสดงค่ากลาง (Median) ของข้อมูลในแต่ละสภาวะ ซึ่งแต่ละกล่องแสดงข้อมูลการทดลองโดยเส้นตรงในกล่องแสดงค่ากลางของข้อมูล ในขณะที่ขอบของกล่องแสดงข้อมูลที่มากที่สุดและต่ำที่สุดของข้อมูล จะเห็นได้ว่าข้อมูลค่ากิจกรรมที่ได้จากวิธีการตรึงเอนไซม์ที่เตรียมได้จากสารละลายไคโตซานที่สภาวะ 1.5%v/v และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงกับสารละลายไคโตซานเป็น 1:150 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 396 หน่วยต่อกรัมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง นอกจากนี้ยังพบว่าข้อมูลที่สภาวะ 1.5%v/v ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดและต่ำสุดใกล้เคียงกันมากที่สุดแสดงให้เห็นว่าการตรึงเอนไซม์ที่สภาวะดังกล่าวจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ใกล้เคียงกันมากกว่าสภาวะอื่นๆ ซึ่งอาจเกิดจากในสภาวะดังกล่าวเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีเสถียรภาพสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในสภาวะอื่นๆ



ภาพที่ 15 ค่ากลาง ค่ามากที่สุดและค่าน้อยที่สุดของข้อมูลค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

ภาพที่ 16 แสดงกราฟการกระจายของข้อมูลซึ่งเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของการจัดทำข้อมูลทางสถิติซึ่งข้อมูลที่นำมาใช้วิเคราะห์จะต้องมีการกระจายของข้อมูลเป็นแบบปกติ โดยจุดที่แสดงในภาพที่ 16 อยู่ใกล้เคียงกับเส้นตรงซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกระจายของข้อมูลในการทดลองนี้เป็นการกระจายแบบปกติ



ภาพที่ 16 การกระจายของข้อมูลแบบปกติของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส
ที่ถูกตรึงตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

2. การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอก ทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโกลโดซาน

ปัจจัยในการผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย อุณหภูมิของปฏิกิริยา (30–50° ซ) อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (1.5:1 – 6:1) ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำ (0 - 6) ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (10-50) และร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายรวม (0-10) ต่อร้อยละโดยน้ำหนักของ

เมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ การศึกษาหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซลนี้ใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

ผลการทดลองที่ได้ในแต่ละสภาวะในการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman แสดงได้ดังตารางที่ 10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติอาศัยโปรแกรมทางสถิติมินิแทบ รุ่นที่ 13 และในตารางที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman โดยการทดสอบทางสถิติตามวิธีการออกแบบการทดลองดังกล่าวเป็นการทดสอบสมมติฐานที่ปัจจัยต่างๆมีผลต่อค่าเฉลี่ยของร้อยละ โดยนำหน้าของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ดังนี้

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$$H_1 : \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ของ } \mu_i \text{ และ } \mu_j$$

เมื่อ H_0 คือสมมติฐานหลัก

H_1 คือสมมติฐานทางเลือก หรือ สมมติฐานวิจัย

μ_i, μ_j คือค่าเฉลี่ยร้อยละโดยนำหน้าของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ที่สภาวะของการทดลองที่ i และ j ตามลำดับ

ตารางที่ 10 สภาวะในการทดลองตามการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman และร้อยละ
โดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้

No.	ξ_1	ξ_2	ξ_3	ξ_4	ξ_5	FAME
1	50	6.0 : 1	50	0	0	12.38
2	50	1.5 : 1	50	10	0	1.20
3	30	1.5 : 1	10	0	0	10.16
4	30	6.0 : 1	50	10	6	25.51
5	50	6.0 : 1	10	0	6	1.10
6	30	1.5 : 1	50	0	6	12.30
7	30	6.0 : 1	10	10	0	13.22
8	50	1.5 : 1	10	10	6	2.50

เมื่อ	ξ_1	=	อุณหภูมิของปฏิกิริยา (°C)
	ξ_2	=	อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน
	ξ_3	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง
	ξ_4	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายรวม
	ξ_5	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำ
	FAME	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์

2.1 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์และการวิเคราะห์ทางสถิติของการออกแบบการ

ทดลองแบบ Plankett-Burman

ทั้งนี้จะได้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการอธิบายอิทธิพลของแต่ละปัจจัยจากการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman แบบรหัส (Code equation) ซึ่งต้องแทนค่าปัจจัยต่างๆเป็นรหัสโดย -1 ที่ค่าต่ำสุด และ +1 ที่ค่าสูงสุด ซึ่งจะได้สมการเป็นดังนี้

$$\begin{aligned}
 FAME = & 9.147 + 3.905 MO - 4.864 T + 1.198 W + 1.450 CS \\
 & + 3.683 IM - 0.944 MO \times W + 4.418 MO \times IM
 \end{aligned}
 \quad (15)$$

เมื่อ	$FAME$	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์
	MO	=	อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน
	T	=	อุณหภูมิ
	W	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำ
	CS	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายรวม
	IM	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปัจจัยหลักจากการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

Source	df	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects (M)	5	448.06	448.06	89.61	3.88	0.217
Residual Error (R)	2	46.17	46.17	23.08		
Total	7	494.23				

เมื่อ Seq SS = Sequential sum of square

Adj SS = Adjusted sum of square

df = Degree of freedom

Adj MS = Adjusted mean square

$$F_A = \frac{Adj\ MS(M)}{Adj\ MS(R)} = \frac{89.61}{23.08} = 3.88$$

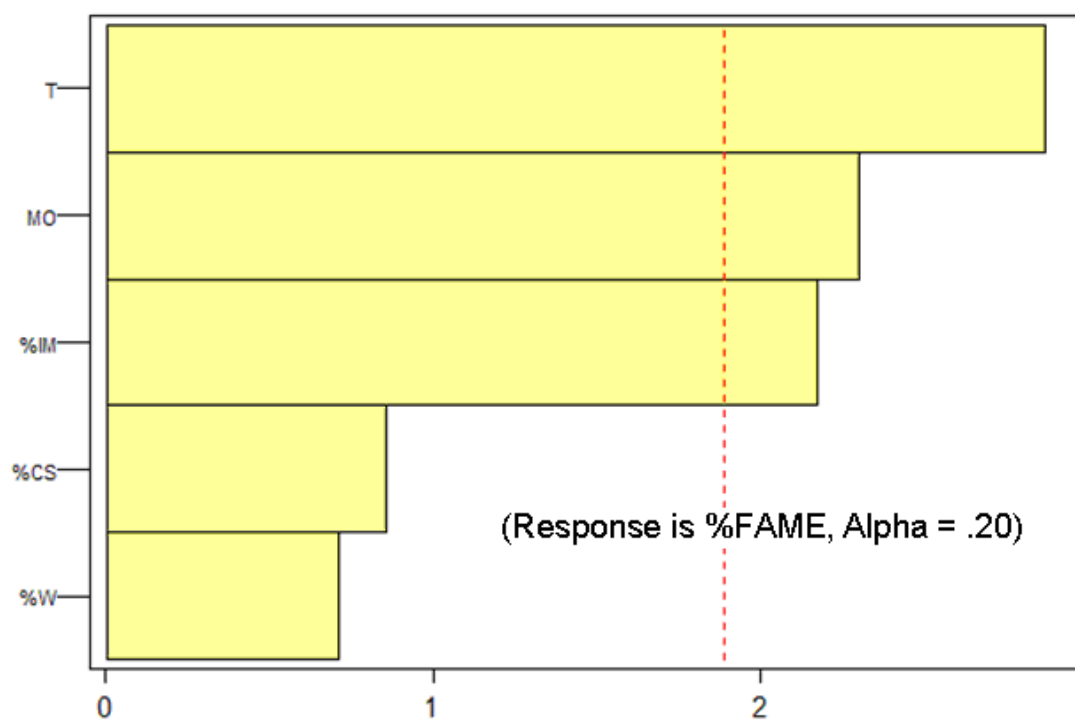
P = โอกาสที่น้อยที่สุดที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักได้ในการทดสอบสมมติฐาน เมื่อสมมติฐานหลักนั้นถูกต้อง

จากตารางที่ 11 ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการออกแบบการทดลอง พบว่าค่าสถิติ P ของการทดลองมีค่าเป็น 0.217 ซึ่งมีความมากกว่า 0.05 ซึ่งมีความหมายว่าโอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อสมมติฐานหลักนั้นถูกต้องสูงถึง 0.217 ซึ่งแสดงว่าปัจจัยที่ใช้ศึกษาทั้ง 5 ปัจจัยไม่ทำให้ค่าเฉลี่ยของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 75 ($P = 0.217 < 0.25$) นั่นคือปัจจัยทั้ง 5 ที่ทำการศึกษาอาจไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ แต่เมื่อพิจารณาจากผลทางสถิติที่แสดงในตารางที่ 12 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าร้อยละของปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ แต่จำนวนปัจจัยที่ศึกษาอาจมีจำนวนมากจนเกินไป และ แต่ละปัจจัยต่างมีอิทธิพลต่อผลการทดลองจึงทำให้เกิดอิทธิพลที่ทับซ้อนกันของปัจจัยต่างๆได้

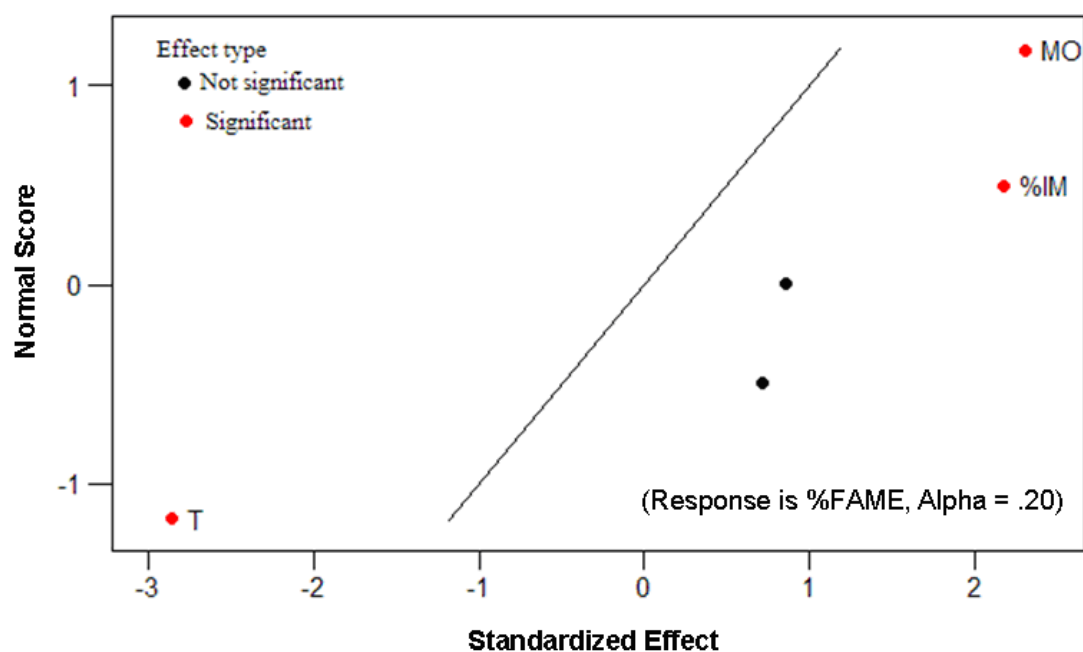
แต่อย่างไรก็ดี เมื่อพิจารณาตารางที่ 12 ร่วมกับกราฟของพารโดในภาพที่ 17 และ กราฟการกระจายแบบปกติของปัจจัยต่างๆในภาพที่ 18 จะพบว่าในสมการ (21) ค่าคงที่ของสมการมีอิทธิพลสูงสุด ($P = 0.033$) และปัจจัยอุณหภูมิของปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลลำดับที่สอง สาม และสี่ตามลำดับ โดยเป็นปัจจัยที่มีค่าสถิติ P เป็น 0.103 0.148 และ 0.162 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทั้งสามให้โอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลักเมื่อสมมติฐานหลักนั้นถูกต้องเป็น 0.2 ($P < 0.2$) นั่นคือปัจจัยทั้งสามมีอิทธิพลต่อค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 80

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปัจจัยหลัก และปัจจัยร่วมจากสมการเชิงเส้นที่ได้จากการ
ออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

Term	Effect	Coefficient	SE	T	P
coefficient					
Constant		9.147	1.699	5.38	0.033
MeOH:Oil	7.811	3.905	1.699	2.30	0.148
Temperature	-9.727	-4.864	1.699	-2.86	0.103
%wt of water	2.396	1.198	1.699	0.71	0.554
%wt of co-solvent	2.900	1.450	1.699	0.85	0.483
%wt of immobilized enzyme	7.366	3.683	1.699	2.17	0.162



ภาพที่ 17 กราฟของพารามิเตอร์ของการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman



ภาพที่ 18 การกระจายแบบปกติของอิทธิพลปัจจัยต่างๆ ในการออกแบบการทดลองแบบ Plackett Burman

ในขณะที่ปัจจัยอีกสองปัจจัยอันได้แก่ ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายร่วม และร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำ พบว่ามีอิทธิพลต่อร้อยละของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้น้อยมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัญหาของการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละโดยน้ำหนักที่น้อยนั้นอาจไม่เกิดมาจากการไม่ผสมกันระหว่างเมทานอลกับน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน แต่อาจเกิดจากการแพร่เข้าไปในแคปซูลของเม็ดโคโคซานมากกว่า

ด้วยเหตุดังกล่าวในการทดลองขั้นถัดไปจึงพิจารณาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์เฉพาะปัจจัยที่มีความสำคัญจำนวน 3 ปัจจัยคือ อุณหภูมิของปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายร่วมในการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

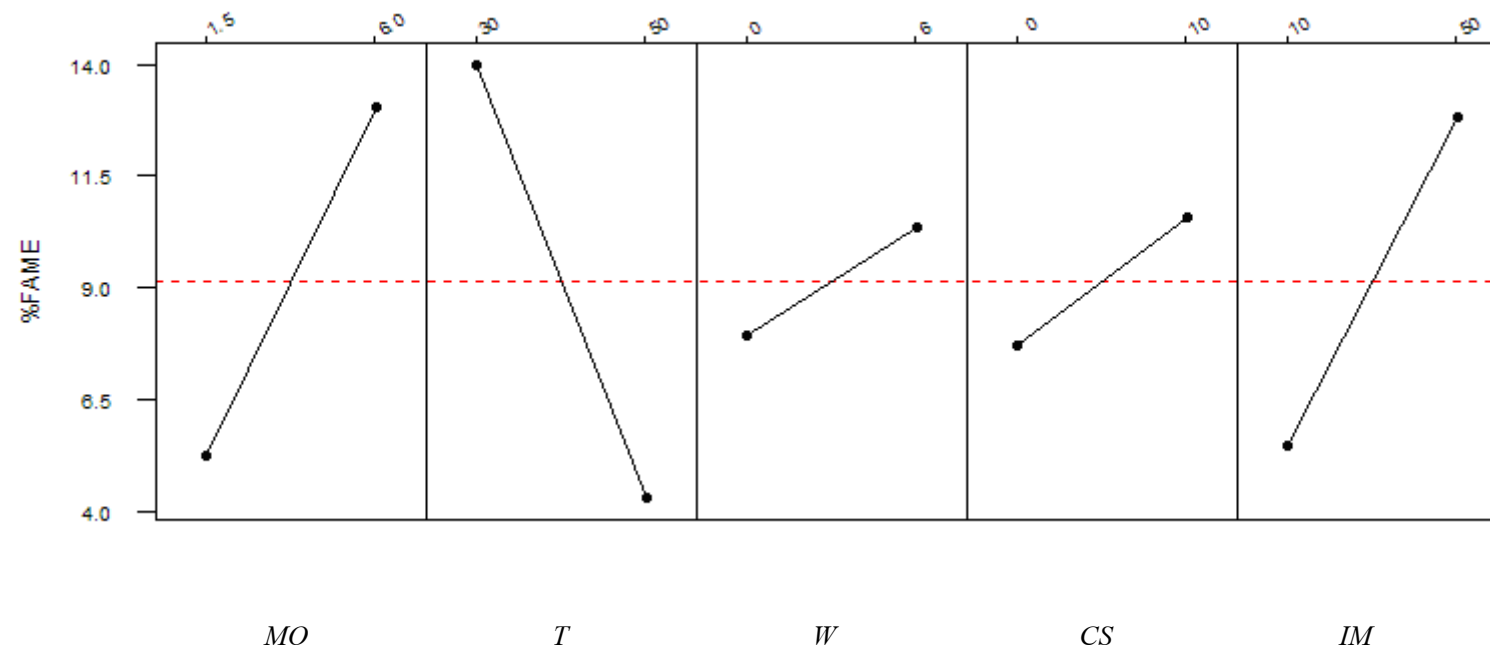
2.2 อิทธิพลของปัจจัยจากการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

กราฟอิทธิพลของปัจจัยหลักในภาพที่ 19 แสดงอิทธิพลของปัจจัยต่างๆต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โปรแกรมทางสถิติมินิแทบ รุ่นที่ 13 ถูกใช้ในการศึกษาปัจจัยหลักกับค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ โดยเส้นประในภาพที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่สภาวะกึ่งกลางของการทดลอง โดยที่สภาวะดังกล่าวจะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ร้อยละ 9 ทั้งนี้เมื่อพิจารณากราฟอิทธิพลของปัจจัยหลักในภาพที่ 19 ความชันของกราฟจะแสดงถึงอิทธิพลของปัจจัย โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลมากจะให้ค่าความชันในกราฟมากตามไปด้วย นอกจากนี้ค่าที่เป็นบวกหรือลบของความชันยังสามารถแสดงให้เห็นถึงสภาวะที่ให้ผลได้ที่เหมาะสมอีกด้วย ซึ่งจากภาพที่ 19 อุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดเนื่องจากเป็นกราฟที่มีความชันมากที่สุด และด้วยเหตุที่ความชันของปัจจัยอุณหภูมิของปฏิกิริยามีค่าเป็นลบแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิในการทดลองในระดับต่ำ (30 °C) จะให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์สูงสุดในขณะที่ค่าร้อยละโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมา โดยที่ระดับสูงคืออัตราส่วนโดยโมลเป็น 6:1 จะให้ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์สูงสุด และปัจจัยที่มีอิทธิพลในลำดับสุดท้ายคือปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โดยพบว่าปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ 50% จะให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์สูงสุด ในขณะที่ปัจจัยของปริมาณน้ำ และตัวทำละลายร่วมถ้ามีในปฏิกิริยาจะทำให้ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงขึ้นแต่ก็จะเพิ่มขึ้นในระดับที่ไม่มากนักและอาจต้องใช้ต้นทุนที่สูงขึ้นในการใช้ตัวทำละลาย น้ำ หรือต้นทุนในการกำจัดสารดังกล่าวออกจากผลิตภัณฑ์

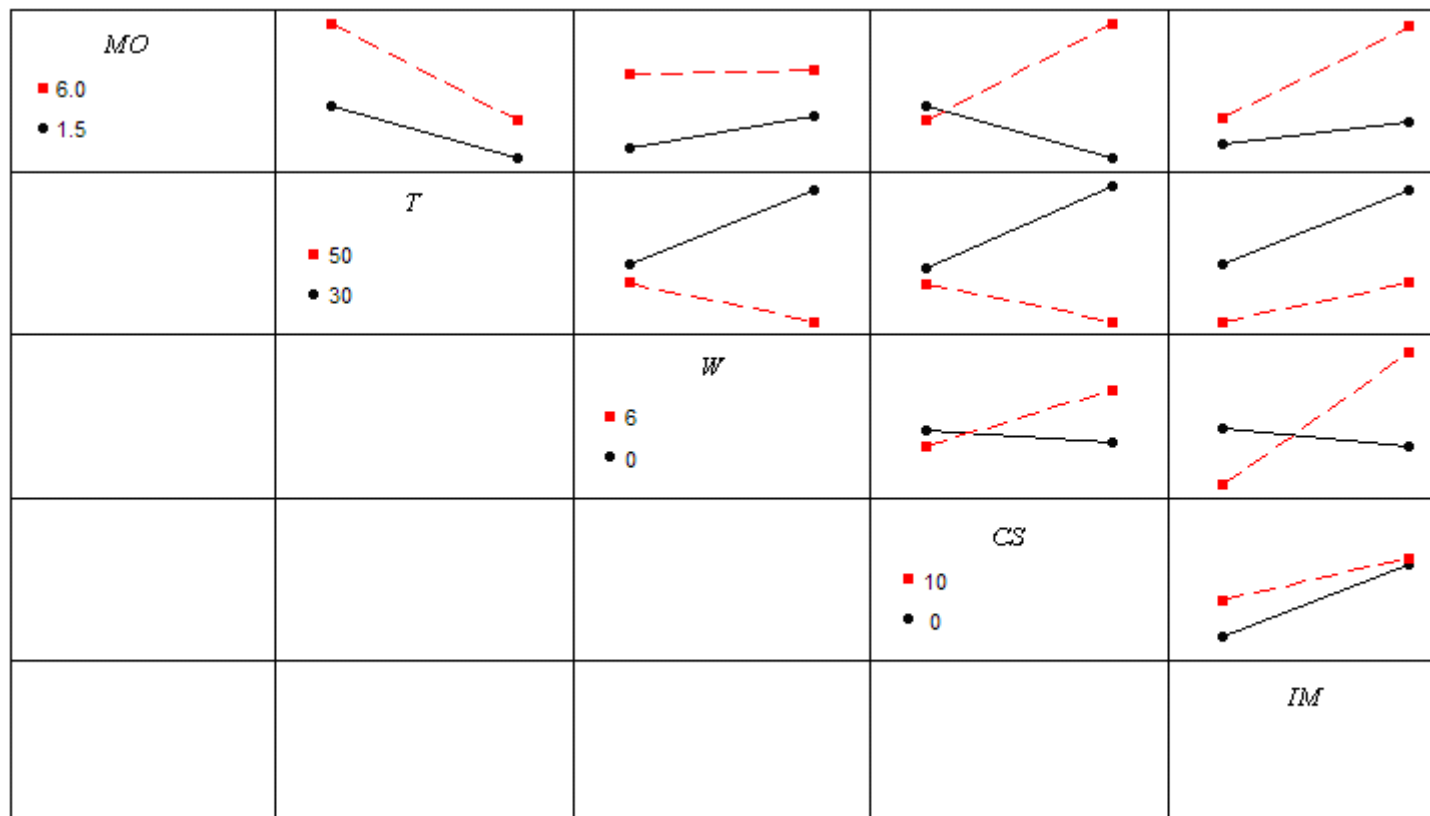
ทั้งนี้ นอกจากจะพิจารณาอิทธิพลจากความชันของกราฟอิทธิพลหลักอีกประการหนึ่งที่สามารถพิจารณาควบคู่กันไปได้ จะได้แก่ค่าสถิติ T ในตารางที่ 14 ซึ่งค่าสถิติ T ของปัจจัยอุณหภูมิ อัตราส่วนโดยโมลเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็น -2.86 2.30 และ 2.17 ตามลำดับ ซึ่งค่าสถิติ T ใช้ระบุค่าอิทธิพลของแต่ละปัจจัย โดยอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลสูงสุดและมีค่าสถิติ T เป็นค่าลบแสดงให้เห็นว่าที่สภาวะระดับต่ำของอุณหภูมิให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์สูงสุด ในขณะที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมาโดยให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์สูงสุดที่ระดับสูงในปัจจัยดังกล่าว (ประไพศรี และ พงศ์ชนัน, 2551)

ในขณะที่กราฟอิทธิพลของปัจจัยรวมในภาพที่ 20 ซึ่งแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยต่างๆ ทั้งนี้เส้นกราฟของแต่ละปัจจัยที่ตัดกันแสดงให้เห็นถึงการมีอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยทั้งสอง กล่าวคือการเปลี่ยนแปลงระดับของปัจจัยที่ 1 ขึ้นอยู่กับระดับของปัจจัยที่ 2 ในขณะที่เส้นกราฟของปัจจัยที่ขนานกันแสดงให้เห็นถึงการไม่มีอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยทั้งสอง กล่าวคือการเปลี่ยนแปลงระดับของปัจจัยที่ 1 ไม่ขึ้นอยู่กับระดับของปัจจัยที่ 2

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าคู่ระหว่างปัจจัยอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายรวม คู่ระหว่างปัจจัยร้อยละน้ำหนักของน้ำและร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายรวม และคู่ระหว่างปัจจัยร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำและร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีอิทธิพลร่วมต่อกันเนื่องจากกราฟที่ได้มีลักษณะตัดกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของปัจจัยหนึ่งขึ้นอยู่กับระดับของอีกปัจจัยหนึ่ง



ภาพที่ 19 อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ Plackett-Burman



ภาพที่ 20 อิทธิพลร่วมของปัจจัยในการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดไคโตซาน

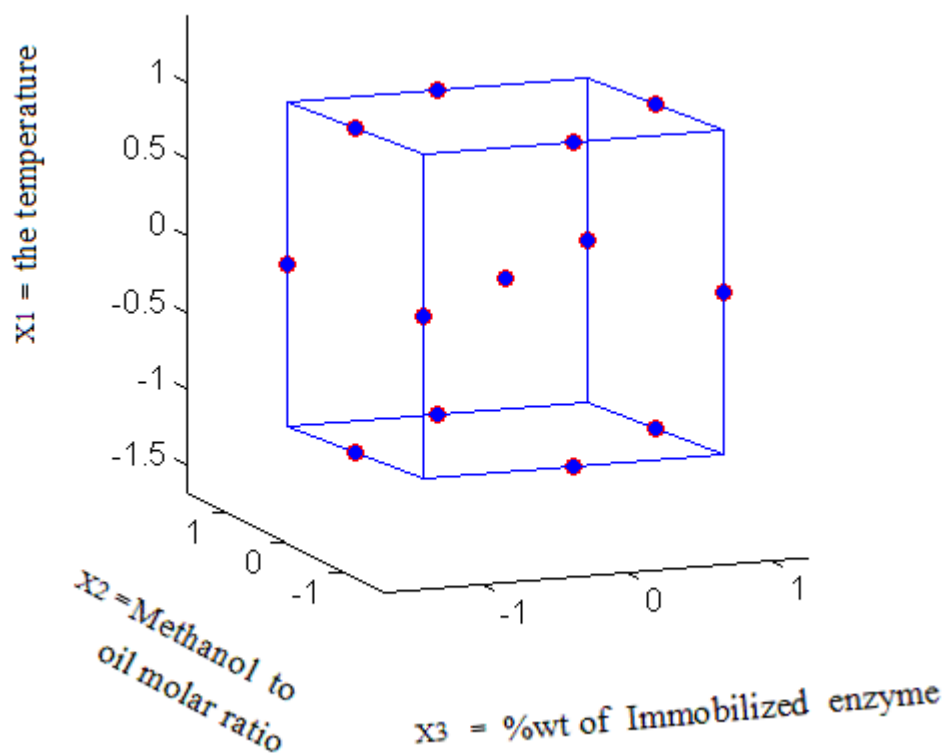
การออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนองของ Box-Behnken ถูกใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ทั้งนี้ปัจจัยที่ถูกพิจารณาว่ามีผลต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์คือ อุณหภูมิของปฏิกิริยา ($30-50^{\circ}\text{C}$) อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ($1.5:1 - 6:1$) และร้อยละของเอนไซม์ไลเปส ($10-50$) ทั้งนี้การออกแบบและวิเคราะห์ผลทางสถิติจะใช้โปรแกรมสถิติมินิแทบ รุ่นที่ 13 การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken สำหรับ 3 ปัจจัย อาศัยการทำการทดลองทั้งสิ้นจำนวน 15 การทดลอง โดยเป็นการทดลองที่ตำแหน่งกึ่งกลางต้องทำซ้ำจำนวน 3 การทดลอง โดยผลการทดลองที่ตำแหน่งกึ่งกลางจะถูกนำไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสมบูรณ์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กับผลการทดลอง โดยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้สามารถแสดงได้ดังสมการ (Montgomery, 1997)

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (16)$$

เนื่องด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้อยู่ในรูปของสมการกำลังสอง ซึ่งสามารถแสดงพื้นผิวได้ในรูปแบบโค้งซึ่งจะทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมเกิดขึ้น ทั้งนี้สภาวะที่เหมาะสมสามารถหาได้จากวิธีการทางคณิตศาสตร์

3.1 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

จากผลการทดลองในการหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ($30-50^{\circ}\text{C}$) อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ($1.5:1-6:1$) และร้อยละของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ($10-50$) ในขั้นตอนนี้จะทำการทดลองเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยต่างๆ ดังกล่าว โดยการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken สำหรับสามปัจจัยแสดงได้ในภาพที่ 21 โดยจุดที่ปรากฏในรูปแสดงถึงตำแหน่งของการทดลองซึ่งถูกกำหนดโดยรหัสซึ่งกำหนดที่สภาวะต่ำ กลาง และสูงของปัจจัยเป็น -1 0 และ $+1$ ตามลำดับ



ภาพที่ 21 ตำแหน่งของการทดลองแบบ Box-Behnken สำหรับ 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และร้อยละของน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดลองตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ซึ่งให้ผลได้คือค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (FAME) โดยปริมาณของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันคือ 5 มิลลิโมล และแปรค่าปริมาณของเมทานอลและเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ตารางที่ 13 สภาวะในการทดลองตามการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

No.	ξ_1	ξ_2	ξ_3	y
1	30	6.0 : 1	30	27.07
2	30	1.5 : 1	30	13.74
3	50	1.5 : 1	30	6.22
4	40	1.5 : 1	10	6.89
5	40	6.0 : 1	50	19.86
6	50	3.75 : 1	10	3.75
7	50	3.75 : 1	50	8.83
8	50	6.0 : 1	30	10.70
9	40	3.75 : 1	30	9.74
10	30	3.75 : 1	50	20.89
11	30	3.75 : 1	10	17.18
12	40	3.75 : 1	30	10.80
13	40	1.5 : 1	50	11.72
14	40	3.75 : 1	30	10.44
15	40	6.0 : 1	10	6.44

เมื่อ	ξ_1	=	อุณหภูมิของปฏิกิริยา (°ซ)
	ξ_2	=	อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน
	ξ_3	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง
	y	=	ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้ (FAME)

ตารางที่ 14 แสดงผลสถิติที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ซึ่งได้จากโปรแกรมสถิติมินิแทป รุ่นที่ 13 โดยตารางที่ 14 ประกอบด้วยตัวแปรต่างๆทางสถิติซึ่งประกอบด้วยค่าผิดพลาดมาตรฐานของตัวแปร ค่าสถิติ T และค่าสถิติ P ซึ่งค่าต่างๆดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายค่าร้อยละ โดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์กับปัจจัยต่างๆ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยตัวแปรทางสถิติที่ใช้อธิบายความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์กับข้อมูลที่ได้จากการทดลองอันได้แก่ค่าผิดพลาดมาตรฐานของแบบจำลอง ค่าสหสัมพันธ์ และค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้

ตารางที่ 14 ค่าทางสถิติที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

Term	Symbol	Coefficient	SE	T	P
coefficient					
Constant		64.5719	21.6516	2.982	0.031
Temperature	T	-2.5342	0.9659	-2.624	0.047
Methanol to oil molar ratio	MO	1.9933	2.7531	0.724	0.502
%wt of immobilized enzyme	IM	-1.0073	0.3007	-0.024	0.982
Temperature*Temperature	T^2	0.0279	0.0116	2.404	0.061
Methanol to oil *Methanol to oil	MO^2	0.2593	0.2295	1.130	0.310
%wt of immobilized enzyme * %wt of immobilized enzyme	IM^2	-0.0011	0.0029	-0.393	0.710
Temperature* Methanol to oil molar ratio	$T*MO$	-0.0983	0.0496	-1.982	0.104
Temperature * %wt of immobilized enzyme	$T*IM$	0.0017	0.0056	0.307	0.771
Methanol to oil * %wt of immobilized enzyme	$MO*IM$	0.0467	0.0248	1.883	0.118

S = 2.233 $R^2 = 95.7\%$ R^2 (adjusted) = 87.8%

เมื่อ

SE coefficient	=	ค่าผิดพลาดมาตรฐานของแต่ละตัวแปร
T	=	ค่าสถิติ T
P	=	ค่าสถิติ P
S	=	ค่าผิดพลาดมาตรฐานของแบบจำลอง
R^2	=	ค่าสหสัมพันธ์ของแบบจำลอง
R^2 (adjusted)	=	ค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้ของแบบจำลอง

ทั้งนี้จะได้สมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ระหว่างร้อยละโดยโมลของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์กับปัจจัยต่างๆตามสมการกำลังสองเป็นดังสมการ

$$\begin{aligned} FAME = & 64.5719 + 1.9933 MO - 2.5342 T \\ & - 0.0073 IM + 0.2593 MO^2 + 0.0279 T^2 \\ & - 0.0011 IM^2 - 0.0983 T \times MO \\ & + 0.0017 T \times IM + 0.0467 MO \times IM \end{aligned} \quad (17)$$

ค่าสัมประสิทธิ์ของแบบจำลองหาได้จากวิธีผลต่างกำลังสองน้อยที่สุด โดยค่าทางสถิติของแต่ละปัจจัยได้แก่ ค่าผิดพลาดมาตรฐานและค่าสถิติ P ดังแสดงในตารางที่ 14 ทั้งนี้ค่าผิดพลาดมาตรฐานแสดงให้เห็นถึงความเบี่ยงเบนไปจากข้อมูลจากการทดลองกับผลที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ในขณะที่ค่าสถิติ P เป็นค่าที่ใช้พิจารณาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ โดยที่ค่าสถิติ P ของค่าคงที่และอนุกรมมีค่าเชื่อมั่นที่ระดับนัยสำคัญ 95% ($P < 0.05$) ด้วยเหตุนี้ปัจจัยดังกล่าวจึงไม่สามารถกำจัดทิ้งออกจากแบบจำลองได้

สำหรับค่าสหสัมพันธ์ของแบบจำลอง (R^2) และค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้ ($R^2\text{-adj}$) เป็นค่าที่แสดงอัตราส่วนระหว่างค่าตอบสนองที่สามารถอธิบายได้โดยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งจากการทดลองนี้จะได้ค่าสหสัมพันธ์ (R^2) เป็น 95.7% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองสามารถอธิบายค่าตอบสนอง คือร้อยละโดยโมลของเมทิลเอสเทอร์ (FAME) เป็น 95.7% ของผลการทดลองทั้งหมด ในขณะที่ค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้ ($R^2\text{-adj}$) จะมีค่าเป็น 87.8% ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นค่าที่ใช้เปรียบเทียบกับค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์รูปแบบอื่นๆเนื่องจากค่าสหสัมพันธ์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงเมื่อเพิ่มจำนวนตัวแปรหรือเพิ่มจำนวนเทอมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ประไพศรี และ พงศ์ชนัน, 2551) ด้วยเหตุนี้จึงต้องพิจารณาค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้ซึ่งจะพิจารณาค่าองศาความเป็นอิสระที่ขึ้นกับจำนวนการทดลองและจำนวนเทอมที่พิจารณาด้วย ซึ่งจะทำให้ลดความผิดพลาดที่เกิดจากจำนวนเทอมในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ไม่เท่ากันได้

ตารางที่ 15 คือตารางสำหรับวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากการทดลองแบบ Box-Behnken จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบบจำลองสามารถเชื่อได้ที่ระดับนัยสำคัญ 99% ($P < 0.01$) แสดงให้เห็นว่าจะมีอย่างน้อย 1 ปัจจัยในแบบจำลองที่มีความสำคัญต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ เมื่อแบบจำลองถูกแบ่งพิจารณาในแต่ละเทอมทั้งแบบเชิงเส้น (Linear term) แบบกำลังสอง (Square term) และแบบอิทธิพลร่วมกัน (Interaction term) จะพบว่าค่าสถิติ P ของแต่ละเทอมมีค่ามากกว่า 0.1 โดยเทอมแบบเชิงเส้นมีค่าสถิติ P เป็น 0.145 ซึ่งมีค่า

น้อยที่สุดแสดงให้เห็นว่าเป็นเทอมที่มีความสำคัญที่สุดที่มีผลต่อการตอบสนองของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารผลิตภัณฑ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 85% ($P < 0.15$) ในขณะที่เทอมที่มีความสำคัญรองลงมาได้แก่เทอมอิทธิพลร่วมกัน และ เทอมกำลังสอง ซึ่งจะให้ค่าสถิติ P เป็น 0.172 และ 0.187 ตามลำดับโดยมีผลต่อการตอบสนองของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารผลิตภัณฑ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 80% ($P < 0.2$) แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มที่สามารถละทิ้งเทอมกำลังสอง และเทอมอิทธิพลร่วมกันของแต่ละปัจจัยได้ที่ระดับนัยสำคัญ 80% แต่อย่างไรก็ดีเนื่องจากระดับนัยสำคัญที่ได้มีค่าต่ำกว่า 95% ทำให้มีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดโดยการปฏิเสธเทอมที่มีอิทธิพลได้ ทั้งนี้ต้องพิจารณาพร้อมกับค่าสหสัมพันธ์ และค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้ด้วยอีกประการหนึ่ง

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	548.232	548.232	60.9147	12.22	0.007
Linear	3	475.118	42.4211	14.1404	2.84	0.145
Square	3	35.382	35.3820	11.7940	2.37	0.187
Interaction	3	37.732	37.7319	12.5773	2.52	0.172
Residual Error	5	24.927	24.9271	4.9854		
Lack-of-Fit	3	24.346	24.3460	8.1153	27.93	0.035
Pure Error	2	0.581	0.5811	0.2905		
Total	14	573.159				

ตัวแปรทางสถิติที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการทดสอบทางสถิติของการทดลองแบบ Box-Behnken คือการทดสอบความผิดพลาด (Residual Error) ซึ่งค่าดังกล่าวใช้อธิบายปรากฏการณ์ความผิดพลาดที่ไม่สามารถอธิบายได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ทั้งนี้ความผิดพลาดสามารถแบ่งได้เป็น

2 ส่วนคือ ความผิดพลาดจากความไม่สมรูปของแบบจำลอง (Lack of fit) และความผิดพลาดจากการทดลอง (Pure Error) (Cochran and Cox, 1997)

สำหรับการทดสอบความผิดพลาดของความไม่สมรูปของสมการ วิเคราะห์ได้จากการทำการทดลองซ้ำจำนวนอย่างน้อย 3 ครั้งที่อยู่กึ่งกลางของการทดลองซึ่งเป็นสถานะที่อุณหภูมิ 40 °ซ ร้อยละโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 3.75:1 และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็นร้อยละ 30 ซึ่งค่าสถิติ P ของการทดสอบความไม่สมรูปของแบบจำลองมีค่าเป็น 0.035 ซึ่งค่าดังกล่าวมีค่ามากกว่า 0.01 ($P > 0.01$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่สามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักที่ว่าไม่มีความไม่สมรูปเกิดขึ้นระหว่างแบบจำลองที่ได้กับผลการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดของความไม่สมรูประหว่างแบบจำลองกับผลการทดลองมีค่าไม่เกิน 1% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าแบบจำลองมีความสมรูปต่อผลการทดลอง

3.2 การเปรียบเทียบแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบเต็มรูปแบบกับแบบอื่นๆ

โปรแกรมสถิติมินิแทบ รุ่นที่ 13 ถูกใช้ในการพิจารณาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่มีการตัดทอนที่มีค่าสถิติ P มากกว่า 0.15 ซึ่งสามารถตัดทอนดังกล่าวออกจากแบบจำลองได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างแบบจำลองที่ไม่มีการตัดทอน และมีการตัดทอนต่างๆ โดยพิจารณาพร้อมกับค่าสหสัมพันธ์ (R^2) และค่าสหสัมพันธ์ที่มีการปรับแก้ (R^2 -adj) และค่าสถิติของการทดสอบความไม่สมรูประหว่างแบบจำลองกับข้อมูลของแต่ละแบบจำลองดังผลในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบต่างๆ

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R^2	R^2 -adj	P of lack of fit
Full term quadratic Box-Behnken equation $FAME = 64.5719 + 1.9933 MO - 2.5342 T - 0.0073 IM + 0.2593 MO^2 + 0.0279 T^2 - 0.0011 IM^2 - 0.0983 T \times MO + 0.0017 T \times IM + 0.0467 MO \times IM$	95.7%	87.8%	0.035
Linear Box-Behnken equation $FAME = 26.6514 + 1.4067 MO - 0.6173 T + 0.1679 IM$	82.9%	78.2%	0.026
Linear and T^2 Box-Behnken equation $FAME = 68.9030 + 1.4067 MO - 2.8027 T - 0.1697 IM + 0.0273 T^2$	87.8%	82.9%	0.033

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบต่างๆพบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ให้ค่าสหสัมพันธ์ (R^2) ค่าสหสัมพันธ์ปรับแก้ (R^2 -adj) และค่าสถิติ P ของการทดสอบความไม่สมรูปของแบบจำลองกับข้อมูล (P of lack of fit) ซึ่งจากตารางที่ 16 แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองแบบเต็มรูปให้ค่าดังกล่าวสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองแบบอื่นๆ ดังนั้นจึงไม่สามารถตัดเทอมต่างๆในแบบจำลองได้ จะได้สมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ระหว่างร้อยละโดยโมลของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์กับปัจจัยต่างๆตามสมการกำลังสองเป็นดังสมการที่ 17

3.3 การเปรียบเทียบแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบเต็มรูปแบบกับแบบอื่นๆ

กราฟพื้นผิว (Surface plot) และกราฟคอนทัวร์ (Contour plot) ถูกใช้ในการอธิบายอิทธิพลของปัจจัยต่างๆต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารผลิตภัณฑ์ โดยกราฟพื้นผิวเป็นการแสดงข้อมูลในรูปแบบสามมิติ ในขณะที่กราฟคอนทัวร์เป็นการแสดงข้อมูลในรูปแบบสองมิติซึ่งเชื่อมข้อมูลที่มีค่าเท่ากันให้อยู่ในพื้นที่เดียวกัน ทั้งนี้ภาพที่ 22-30 แสดงกราฟพื้นผิวและกราฟคอนทัวร์ที่ได้ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารผลิตภัณฑ์กับปัจจัยต่างๆอันได้แก่ อุณหภูมิ (30-50 °C) อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (1.5:1 – 6:1) และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (10-50) โดยอาศัยแบบจำลองเต็มรูปแบบตามสมการที่ 17

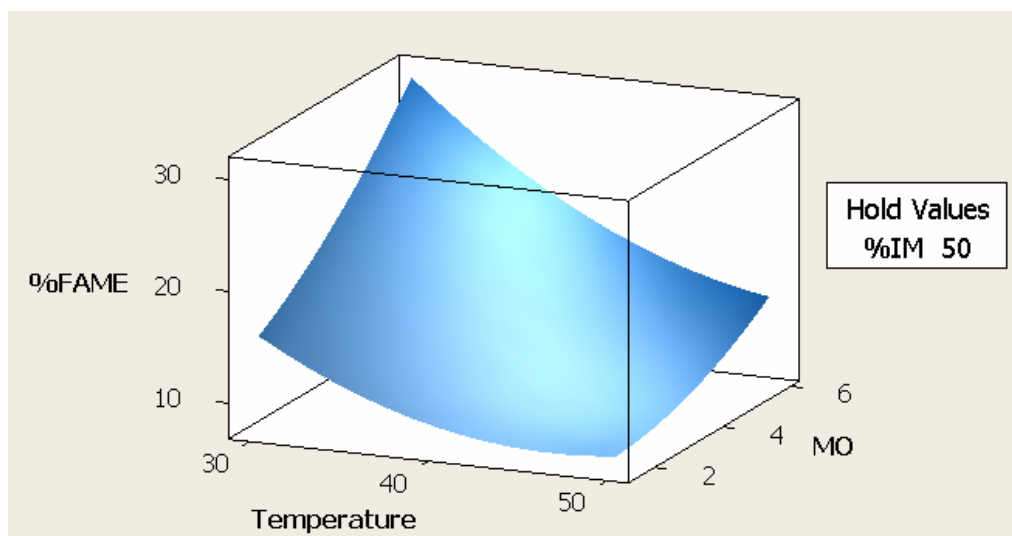
3.3.1 อิทธิพลของอุณหภูมิและอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์

จากภาพที่ 22-24 แสดงกราฟพื้นผิวและกราฟคอนทัวร์ที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยาและอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงคงที่ โดยค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์มีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิต่ำคือ 30 °C และที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 6:1 และในขณะที่เดียวกันร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารผลิตภัณฑ์จะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจาก 30 °C เป็น 50 °C และอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันลดลงจาก 6:1 เป็น 1.5:1

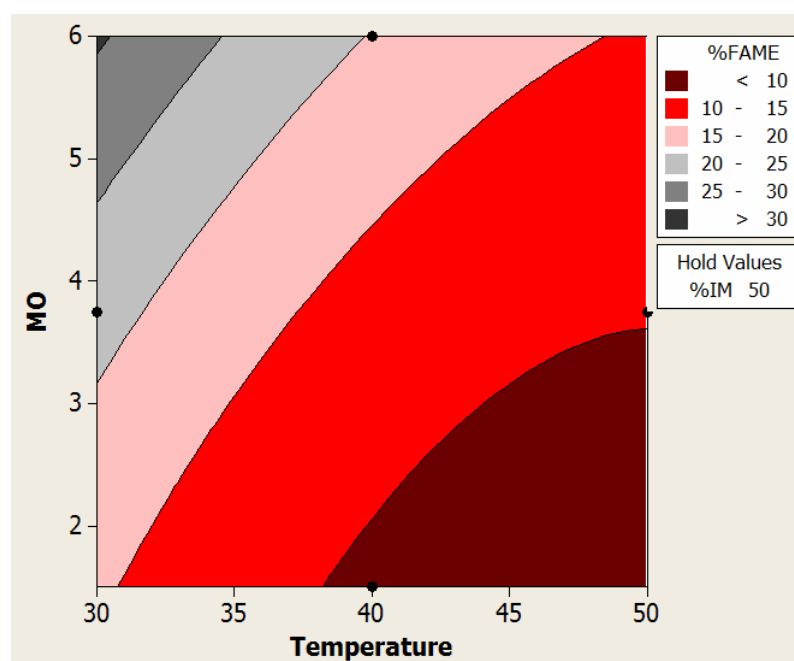
จากผลการทดลองที่แสดงว่าสภาวะอุณหภูมิต่ำจะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงกว่าที่อุณหภูมิสูงซึ่งไม่สอดคล้องกับทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีทั่วไปที่โดยปกติอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆดังแสดงในตารางที่ 17 ซึ่งพบว่ามีงานวิจัยอีกหลายงานวิจัยที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอยู่ระหว่าง 30 ถึง 40 °C ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ไลเปส คือโมเลกุลของโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ค่าหนึ่งๆเท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปสที่ใช้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือสภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์คือที่ประมาณ 30 °C นั่นเอง

ตารางที่ 17 อุณหภูมิของปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปส

ผู้วิจัย	ปฏิกิริยา	อุณหภูมิที่เหมาะสม
Shieh <i>et. al.</i> , (2003)	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Rhizomucor miehei</i>	36.5 ° ซ
Gao <i>et. al.</i> , (2006)	ปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Candida sp.</i>	40 ° ซ
Nie <i>et. al.</i> , (2006)	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันที่ใช้แล้วและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Candida sp.</i>	40 ° ซ
Hari <i>et. al.</i> , (2001)	ปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของไอโซ-บิวทีริกและเอทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Rhizomucor miehei</i>	30 ° ซ
Combes and Marty (2002)	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกสูงกับบิวทานอลด้วย Lipozyme	40 ° ซ
งานวิจัยนี้	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันกับเมทานอลด้วยไลเปสจาก <i>Pseudomonas fluorescens</i>	30 ° ซ



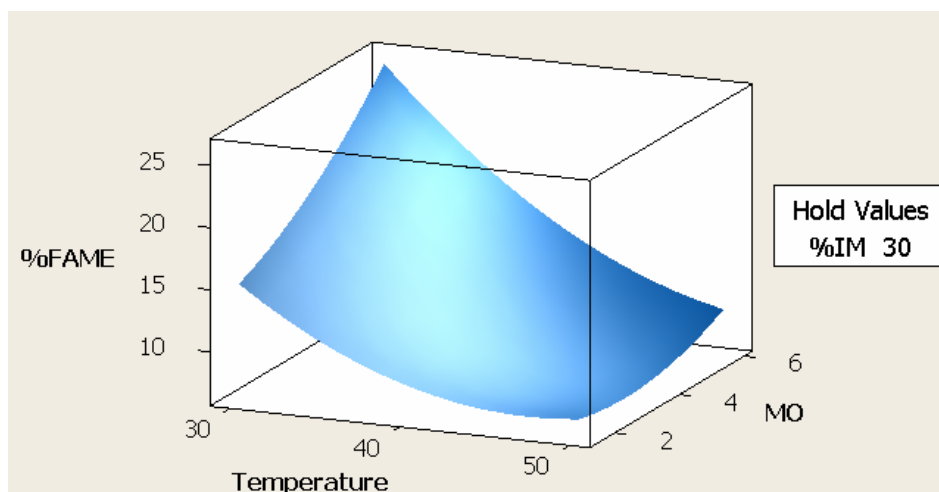
(ก)



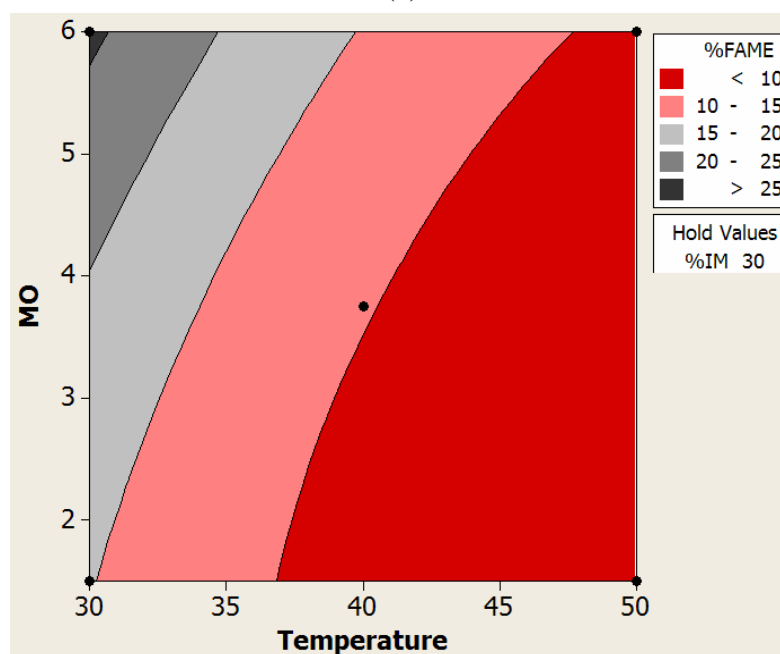
(ข)

ภาพที่ 22 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่ $IM = 50$

(ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่ $IM = 50$



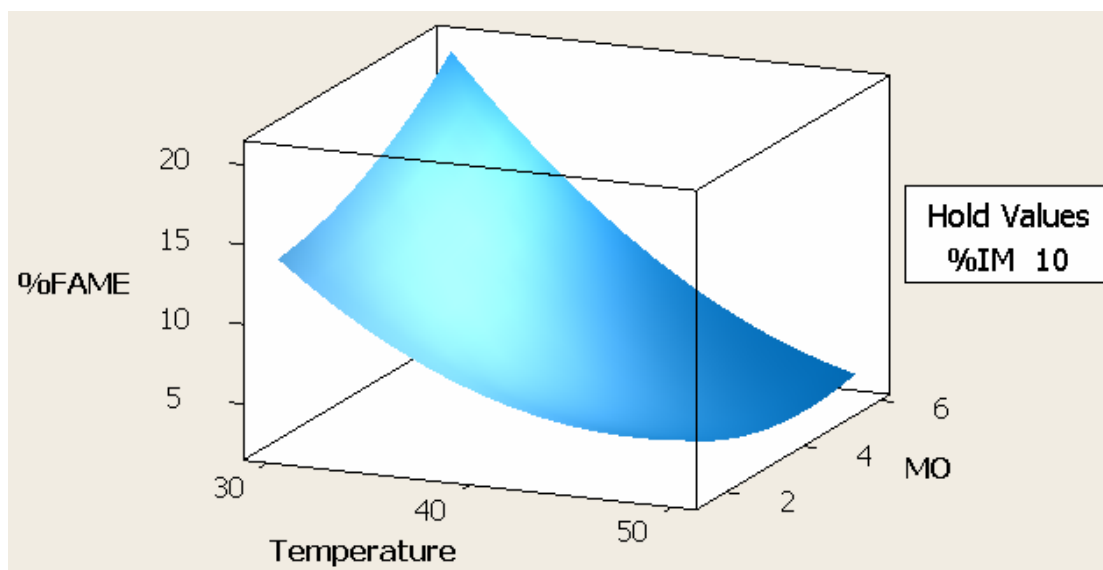
(ก)



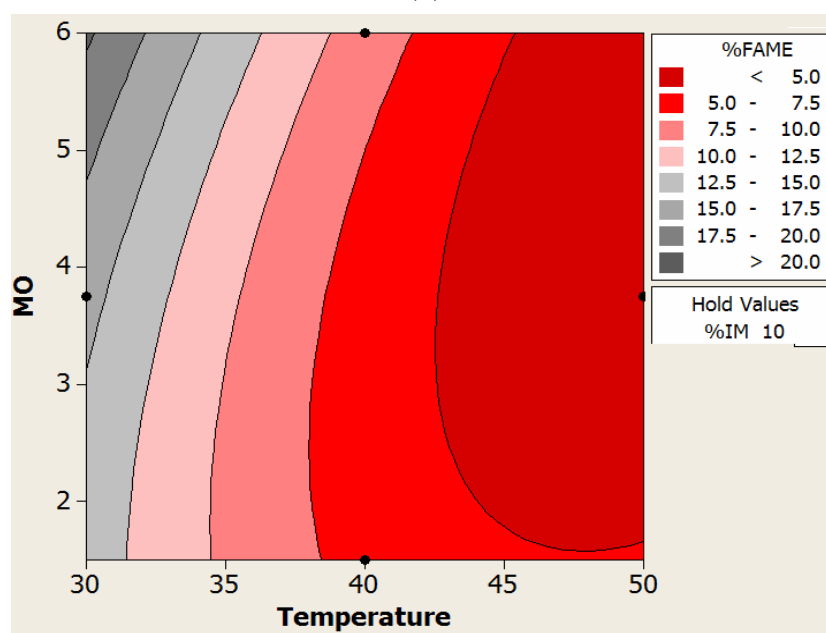
(ข)

ภาพที่ 23 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่ $IM = 30$

(ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่ $IM = 30$



(ก)

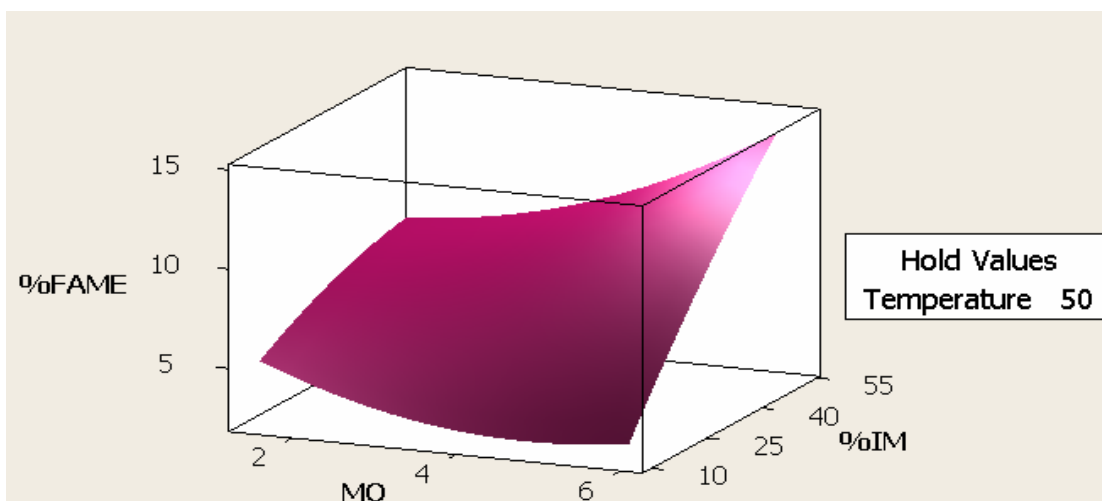


(ข)

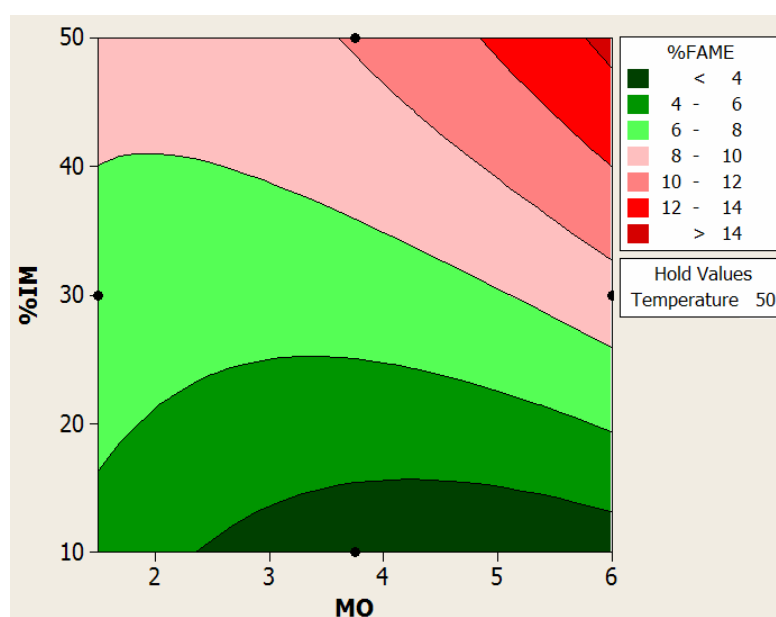
- ภาพที่ 24 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่ $IM = 10$
- (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของปฏิกิริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่ $IM = 10$

3.3.2 อิทธิพลของร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์

ภาพที่ 25-27 แสดงกราฟพื้นผิวและกราฟคอนทัวร์ที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงและอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันที่อุณหภูมิคงที่ โดยที่ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์จะมีค่าสูงสุดที่ระดับสูงของร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ($IM = 50$) และที่ระดับสูงของอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ($MO = 6:1$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยส่วนใหญ่ที่เมื่อมีปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาและความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ดีที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันระหว่าง 1.5:1 ถึง 4:1 และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ 10 ถึง 30 พบว่าให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารผลิตภัณฑ์ที่มีค่าสูงกว่าที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันที่ 6:1 ซึ่งอาจเกิดจากการที่มีปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงน้อยจนเกินไป จึงทำให้เมทานอลที่มีปริมาณมากจะเกิดการยับยั้งโดยเข้าไปจับกับบริเวณที่พื้นผิวที่ว่องไวจนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันไม่สามารถจับกับบริเวณดังกล่าวได้ จึงทำให้ได้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันที่ค่าอื่นๆ

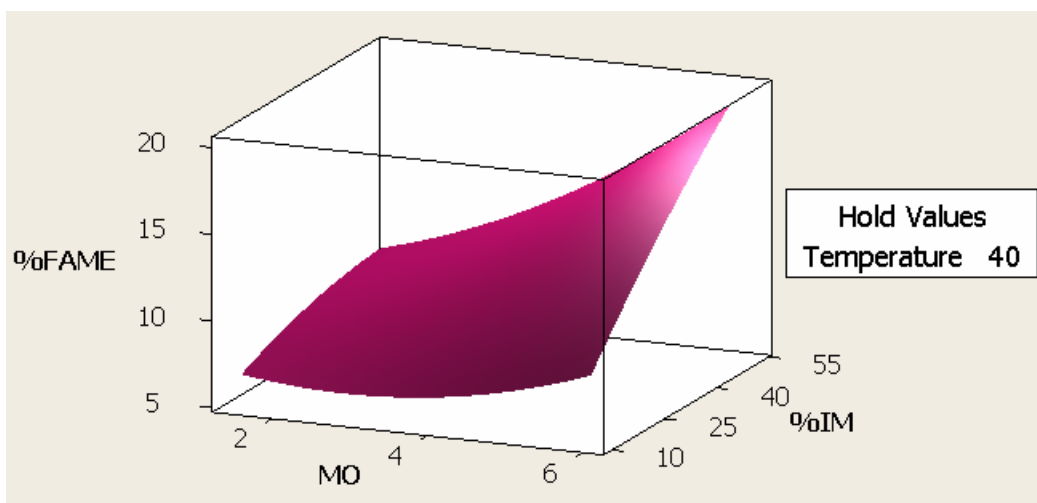


(ก)

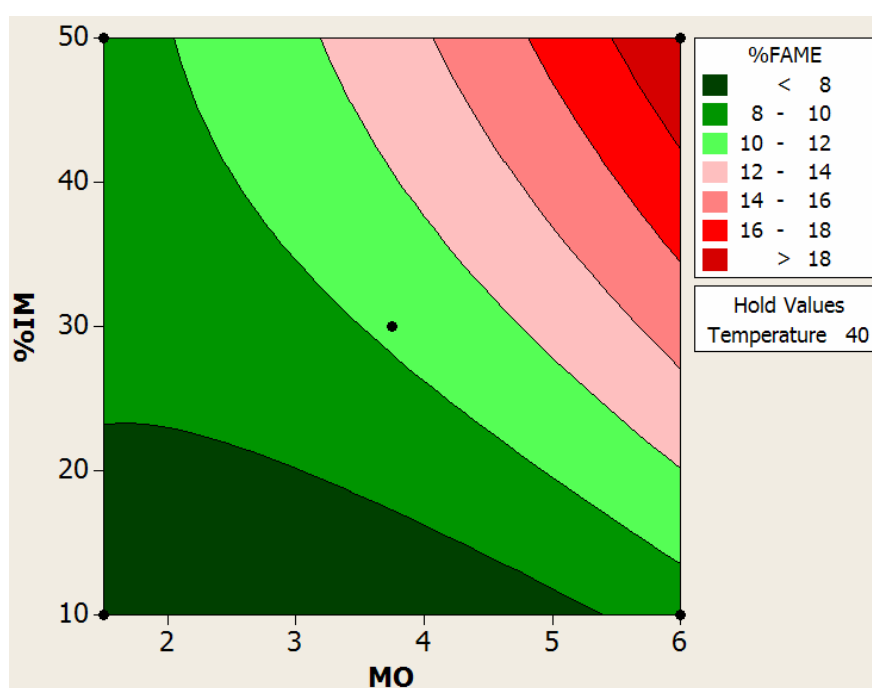


(ข)

- ภาพที่ 25 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน เมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่อุณหภูมิ 50 °ซ
- (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน เมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่อุณหภูมิ 50 °ซ

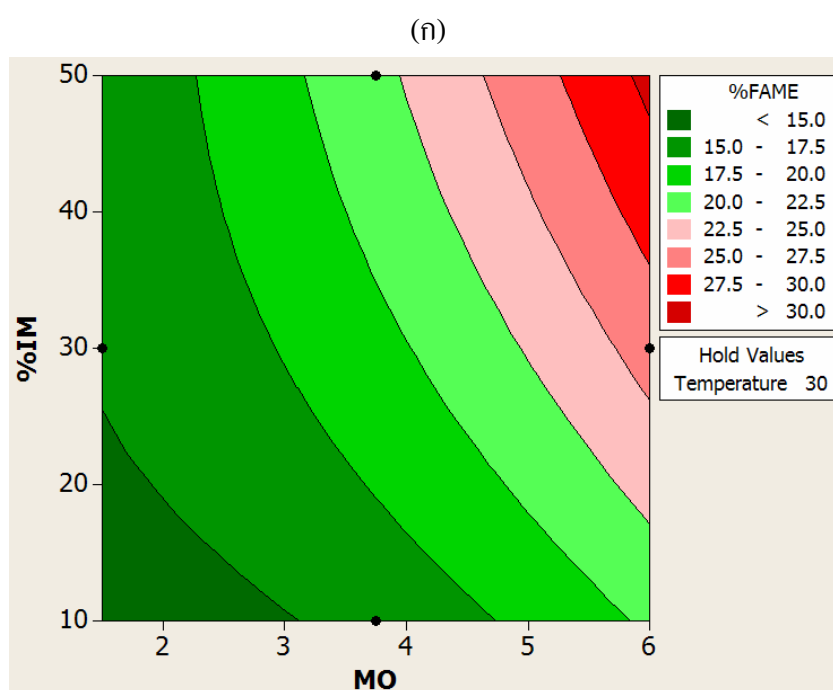
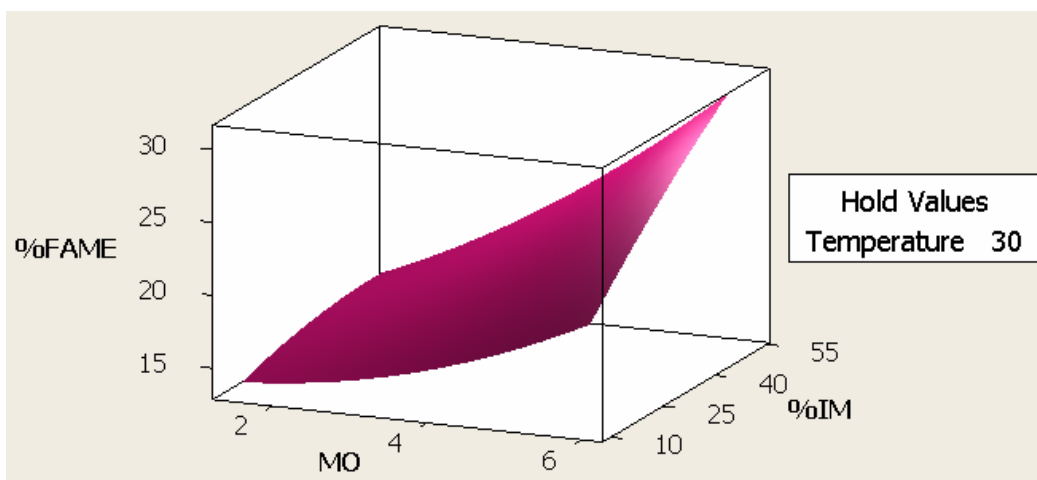


(ก)



(ข)

- ภาพที่ 26 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน เมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่อุณหภูมิ 40 °ซ
- (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน เมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่อุณหภูมิ 40 °ซ

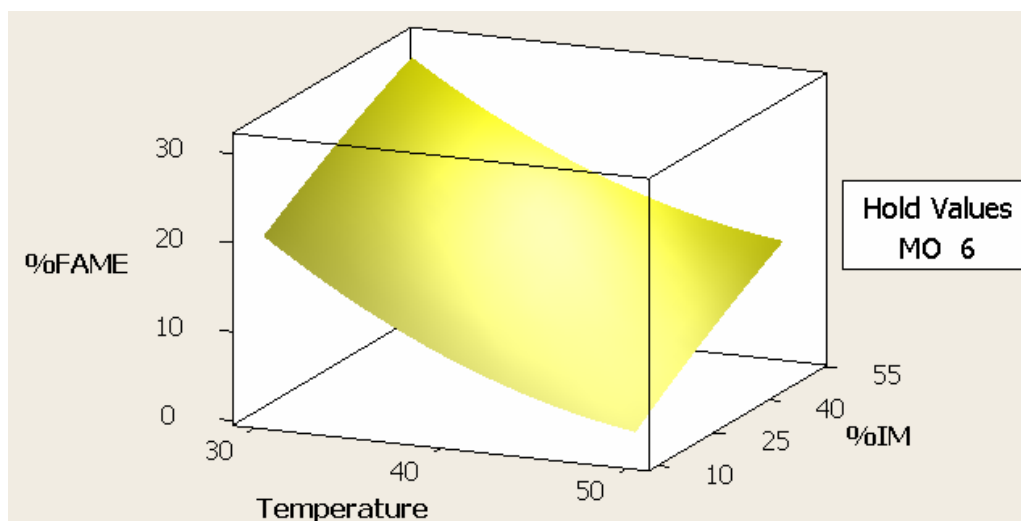


(ข)

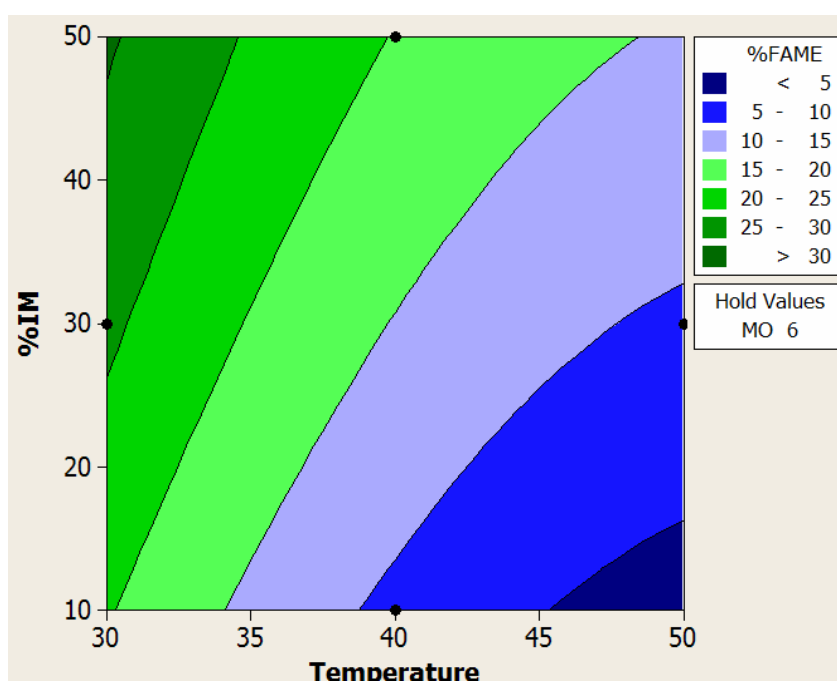
- ภาพที่ 27 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน เมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่อุณหภูมิ 30 °ซ
- (ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน เมล็ดดอกทานตะวันต่อ *FAME* ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

3.3.3 อิทธิพลของร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงและอุณหภูมิของปฏิกิริยาต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์

รูปที่ 28-30 แสดงกราฟพื้นผิวและกราฟคอนทัวร์ที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงและอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันคงที่ โดยที่ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์จะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 °C และร้อยละโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 50 ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ที่ถูกตรึงบนเม็ดโกลโดซานด้วยวิธีห่อหุ้มจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิต่ำและการที่ทำปฏิกิริยาในสภาวะอุณหภูมิสูงทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงลดลง โดยอาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง โดยจะทำให้เอนไซม์มีพื้นที่ผิวที่ว่างไวต่อปฏิกิริยาลดลง มีผลให้ได้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ในปริมาณที่ลดลงด้วย



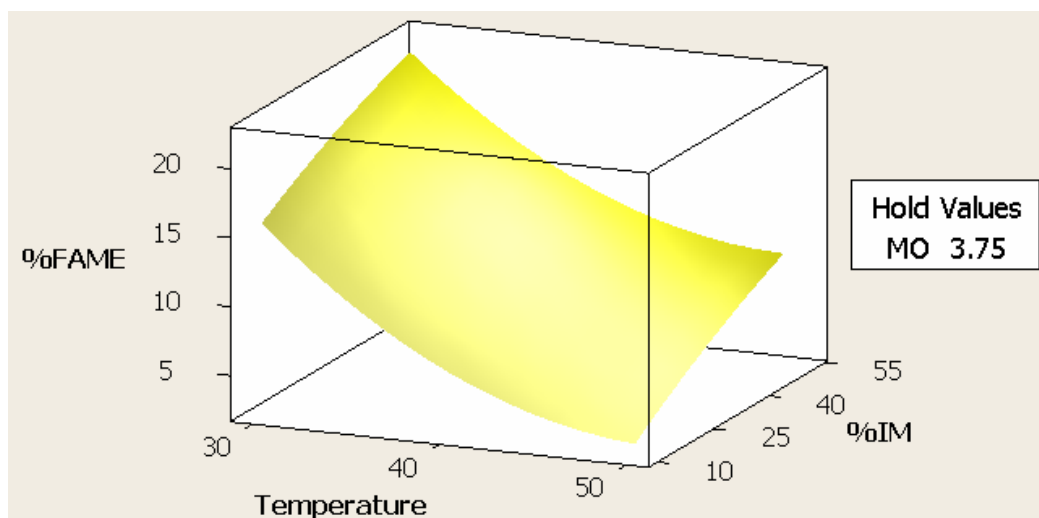
(ก)



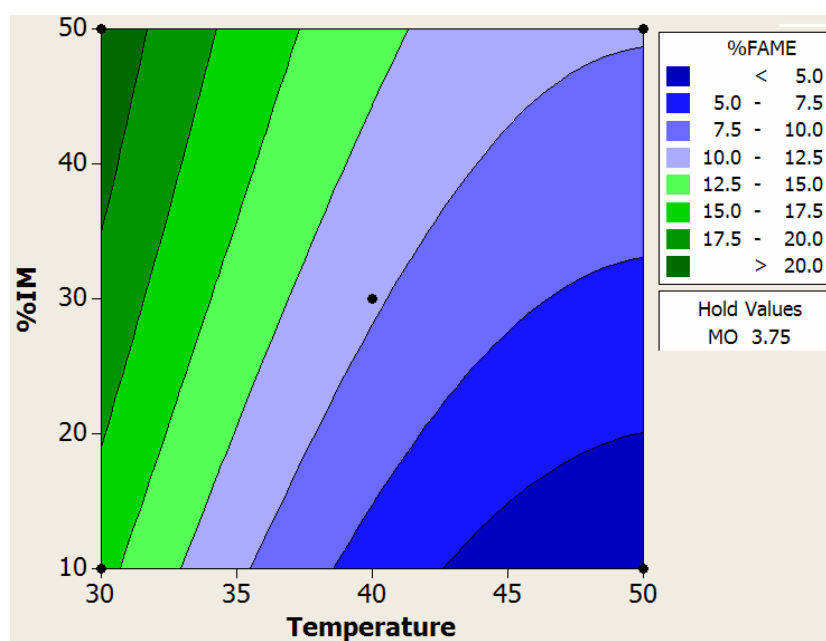
(ข)

ภาพที่ 28 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของ
เอโนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ *FAME* ที่อัตราส่วนโดย
โมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 6:1

(ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอโนไซม์
ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ *FAME* ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล
ต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 6:1



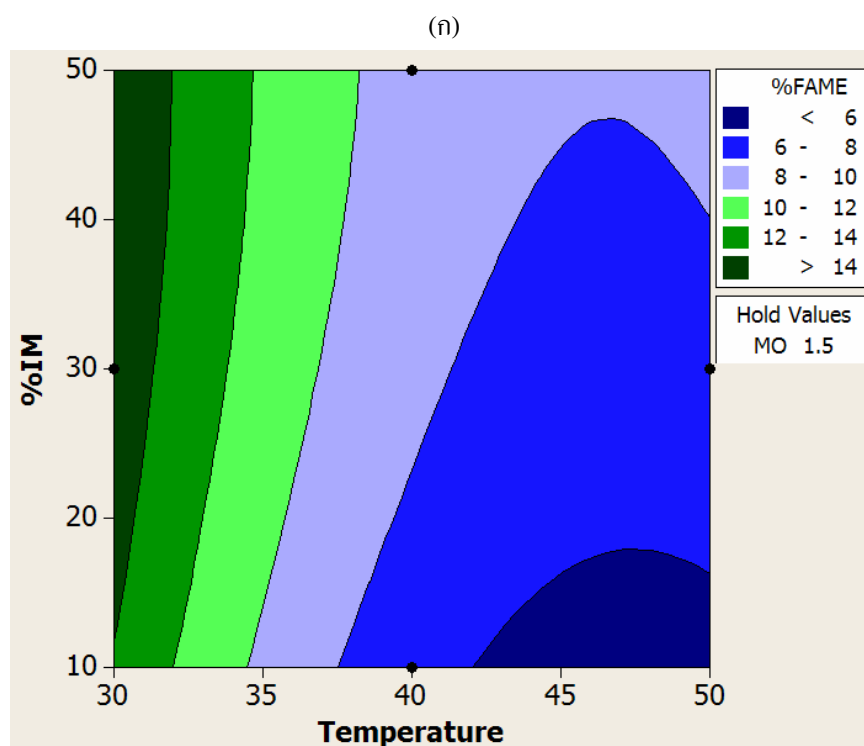
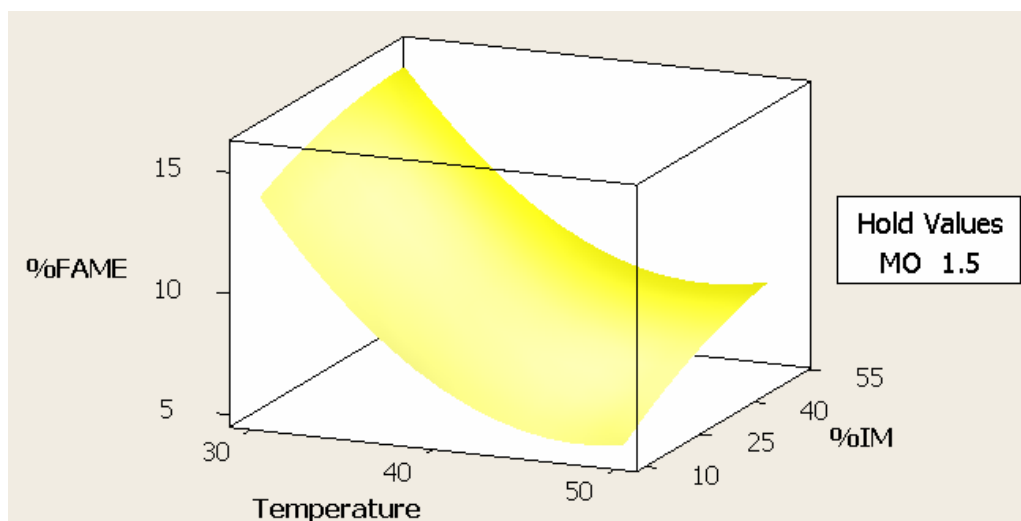
(ก)



(ข)

ภาพที่ 29 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของ
เอโนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ *FAME* ที่อัตราส่วนโดย
โมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 3.75:1

(ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอโนไซม์
ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ *FAME* ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล
ต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 3.75:1



(ข)

ภาพที่ 30 (ก) กราฟของพื้นผิวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ *FAME* ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 1.5:1

(ข) กราฟคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และ อุณหภูมิต่อ *FAME* ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 1.5:1

3.4 สภาวะที่เหมาะสมและช่วงความเชื่อมั่นในการผลิตไบโอดีเซล

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ เมทานอลจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโกลโคซานด้วยวิธีห่อหุ้มคือ

อุณหภูมิของปฏิกิริยา	=	30° ซ
อัตราส่วนโดยโมลเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน	=	6:1
ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง	=	50
ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข2)	=	30.7

ทั้งนี้เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันด้วย เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโกลโคซาน เพื่อทำการยืนยันค่าปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของ เมทิลเอสเทอร์สูงสุดที่ได้จากสภาวะดังกล่าว จึงได้ทำการทดลองผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม จำนวน 3 ตัวอย่างเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและช่วงความเชื่อมั่นในการผลิตไบโอดีเซล โดยได้ผลการ ทดลองดังตารางที่ 18 ดังนี้

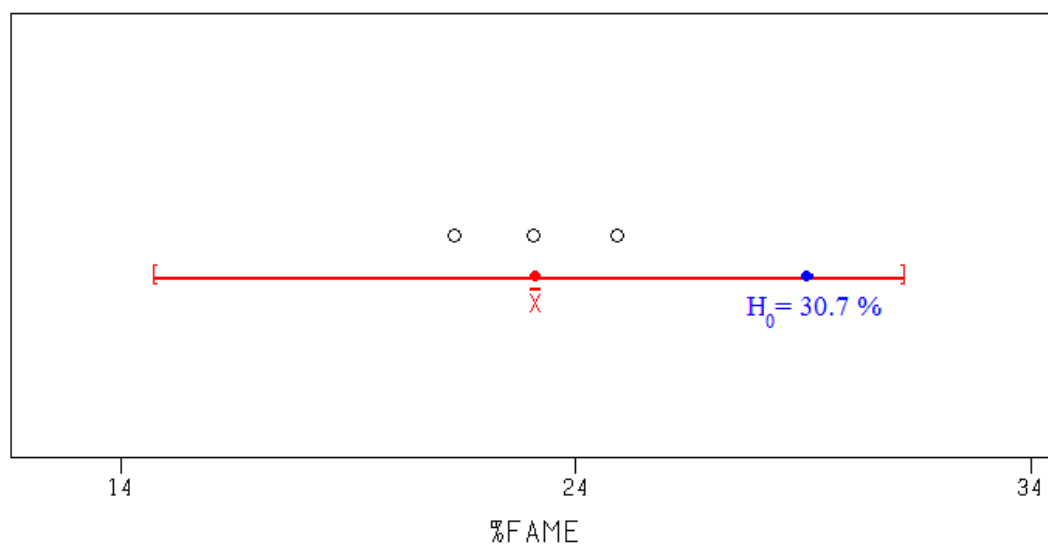
ตารางที่ 18 ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสมในการเร่ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

ตัวอย่างที่	ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์
1	24.90
2	23.07
3	21.34

ทั้งนี้ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ว่ามีค่าเป็น 23.10 ซึ่งค่าเฉลี่ย ที่ได้สามารถนำมาใช้อนุมานทางสถิติเพื่อหาค่าเฉลี่ยที่แท้จริง (μ) ของร้อยละโดยน้ำหนักของ เมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสม และเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบมีขนาดเล็ก ($n < 30$) พบว่าค่าเฉลี่ยที่แท้จริง (μ) ของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากสภาวะที่ เหมาะสมตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Box-Behnken คือ 30.7 ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยร้อยละโดยน้ำหนัก

ของเมทิลเอสเทอร์ที่แท้จริงในสถานะที่เหมาะสมจะมีค่าในช่วงร้อยละ 14.81 ถึง 31.40 ($14.81 < \mu < 31.40$) ที่ระดับนัยสำคัญ 98.5% โดยการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก จ

ภาพที่ 31 แสดงช่วงความเชื่อมั่นของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ โดยแสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยที่แท้จริง (μ) ของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์พบว่ายู่ในช่วงที่ประมาณได้

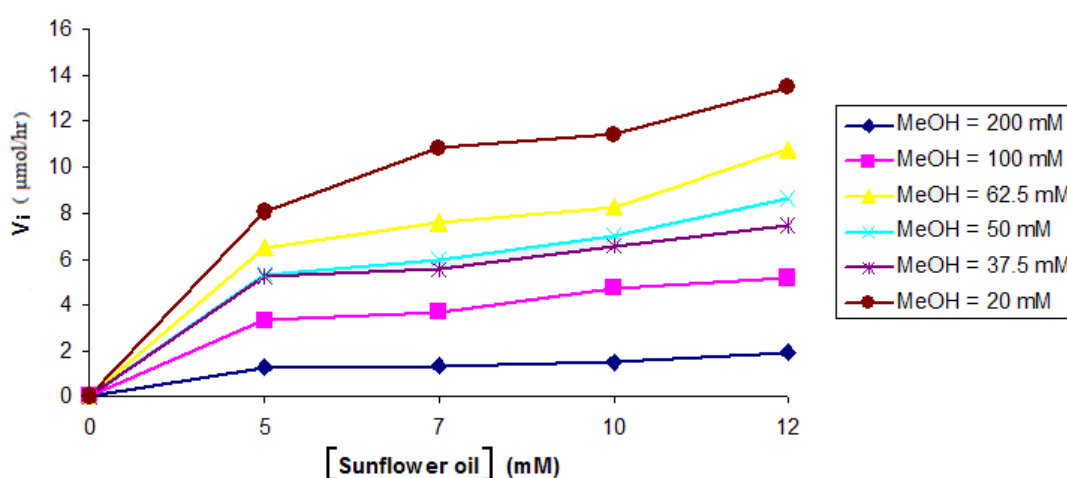


ภาพที่ 31 ช่วงค่าเฉลี่ยที่แท้จริงของค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากสถานะที่เหมาะสม ($T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 6:1$ $IM = 50$)

เมื่อ $\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทดลอง และ H_0 คือ สมมติฐานหลัก ($H_0 = 30.7$)

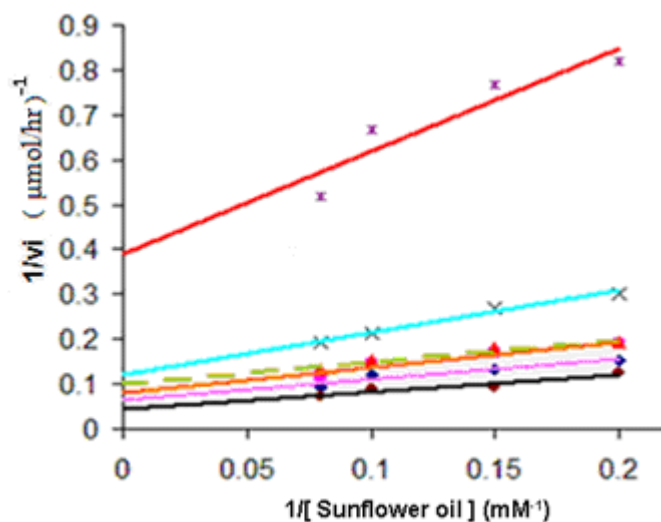
4. การหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์

การหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโคลโคซาน พิจารณาจากการวิเคราะห์หาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลแตกต่างกัน ภาพที่ 32 แสดงผลการทดลองหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นกับความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและความเข้มข้นของเมทานอลต่างๆ

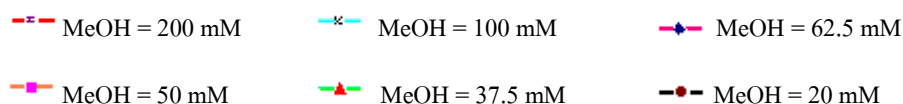


ภาพที่ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นกับความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและความเข้มข้นของเมทานอลตั้งแต่ 20-200 มิลลิโมลาร์

จากการทดลอง พบว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้นของเมทานอล แต่เมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้นของเมทานอลพบว่าที่ความเข้มข้นของเมทานอลคือ 20 มิลลิโมลาร์จะได้ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นสูงที่สุดในทุกความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน โดยจะได้ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นสูงกว่าที่ความเข้มข้นของเมทานอลคือ 62.5 50 37.5 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ จะพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นจะลดลงซึ่งอาจเกิดจากการยับยั้งปฏิกิริยาของเมทานอลเนื่องจากเมทานอลเป็นขั้วเสตรทที่มีความเป็นพิษต่อเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ทั้งนี้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นกับความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลเป็นไปตามสมการที่ 8



ภาพที่ 33 ความสัมพันธ์ระหว่าง $1/v_i$ และ ส่วนกลับของความเข้มข้นน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน

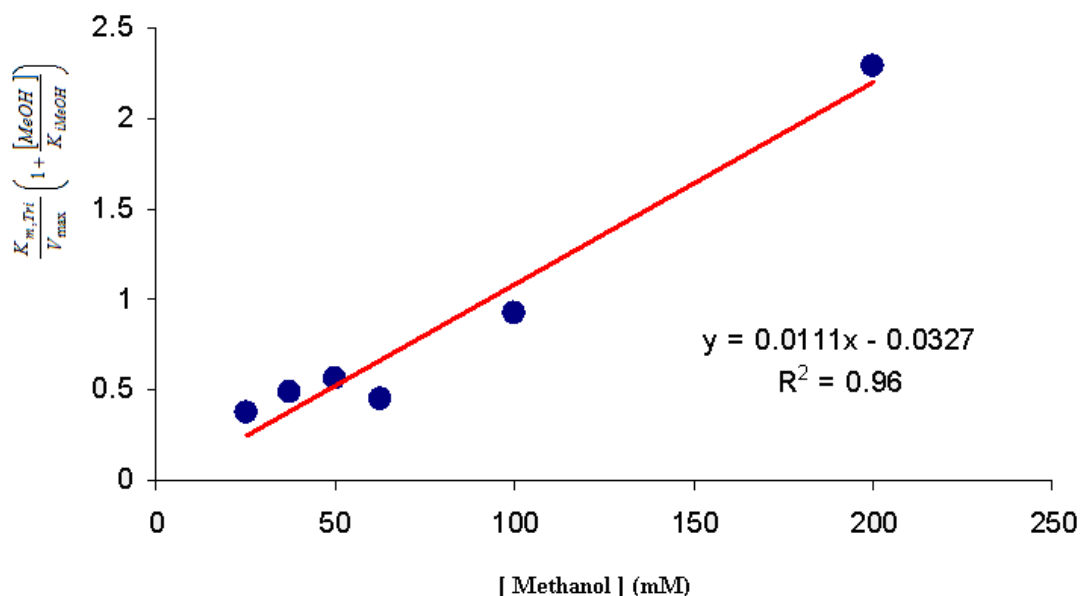


ค่าความชันและจุดตัดแกนของความสัมพันธ์ระหว่าง $1/v_i$ และ ส่วนกลับของความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันจะพบว่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเมทานอล ดังสมการ

$$\text{Slope} = \frac{K_{m, \text{Tri}}}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[\text{MeOH}]}{K_{i, \text{MeOH}}} \right) \quad (18)$$

$$\text{Y-intercept} = \left(\frac{K_{m, \text{MeOH}}}{V_{\max} [\text{MeOH}]} + \frac{1}{V_{\max}} \right) \quad (19)$$

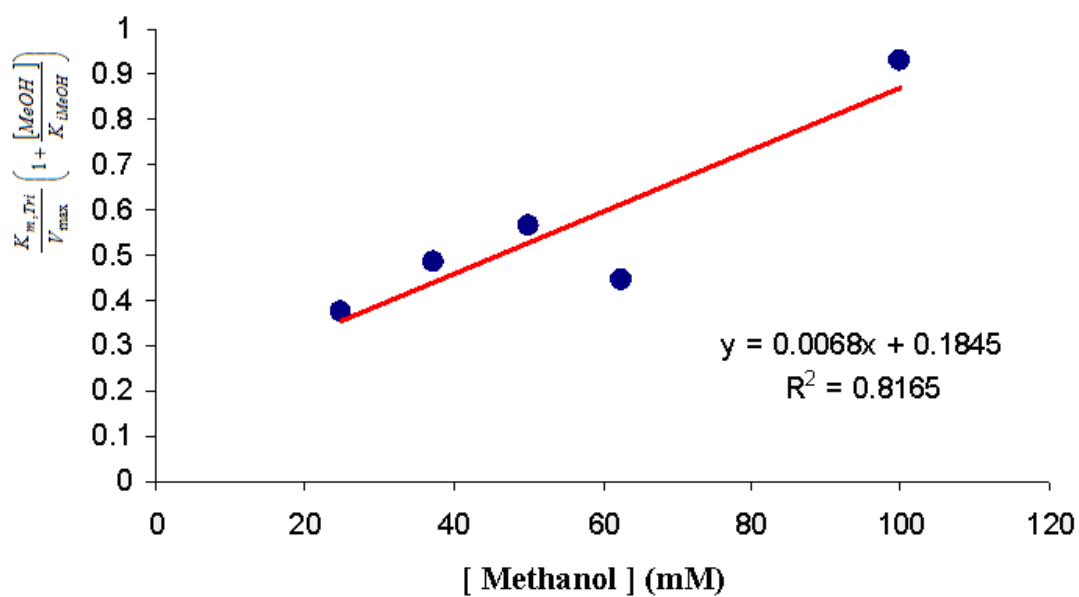
เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชันกับความเข้มข้นของเมทานอล ดังแสดงในภาพที่ 34 โดยกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ได้ดังนี้



ภาพที่ 34 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{K_{m,Tri}}{V_{max}} \left(1 + \frac{[MeOH]}{K_{i,MeOH}} \right)$ และ ความเข้มข้นของเมทานอล

เมื่อพิจารณาภาพที่ 34 จะพบว่าได้ค่าความชันซึ่งมีนิยามคือ $\frac{K_{m,Tri}}{V_{max} K_{i,MeOH}}$ เป็น 0.0111 และ

จุดตัดแกนวย ซึ่งนิยามเป็น $\frac{K_{m,Tri}}{V_{max}}$ เป็น -0.0327 ทำให้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่คำนวณได้บางค่ามีค่าเป็นลบ โดยปกติแล้วค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์จะมีค่าเป็นบวก ด้วยเหตุนี้เมื่อพิจารณาข้อมูลความเข้มข้นของเมทานอลที่ทำให้เส้นกราฟมีจุดตัดแกนวยเป็นลบ โดยจะพบว่าเป็นข้อมูลที่ความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 200 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นของเมทานอลดังกล่าวอาจทำให้เอนไซม์ไลเปสเสื่อมสภาพซึ่งเกิดจากการยับยั้งปฏิกิริยาประเภทสารพิษ (Toxic substance) ด้วยเหตุนี้จึงพิจารณาตัดข้อมูลดังกล่าว ซึ่งจะได้อภาพที่ 35 ดังนี้

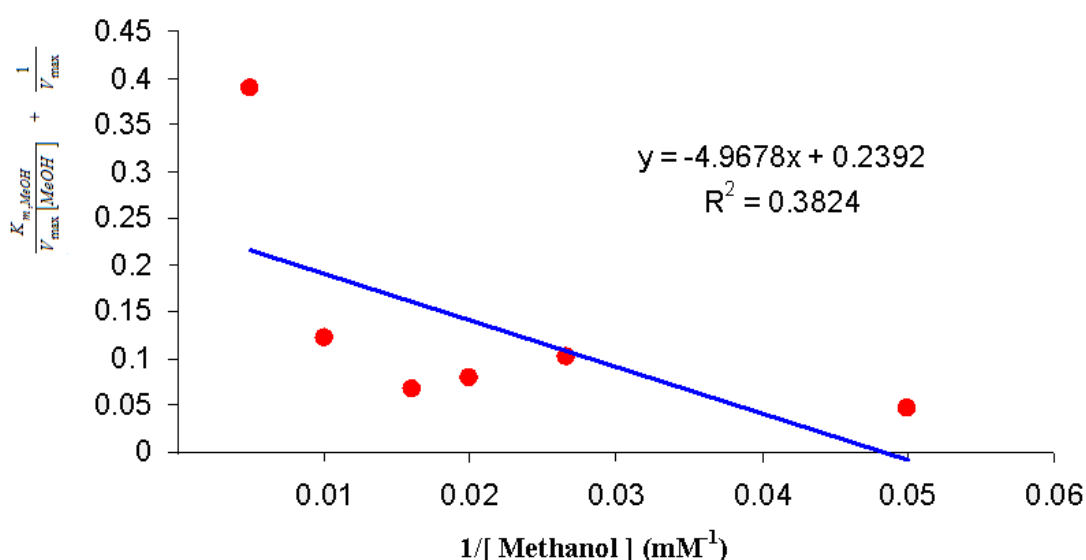


ภาพที่ 35 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{K_{m,Tri}}{V_{max}} \left(1 + \frac{[MeOH]}{K_{i,MeOH}} \right)$ และ ความเข้มข้นของเมทานอล

เมื่อพิจารณาถึงข้อมูลที่มีความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 200 มิลลิโมลาร์

ทั้งนี้จะได้ค่าความชัน มีค่าเป็น 0.0068 และจะได้จุดตัดแกนย มีค่าเป็น 0.1845

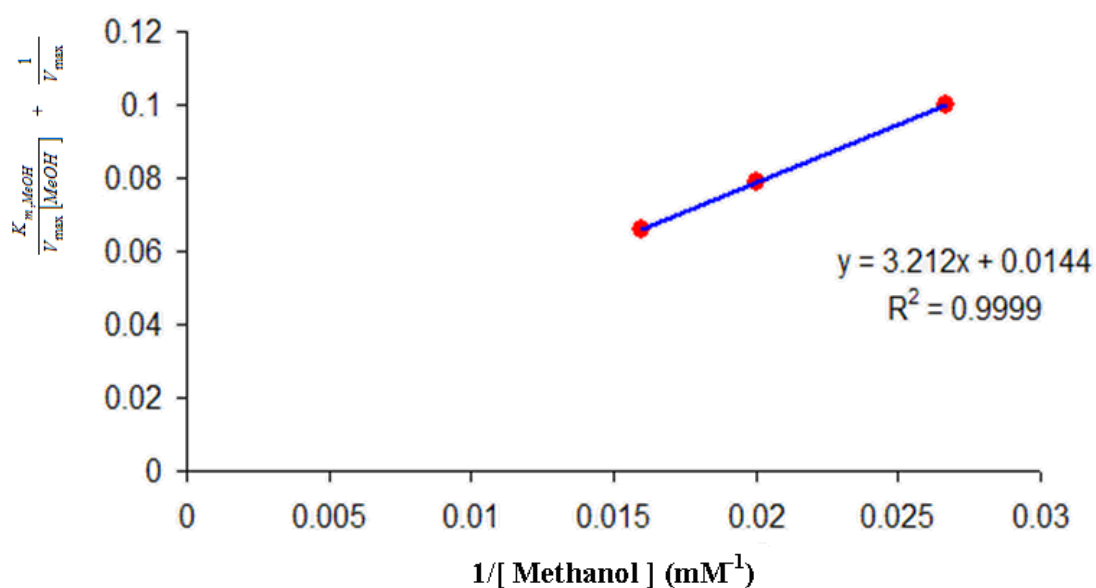
เมื่อทำการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\frac{K_{m,MeOH}}{V_{max}[MeOH]} + \frac{1}{V_{max}}$ และ ส่วนกลับของความเข้มข้น จะได้ดังภาพที่ 36



ภาพที่ 36 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{K_{m,MeOH}}{V_{max}[MeOH]} + \frac{1}{V_{max}}$ และ ส่วนกลับของความเข้มข้นของเมทานอล

เมื่อพิจารณาภาพที่ 36 จะพบว่าได้ค่าความชันซึ่งมีนิยามคือ $\frac{K_{m,MeOH}}{V_{max}}$ เท่ากับ -4.9678 และ จุดตัดแกน y ซึ่งนิยามคือ $\frac{1}{V_{max}}$ เท่ากับ 0.2392 โดยมีค่าสหสัมพันธ์เป็น 0.3824

ทั้งนี้จะพบว่า ค่าความชันของกราฟในภาพที่ 36 มีค่าเป็นลบ และค่าสหสัมพันธ์เป็น 0.3824 ซึ่งมีค่าที่ต่ำเกินไป อาจเกิดจากการทำการทดลองที่ความเข้มข้นของเมทานอลในช่วงความเข้มข้นที่ต่ำจนเกินไปทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับสูงกว่าปฏิกิริยาไปข้างหน้า หรือความเข้มข้นของเมทานอลสูงจนเกินไปจนทำให้ปฏิกิริยาถูกยับยั้งด้วยเมทานอล ด้วยเหตุนี้จึงทำการทดลองตัดข้อมูลความเข้มข้นของเมทานอลที่ 20 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าจุดตัดแกน y และ ส่วนกลับของความเข้มข้นของเมทานอลได้ใหม่ดังภาพที่ 37 ซึ่งจะได้ความชันคือ 3.212 และจุดตัดแกน y คือ 0.0144



ภาพที่ 37 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{K_{m,MeOH}}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}$ และ ส่วนกลับของเมทานอลเมื่อพิจารณาละทิ้งข้อมูลที่ความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 20 100 และ 200 มิลลิโมลาร์

ทั้งนี้จะได้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ด้วยวิธีกราฟสองขั้นตอนดังแสดงในตารางที่ 19 แต่เมื่อพิจารณาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จากวิธีกราฟ พบว่า ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ เนื่องจากค่า $K_{m,MeOH}$ มีค่าน้อยกว่า $K_{m,Tri}$ ซึ่งพบว่า แตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ อีกหลายงานวิจัยเช่น Combes and Marty (2002) และ Hari *et al.*, (2001) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว Combes and Marty (2002) ได้เสนอวิธีการแก้ปัญหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จากวิธีกราฟด้วยวิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์ Excel ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงอาศัยวิธีการที่เสนอโดย Combes and Marty (2002) ซึ่งอาศัยวิธีผลต่างกำลังสองน้อยที่สุดในการประมาณค่าในการหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ โดยอาศัยสมการที่ 11 ดังนี้

$$Total\ error = \sum_i (v_i^e - v_i^m)^2 \quad (11)$$

เมื่อ

V_i^e = อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลอง

V_i^m = อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์

ทั้งนี้ตารางที่ 19 แสดงค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์โดยใช้วิธีทางกราฟและวิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์ดังนี้

ตารางที่ 19 ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์โดยใช้วิธีทางกราฟและวิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์

วิธีการ	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$)	$k_{m, \text{Tri}}$ (mmol)	$k_{m, \text{MeOH}}$ (mmol)	$k_{i, \text{MeOH}}$ (mmol)
วิธีกราฟ	69.45	12.81	3.212	16.18
วิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์	69.45	12.81	68.36	13.84

ค่า $k_{m, \text{MeOH}}$ และ $k_{i, \text{MeOH}}$ ที่ได้จากวิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์ พบว่า ให้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่สอดคล้องกับความเข้มข้นของเมทานอลที่ยับยั้งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลในงานวิจัยอื่นๆ เช่น Combes and Marty (2002) และ Freeman and Pryde (1983) ทั้งนี้ค่า $k_{m, \text{tri}}$ และค่า $k_{m, \text{MeOH}}$ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงค่าครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลที่ทำให้ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นสูงสุด (V_{max}) ซึ่งค่าที่ได้สอดคล้องกับการทดลองหาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลจากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ซึ่งให้ค่าอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันที่เหมาะสมที่สุดคือ 6:1

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สถิติด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA เป็นวิธีการทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ด้วยเม็ดโคโคซานโดยวิธีห่อหุ้ม โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่วิธีการเตรียมสารละลายโคโคซาน (ละลายผงโคโคซานปริมาณ 1 กรัมใน 1%v/v สารละลายกรดอะซิติก 1.5 กรัมใน 1.5%v/v สารละลายกรดอะซิติก และ 2 กรัมใน 2%v/v สารละลายกรดอะซิติก) และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสกับสารละลายโคโคซานเป็น 1:100 1:150 และ 1:200 จากการทดลอง พบว่า ที่สภาวะการเตรียมสารละลายโคโคซาน 1.5 กรัมใน 1.5%v/v และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสกับสารละลายโคโคซานเป็น 1:150 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่มีค่าสูงสุดคือ 396 หน่วยต่อกรัมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ระดับนัยสำคัญ 99%

2. การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงโดยใช้สถิติด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

การออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman ถูกใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโคโคซานด้วยวิธีห่อหุ้ม โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิของปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายรวม (นอร์มอล-เฮกเซน) และร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำ ทั้งนี้ พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซลได้แก่ อุณหภูมิของปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงโดยใช้สถิติด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ถูกใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงโดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิของปฏิกิริยา คือ 30 °C อัตราส่วนโดยโมลเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน คือ 6:1 และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง คือ 50 โดยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ให้ค่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในสารผลิตภัณฑ์ร้อยละ 30.7 ทั้งนี้พบว่าในการทดลองผลิตเมทิลเอสเทอร์ในสภาวะดังกล่าวจะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในช่วงร้อยละ 14.81 ถึง 31.40 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 98.5

4. การศึกษาหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโกลโดซานด้วยวิธีห่อหุ้มถูกศึกษาด้วยวิธีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น พบว่า ผลการทดลองของค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลสอดคล้องกับกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบปิงปอง ไบ ไบ ที่มีเมทานอลเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา โดยงานวิจัยนี้อาศัยวิธีการกราฟและวิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์ ซึ่งพบว่าวิธีเชิงตัวเลขด้วยคอมพิวเตอร์จะให้ค่าคงที่ที่สอดคล้องกับผลการทดลองมากกว่าวิธีการกราฟ และจะได้ค่าคงที่ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเมทานอลและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันโดยมีเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ที่ตรึงบนโกลโดซานคือ $V_{max} = 69.45 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ $k_{m,Tri} = 12.81 \text{ mmol}$ $k_{m,MeOH} = 68.36 \text{ mmol}$ และ $k_{i,MeOH} = 13.84 \text{ mmol}$

ข้อเสนอแนะ

1. ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มอาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจะถูกขังอยู่ในโครงผลึก หรือเมมเบรนของพอลิเมอร์ซึ่งอาจทำให้ไตรกลีเซอไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถแพร่เข้าไปในโครงผลึกได้ ดังนั้นอาจเลือกใช้วิธีอื่นๆ เช่นการสร้างพันธะโควาเลนต์ หรือไอออนิกเป็นต้น

2. หากต้องการเพิ่มร้อยละของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ควรศึกษารายละเอียดของปัจจัยทั้งสามที่มีผลต่อการผลิต ได้แก่ อุณหภูมิของปฏิกิริยา ร้อยละโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ซึ่งร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงอาจมีความสำคัญสำหรับการออกแบบระบบการผลิตแบบไม่ต่อเนื่อง แต่หากเป็นการออกแบบระบบผลิตแบบต่อเนื่องอาจไม่จำเป็นต้องพิจารณาในปัจจัยร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงแต่ต้องพิจารณาจากเวลาในการสัมผัสระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงแทน

3. การเติมตัวทำละลายร่วม (นอร์มอล-เฮกเซน) และน้ำ จากการทดลองนี้พบว่าสามารถเพิ่มค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ได้ แต่เนื่องจากปัจจัยทั้งสองมีอิทธิพลต่อร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าปัจจัยอื่นๆ ดังนั้นหากต้องการเพิ่มปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์อาจทำการทดลองเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสถานะที่มีการเติมตัวทำละลายร่วม และน้ำ กับสถานะที่ไม่มีการเติมเพื่อประกอบการตัดสินใจ

4. ค่าคงที่ในสมการอัตราของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและ เมทานอลสามารถนำไปใช้ในการออกแบบถังปฏิกรณ์เคมีสำหรับการผลิตไบโอดีเซลได้โดยอาศัยสมการอัตรากับสมการสมดุลมวลสารสำหรับการออกแบบถังปฏิกรณ์เคมี

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จกกล สุภารัตน์. 2549. การออกแบบการทดลอง. ศูนย์พัฒนาบุคลากรเพื่ออุตสาหกรรมและปิโตรเคมี, ปทุมธานี.
- ณัฏฐภัทร จินดา. 2547. เอนไซม์ไลเปส 1: แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 24 (3): 21-31.
- คุษฎี รัตนพระ. 2549. การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประภัสสร สุรวฒนาวรรณ. ไคติน-ไคโตซาน. <http://www.gpo.or.th/rdi/html/chitin.html>, 5 กุมภาพันธ์ 2548.
- ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และ พงศ์ชนัน เหลืองไพบูลย์. 2551. การออกแบบและวิเคราะห์การทดลอง. สำนักพิมพ์ท็อป, กรุงเทพฯ.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1. ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วิจิตรา พลเยี่ยม. 2543. การวางแผนการทดลอง เล่ม 1. ภาควิชาสถิติประยุกต์และศูนย์ผลิตตำราเรียนสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, กรุงเทพฯ.
- พิสมัย เจนวนิชปัญญกุล. 2544. ไบโอดีเซล: พลังงานทางเลือก. แหล่งที่มา: http://www.tistr.or.th/publication/page_area_show_bc.asp?il=90&i2=10000, 25 มีนาคม 2552.
- สายชล สันตมณูญ์ทอง. 2551. สถิติวิศวกรรม. ครั้งที่ 3. จามจุรีโปรดักท์, กรุงเทพฯ.

สุณี รักษาเกียรติศักดิ์. 2547. การใช้โปรแกรม SPSS และ Epi Info สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.
ภาควิชาคณิตศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ

อภัสสร ฆมิคท์. 2537. เทคนิคที่สำคัญทางชีวเคมี. หน้า 32-56. โรงพิมพ์สหมิตรพรินติ้ง,
กรุงเทพฯ.

AOCS, Official Method Ce 1-62. 1990. Fatty acid composition by gas chromatography, sampling
and analysis of commercial fats and oils. 1-4

Balaraman, M. and D. Soundar. 2004. Applications of surface plots and statistical designs to
selected lipase catalysed esterification reactions. **J. Process Biochemistry**. 847-853.

Barker, R.D and C.K. Leach. 1993. **Technological applications of biocatalysts**.
Butterworth-Heinemann Ltd., London, England.

Box, G.E., W.G. Hunter and J.S Hunter. 1993. **Statistics for Experimenters**. John Wiley &
Sons, Inc. New York, U.S.A.

Chiang, W.D., S.W. Chang and C.J. Shieh. 2003. Studies on the optimized lipase-catalyzed
biosynthesis of *cis*-3-hexen-1-yl acetate in *n*-hexane. **Process Biochemistry**. 38: 1193-
1199

Chiou, S.H. and W.T. Wu. 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with
activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**. 25: 197-204.

Cochran, W.G. and G.M. Cox. 1997. **Experimental Design**, 2nd ed., John Wiley & Sons,
Inc. New York, U.S.A.

- Combes D.V. and A. Marty. 2002. Lipase-catalyzed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme Microb Technol.** 30: 90-94.
- Doran M.P. 1995. **Bioprocess Engineering Principles.** Academic Press. London. England.
- Freeman, B. and E.H. Pryde. 1983. Fatty ester from vegetable oil for use as diesel Fuel. vegetable oil Fuel Proceeding of the International reference on plant and vegetable oil and Fuel. **Amer.Soc.Arg.Eng.** 117-122.
- Fukuda, H., A. Kondo and H. Noda. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of Oils. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 405-416.
- Gao, Y., T. Tianwei, N. Kaili and W. Fang. 2006. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. **Chinese J. of Biotech.** 22(1): 114-118
- Hari, S. K., and N. G. Karanth. 2001. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate a kinetic study. **Biochemica et biophysica.** 1547: 262-267
- Hari, S. K., A. P. Sattur and N. G. Karanth. 2001. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl isobutyrate- optimization using a central composite rotatable design. **Process Biochemistry.** 37: 9-16.
- <http://www.agen.ufl.edu>, 25 มีนาคม 2552.

<http://osp.mans.edu.eg>, 25 มีนาคม 2552.

<http://employees.csbsju.edu>, 25 มีนาคม 2552.

Juang, R.S., F.C. Wu and R. Tseng. 2001. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Biores Technol.** 80: 187-193.

Khan, A.K. 2002. Research into Biodiesel Kinetics & Catalyst Development. Available Source: http://www.cheque.uq.edu.au/ugrad/chee4001/CHEE400102/Adam_Khan_Thesis.pdf. March 26, 2005.

Kasipar, K., J. Chutmanop and P. Srinophakun. 2007. Kinetic modeling of immobilized lipase catalysed transesterification reactions of sunflower oil and methanol for biodiesel production. **SWU Engineering J.** 2:63-69.

Lee, J.M. 1992. Biochemical Engineering. **Prentice Hall.** New Jersey. U.S.A.

Ma, F. and M.A. Hanna. 1999. Biodiesel production: a review. **Biores Technol.** 70: 1-15.

Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **JAACS.** 60: 291-294.

Marangoni A. G. 2003. Enzyme kinetics a modern approach, **John Wiley & Sons,** New York, U.S.A.

Montgomery D. C. 1997, **Design and analysis of experiments**, 4th ed., John Wiley & Sons

Inc. New York, U.S.A.

Myers, R. H. 1979. **Response Surface Methodology**. Allyn and Bacon, eds. Boston, U.S.A.

Nagesha, G. K., B. Manohar and K. U. Sankar. 2004. Enzymatic esterification of free fatty acids of hydrolyzed soy deodorizer distillate in supercritical carbon dioxide. **J. of Supercritical Fluids**. 34:75-81.

Nie, K., X. Feng, W. Fang and T. Tianwei. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel optimization of the biodiesel production. **J. of Molec. Catal B:Enz.** 43: 142-147.

Pereira, E.B., G.M. Zanin and H.F. Castro. 2003. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Braz. J. Chem. Eng.** 20:112-118.

Shieh, C. J., H. F. Liao and C. C. Lee. 2003. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Biores Technol.** 88:103-106.

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

Varese, R. and M. Varese. 1996. Methyl ester biodiesel: opportunity or necessity. **J. Americ. Oil Chem. Soci.** 7: 816-824.

Winkler, U.K. and M. J. Struckmann. 1979. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacterial.** 138: 663-670.

- Yamane, K., A. Ueta and Y. Shimamoto. 2001. Influence of physical and chemical properties of biodiesel fuel on injection, combustion and exhaust emission characteristic in a DI-CI engine. **Symposium on Diagnostic and Modeling of Combustion in Internal Combustion Engine**. Nagoya. 402-409.
- Yuanyuan, X., D. Wei and L. Dehua. 2005. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. **J. of Molec. Catal B:Enz.** 32: 241-245

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การหาความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล และ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

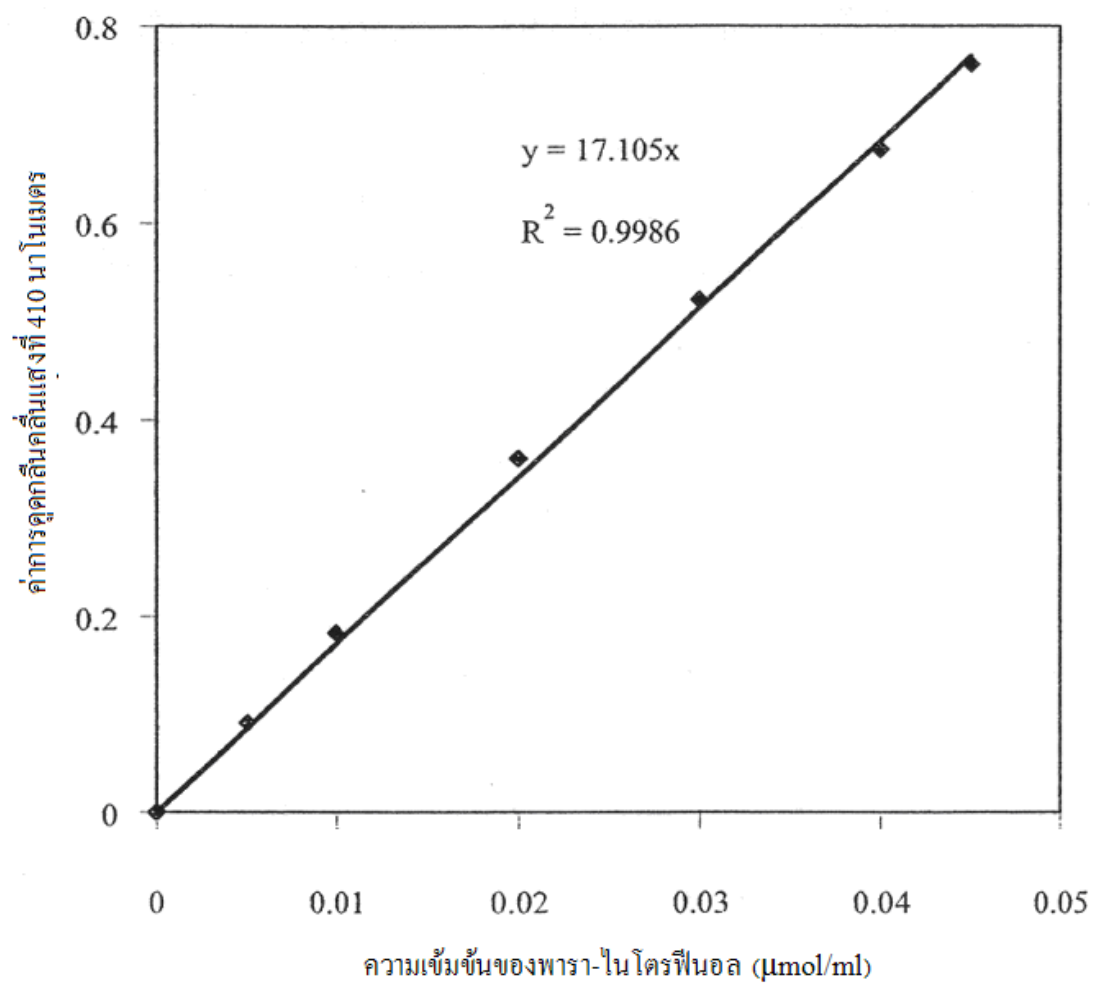
ภาคผนวก ก 1 การหาค่าความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล

พารา-ไนโตรฟินอล (*p*-NP) คือสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่าง พารา-ไนโตรฟินิล ปาล์มมิเตด (*p*-NPP) กับ 2-โพรพานอล ซึ่งกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของสารพารา-ไนโตรฟินอลสามารถทำได้โดยเตรียมพารา-ไนโตรฟินอลความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร โดยทำละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายระหว่าง 0 – 0.045 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 410 นาโนเมตร

ตารางผนวกที่ ก1 วิธีการเตรียมสารละลายพารา-ไนโตรฟินอล (*p*-NP) สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานสารพารา-ไนโตรฟินอลสำหรับหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เลขที่	pNP ($\mu\text{mol/ml}$)	สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 8 (ml)	<i>p</i> -NP (0.25 $\mu\text{mol/ml}$) (ml)
1	0.000	5	0
2	0.005	4.9	0.1
3	0.010	4.8	0.2
4	0.020	4.6	0.4
5	0.030	4.4	0.6
6	0.040	4.2	0.8
7	0.045	4.1	0.9

โดยกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้แสดงได้ในภาพผนวกที่ ก1 ดังนี้



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาค่าความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล

ภาคผนวก ก 2 ตัวอย่างการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

ความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอลที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของพารา-ฟีนิลปลัสมิเตดกับ 2-โพรพานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสอิสระสามารถหาได้จากสมการ

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ} = \frac{A_{410}}{\text{Slope}} \times \frac{5}{0.1} \times \frac{1.99}{0.01} \times \frac{1}{15} \times \frac{10}{0.05}$$

เมื่อ	A_{410}	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร
	Slope	=	ความชันของกราฟมาตรฐานพารา-ไนโตรฟินอล
	ปริมาตรรวมของสาร	=	$2.9+2+0.1 = 5$ มิลลิลิตร
	ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้	=	0.1 มิลลิลิตร
	อัตราการแข่งขันของสารตั้งต้น	=	$1.99/0.01$
	เวลาในการทำปฏิกิริยา	=	15 นาที
	ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น	=	10 มิลลิลิตร
	น้ำหนักของเอนไซม์ไลเปส	=	0.05 กรัม

$$\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเอนไซม์อิสระ} = 0.284$$

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ} = \frac{0.284}{17.105} \times \frac{5}{0.1} \times \frac{1.99}{0.01} \times \frac{1}{15} \times \frac{10}{0.05}$$

$$= 2,202.7 \text{ หน่วย}$$

ภาคผนวก ก 3 ตัวอย่างการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอลที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของพารา-ฟีนิลปาล์มมิเตดกับ 2-โพรพานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงสามารถหาได้จากสมการ

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง} = \frac{A_{410}}{\text{Slope}} \times \frac{10}{0.1} \times 20 \times \frac{1}{15} \times \frac{1}{wt}$$

เมื่อ	A_{410}	=	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 410 นาโนเมตร
	Slope	=	ความชันของกราฟมาตรฐานพารา-ไนโตรฟินอล
	ปริมาตรรวมของสาร	=	2+2+3+13 = 20 มิลลิลิตร
	อัตราการใช้ของสารตั้งต้น	=	0.1/10
	เวลาในการทำปฏิกิริยา	=	15 นาที
	น้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง	=	0.01 กรัม

การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA ถูกใช้ในการศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล โดยมีผลการทดลองดังนี้

ตารางผนวกที่ ก2 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการหาความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอลเพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ความเข้มข้นของ สารละลายกรดอะซิติก	อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสกับสารละลายโคโคซาน								
	1:100			1:150			1:200		
1%v/v	0.30	0.33	0.36	0.48	0.49	0.52	0.46	0.47	0.48
1.5%v/v	0.47	0.49	0.50	0.49	0.51	0.53	0.49	0.51	0.52
2%v/v	0.41	0.44	0.46	0.43	0.46	0.50	0.38	0.41	0.45

ตัวอย่าง การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ 1%v/v และ 1:100 ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรเป็น 0.30

$$\begin{aligned}\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง} &= \frac{0.30}{17.105} \times \frac{10}{0.1} \times 20 \times \frac{1}{15} \times \frac{1}{0.01} \\ &= 233.84 \text{ หน่วย}\end{aligned}$$

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ข้อมูลจากการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ข้อมูลจากการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

การออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA ถูกใช้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสในเมล็ดโคโตซานด้วยวิธีห่อหุ้ม ซึ่งวิธีดังกล่าวมีการทดสอบค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โดยมีสมมติฐานที่ต้องทำการทดสอบดังนี้ (วิจิตร, 2543)

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k$$

$$H_1 : \mu_i \neq \mu_j \text{ อย่างน้อย 1 คู่ของ } \mu_i \text{ และ } \mu_j$$

ในการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA จะมีความแปรปรวนจากแหล่งต่างๆ ดังสมการ

$$SS(T) = SS(Tr) + SS(B) + SS(E)$$

ทั้งนี้การหาค่าทางสถิติดังกล่าวสามารถคำนวณได้จากค่า Sum of Square, Mean Square และ F-value ดังนี้

$$MS(Tr) = \frac{SS(Tr)}{k - 1}$$

$$MS(B) = \frac{SS(B)}{n - 1}$$

$$MS(E) = \frac{SS(E)}{N - (n - 1) - (k - 1)}$$

$$F_{Tr} = \frac{MS(Tr)}{MS(E)}$$

$$F_B = \frac{MS(B)}{MS(E)}$$

ทั้งนี้ตารางผนวกที่ ข1 แสดงวิธีการหาค่าสถิติสำหรับการออกแบบการทดลองแบบ Two-way ANOVA

ตารางผนวกที่ ข1 วิธีการหาค่าสถิติสำหรับการทดสอบความแปรปรวนสำหรับการออกแบบ
การทดลองแบบ Two-way ANOVA

Source of Variance	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean Square (Variance)	F
Treatment	k-1	SS (Tr)	MS(Tr) = SS(Tr)/k-1	MS(tr) / MSE
Block	n-1	SS (B)	MS(B) = SS(B)/n-1	MS(B) / MSE
Error	(n-1)(k-1)	SS (E)	MSE = SS(E)/(n-1)(k-1)	
Total	N-1	SS (T)		

โดยการคำนวณค่าต่างๆแสดงได้ดังนี้

$$\sum y_{ij}^2 = 230^2 + 260^2 + 280^2 + 374^2 + 382^2 + \dots + 359.6^2 + 374^2 = 3,460,548$$

$$\sum T_{.i}^2 = 921^2 + 980^2 + 1034^2 + \dots + 1079^2 + 1123^2 = 10,279,632$$

$$T_{..}^2 = 9592^2 = 92,006,464$$

$$SS(T) = \sum y_{ij}^2 - \frac{T_{..}^2}{N} = 3,460,548 - \frac{92,006,464}{27} = 52,901.2$$

$$SS(Tr) = \frac{1}{b} \sum T_{.i}^2 - \frac{T_{..}^2}{N} = \frac{(921^2 + 980^2 + \dots + 1123^2)}{3} - \frac{92,006,464}{27} = 18,897.2$$

$$SS(B) = \frac{1}{a} \sum T_{j.}^2 - \frac{T_{..}^2}{N} = \frac{(3017^2 + 3503^2 + 3072^2)}{9} - \frac{92,006,464}{27} = 15,740$$

$$\begin{aligned}
 SS(E) &= SS(T) - SS(Tr) - SS(B) \\
 &= 52,901.2 - 18,897.2 - 15,740 = 18,264
 \end{aligned}$$

$$MSTr = \frac{SS(Tr)}{DF} = \frac{18,897}{2} = 9,448.5$$

$$MSB = \frac{SS(B)}{DF} = \frac{15,740}{2} = 7,870$$

$$MSE = \frac{SS(E)}{DF} = \frac{18,264}{22} = 830.2$$

$$F_{Tr} = \frac{MSTr}{MSE} = \frac{9,488.5}{830.2} = 11.38$$

$$F_B = \frac{MSB}{MSE} = \frac{7,870}{830.2} = 9.48$$

จากตารางค่าสถิติ F ซึ่ง $F_{(0.01,2,22)} = 5.72$ และค่า $F_{Tr} = 11.38 > F_{(0.01,2,22)}$ และ $F_B = 9.48 > F_{(0.01,2,22)}$ ด้วยเหตุนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักได้ นั่นคือที่ระดับความแตกต่างของทรีตเมนต์ (วิธีการเตรียมสารละลายโคโคซาน) และบล็อก (อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายโคโคซาน) ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ภาคผนวก ค

การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

ภาคผนวก ค1 การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

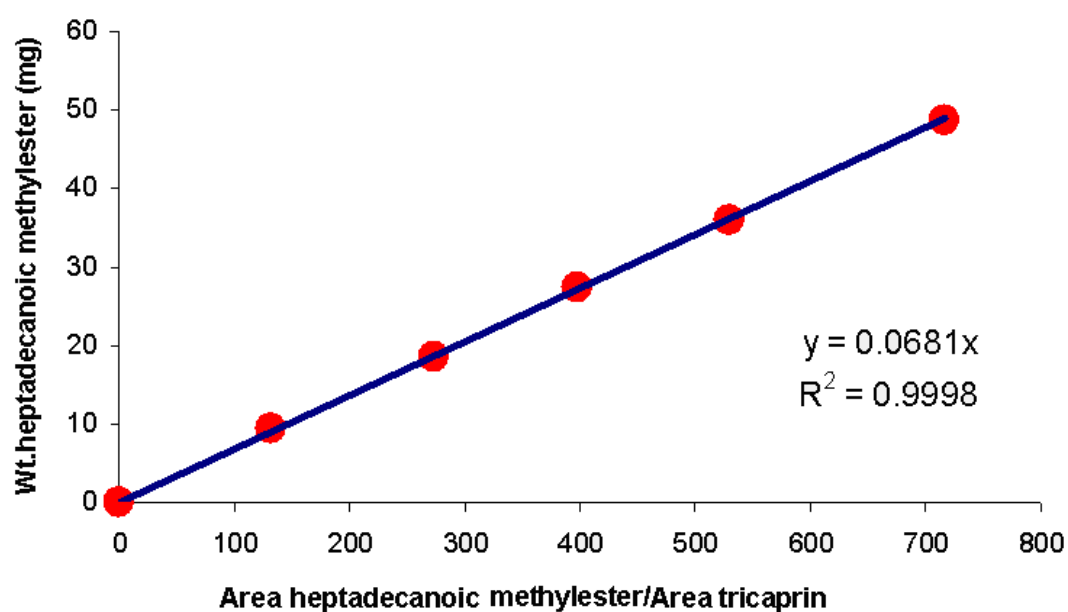
เนื่องจากเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันที่ผลิตได้ด้วยเหตุดังกล่าววิธีมาตรฐาน EN14105:2003 จึงกำหนดให้การหาปริมาณ Fatty Acid Methyl Ester จะหาอยู่ในรูปของปริมาณของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ (Heptadecanoic Methyl Ester, C17:0) เนื่องจากสารดังกล่าวเป็นสารสังเคราะห์ที่ไม่พบในแหล่งน้ำมันธรรมชาติ โดยการเตรียมสารมาตรฐานของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ ทำได้โดยละลายเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ประมาณ 100 มิลลิกรัมใน 1 มิลลิตรของ นอร์มอล-เฮปเทนจากนั้นจึงเจือจางด้วย นอร์มอล-เฮปเทนจนมีความเข้มข้นระหว่าง 0 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งข้อมูลในการเตรียมกราฟมาตรฐานของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ เป็นดังตารางผนวกที่ ค1

ตารางผนวกที่ ค1 วิธีการเตรียมสารมาตรฐานของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์

No.	C17:0 standard (ml)	n-Heptane (mg)	C17:0 (mg/ml)
1	0	1	0
2	0.1	0.9	9.72
3	0.2	0.8	19.44
4	0.3	0.7	29.16
5	0.4	0.6	38.90
6	0.5	0.5	48.60

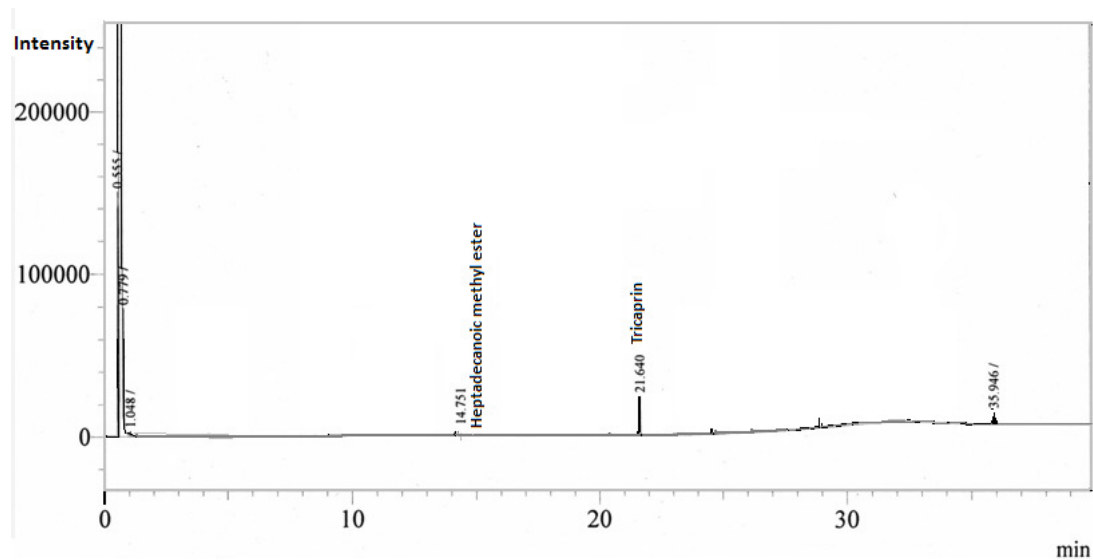
ตารางผนวกที่ ค2 ข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟของสารต่างๆในการสร้างกราฟมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์

เลข ที่	น้ำหนัก		พื้นที่ใต้กราฟ C17:0	พื้นที่ใต้กราฟ Tricaprin	พื้นที่ C17:0/ พื้นที่ Tricaprin
	C17:0 (mg)	น้ำหนักของ Tricaprin (mg)			
1	0	0.8	0	0	0
2	9.72	0.8	906243.2	6816.6	132.95
3	19.44	0.8	1823837	6679.9	273.03
4	29.16	0.8	2715945	6823.1	398.051
5	38.9	0.8	3521755	6649.3	529.64
6	48.6	0.8	4767415	6651.1	716.786

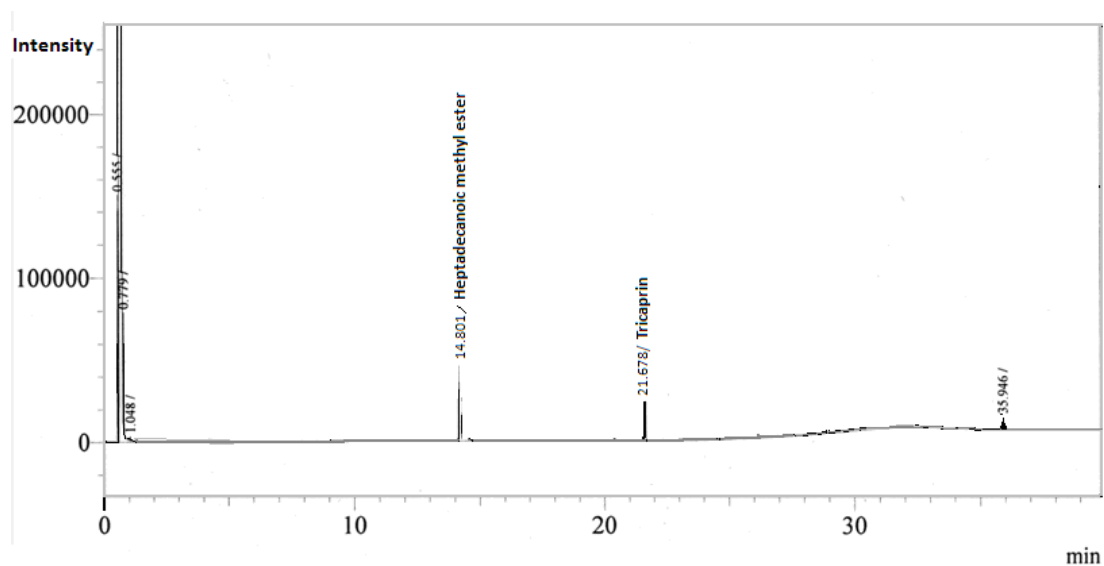


ภาพผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์

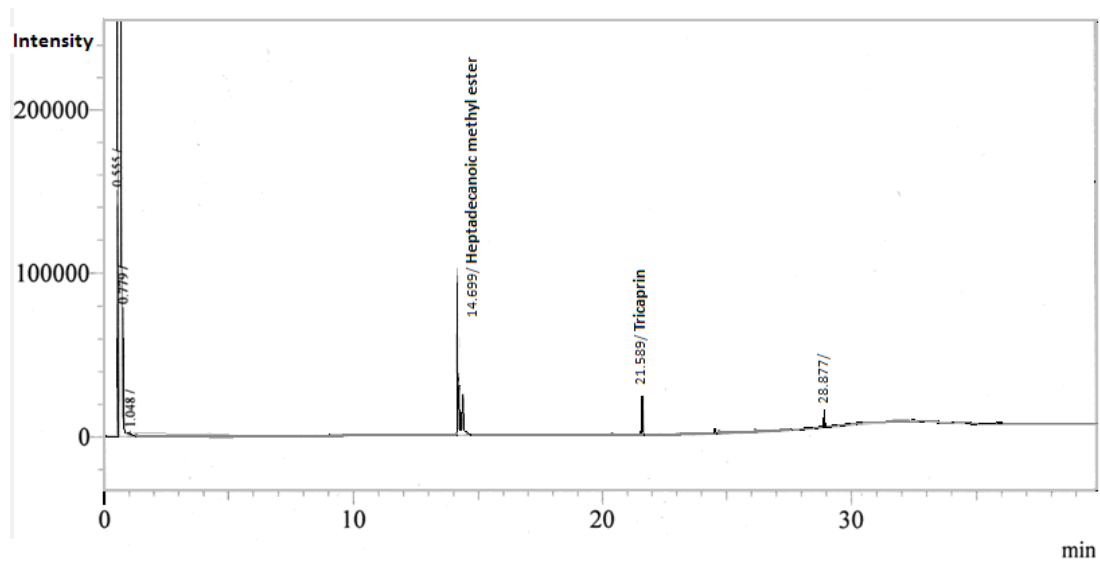
โครมาโตแกรมของแต่ละความเข้มข้นของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์เป็นดังนี้



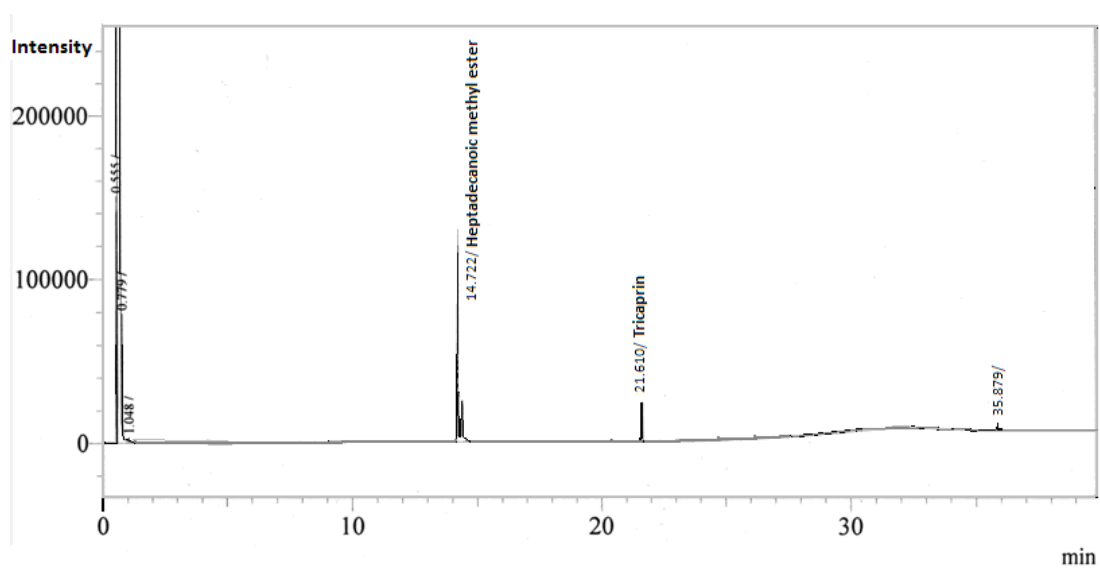
ภาพผนวกที่ ค2 โครมาโตแกรมที่นำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 0 มิลลิกรัม



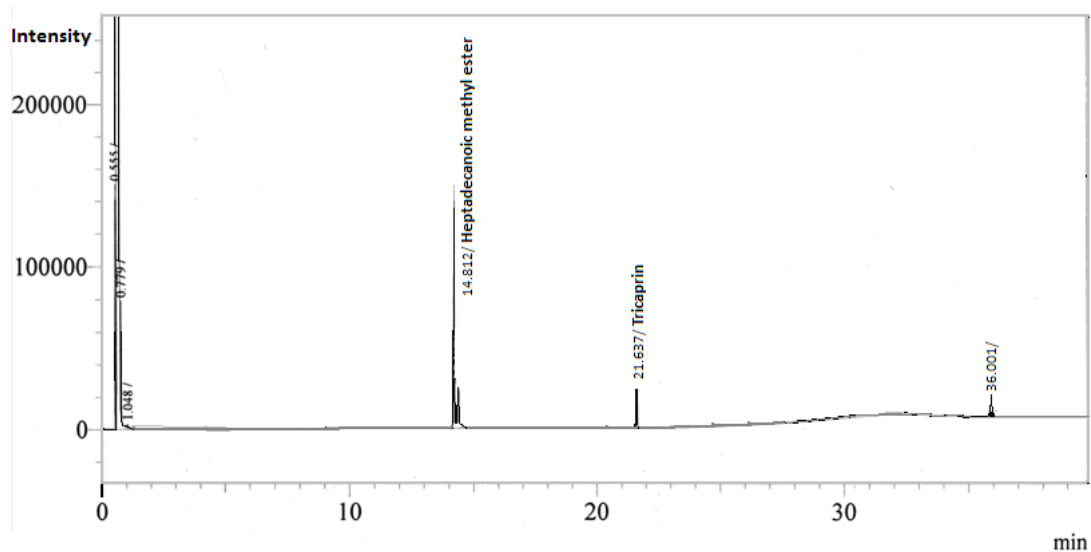
ภาพผนวกที่ ค3 โครมาโตแกรมที่นำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 9.72 มิลลิกรัม



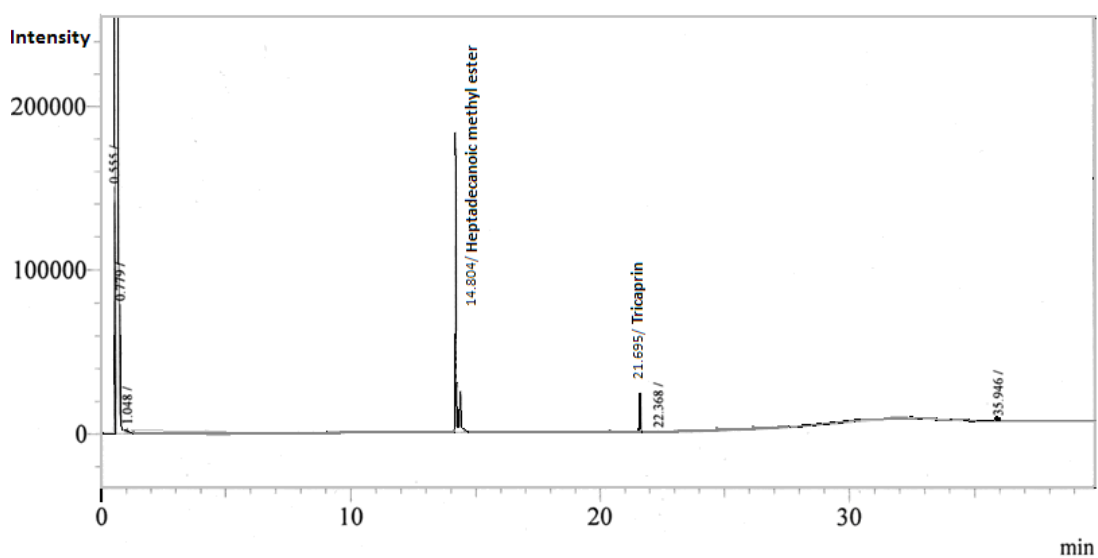
ภาพผนวกที่ ค4 โครมาโตแกรมที่นำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 19.44 มิลลิกรัม



ภาพผนวกที่ ค5 โครมาโตแกรมที่นำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 29.16 มิลลิกรัม



ภาพผนวกที่ ค6 โครมาโตแกรมที่นำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 38.90 มิลลิกรัม



ภาพผนวกที่ ค7 โครมาโตแกรมที่นำหนักของเฮปตะเดคาโนอิกเมทิลเอสเทอร์ 48.60 มิลลิกรัม

ภาคผนวก ค2 การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในไบโอดีเซลตัวอย่าง

เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในไบโอดีเซลตัวอย่างวิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน EN14105:2003 ตัวอย่างโครมาโตแกรมและวิธีการคำนวณหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่างไบโอดีเซลที่สภาวะอุณหภูมิของปฏิกิริยาคือ 30°ซ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 6:1 และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็นร้อยละ 30 จะได้โครมาโตแกรมเป็นดังภาพผนวกที่ ค7

$$\text{น้ำหนักของไบโอดีเซลตัวอย่าง} = 49.28 \text{ mg}$$

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟเมทิลเอสเทอร์} = 1,208,802$$

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟไตรแคปรีน} = 6,169$$

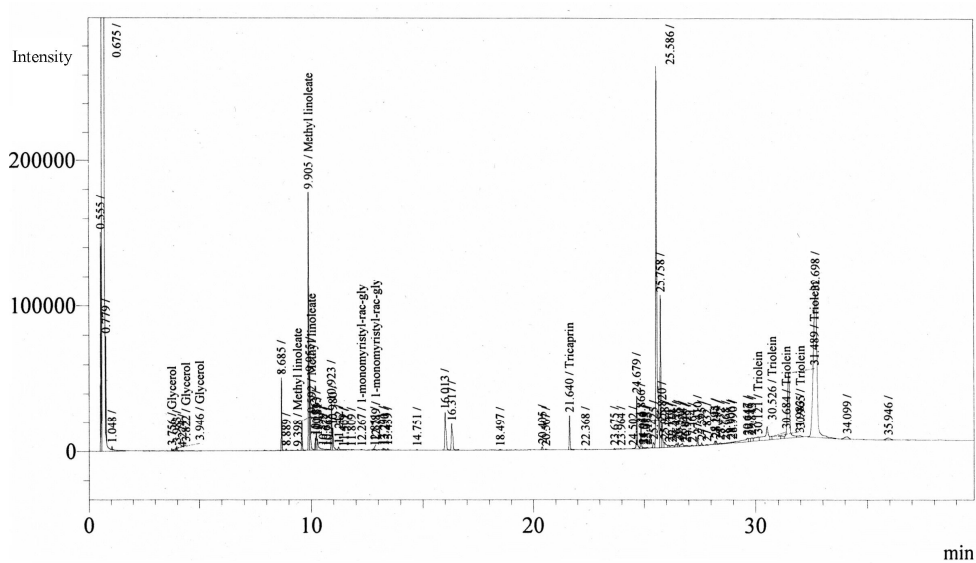
$$\text{พื้นที่ใต้กราฟเมทิลเอสเทอร์/ไตรแคปรีน} = 195.95$$

น้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่าง

$$\begin{aligned} W_{FAME} &= 0.0681 \times \left(\frac{1208802}{6169} \right) + 0 \\ &= 13.34 \text{ mg} \end{aligned}$$

ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่าง (*FAME*)

$$\begin{aligned} FAME &= \frac{13.34}{49.28} \times 100 \\ &= 27.07 \end{aligned}$$



ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์การถดถอยสำหรับการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman
และการออกแบบการทดลองพื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken

ภาคผนวก ง1 การวิเคราะห์การถดถอยสำหรับการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

การออกแบบการทดลองถูกใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและเมทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนเม็ดโคโคซาน ด้วยวิธีห่อหุ้ม ทั้งนี้รูปแบบสมการถดถอยของการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman เป็นดังนี้ (Cochran and Cox, 1997)

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

จากข้อมูลการทดลองตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman ดังนี้

ตารางผนวกที่ ง1 ผลการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman

No.	ξ_1	ξ_2	ξ_3	ξ_4	ξ_5	FAME
1	50	6.0 : 1	50	0	0	12.38
2	50	1.5 : 1	50	10	0	1.20
3	30	1.5 : 1	10	0	0	10.16
4	30	6.0 : 1	50	10	6	25.51
5	50	6.0 : 1	10	0	6	1.10
6	30	1.5 : 1	50	0	6	12.30
7	30	6.0 : 1	10	10	0	13.22
8	50	1.5 : 1	10	10	6	2.50

เมื่อ ξ_1 = อุณหภูมิ (°C), ξ_2 = อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน, ξ_3 = ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง, ξ_4 = ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำละลายร่วม, ξ_5 = ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำ
 FAME = ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์

สมการเมตริกซ์ถูกใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์ของสมการใช้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับร้อยละโดยนำหน้าของเมทริกซ์ในสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สามารถหาได้จากสมการ (วิจิตร, 2543)

$$\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'Y$$

$$X = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

$$Y = \begin{bmatrix} 12.38 \\ 1.20 \\ 10.16 \\ 25.51 \\ 1.10 \\ 12.30 \\ 13.22 \\ 2.50 \end{bmatrix}$$

จะได้

$$\hat{\beta} = (X'X)^{-1} X'Y = \begin{bmatrix} 9.147 \\ 3.905 \\ -4.864 \\ 1.198 \\ 1.450 \\ 3.683 \\ -0.944 \\ 2.209 \end{bmatrix}$$

ดังนั้นจะได้สมการถดถอยมีรูปแบบดังนี้

$$\begin{aligned} FAME = & 9.147 + 3.905 MO - 4.864 T + 1.198 W + 1.450 CS \\ & + 3.683 IM - 0.944 MO \times W + 4.418 MO \times IM \end{aligned}$$

เนื่องจากการวิเคราะห์ทางสถิติของการออกแบบการทดลองแบบ Plankett-Burman แสดงให้เห็นว่าเฉพาะอุณหภูมิของปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ด้วยเหตุนี้สมการถดถอยอาจลดรูปได้เป็น

$$FAME = 9.147 + 3.905 MO - 4.864 T + 3.683 IM$$

ภาคผนวก ง2 การวิเคราะห์การถดถอยสำหรับการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

การออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken ถูกใช้ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆต่อการผลิตไบโอดีเซล สมการเมทริกซ์ถูกใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์ของสมการ ใช้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้รูปแบบสมการถดถอยของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken เป็นดังนี้

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

ตารางผนวกที่ ง2 ผลการทดลองจากการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

No.	ξ_1	ξ_2	ξ_3	FAME
1	30	6.0 : 1	30	27.07
2	30	1.5 : 1	30	13.74
3	50	1.5 : 1	30	6.22
4	40	1.5 : 1	10	6.89
5	40	6.0 : 1	50	19.86
6	50	3.75 : 1	10	3.75
7	50	3.75 : 1	50	8.83
8	50	6.0 : 1	30	10.70
9	40	3.75 : 1	30	9.74
10	30	3.75 : 1	50	20.89
11	30	3.75 : 1	10	17.18
12	40	3.75 : 1	30	10.80
13	40	1.5 : 1	50	11.72
14	40	3.75 : 1	30	10.44
15	40	6.0 : 1	10	6.44

เมื่อ ξ_1 = อุณหภูมิ (°C) ξ_2 = อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน
 ξ_3 = ร้อยละโดยน้ำหนักของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สามารถหาได้จากสมการ

$$\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'Y$$

จะได้

$$X = \begin{bmatrix} 1 & -1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & 0 \end{bmatrix}$$

$$Y = \begin{bmatrix} 27.07 \\ 13.74 \\ 6.22 \\ 6.89 \\ 19.86 \\ 3.75 \\ 8.83 \\ 10.70 \\ 9.74 \\ 20.89 \\ 17.18 \\ 10.80 \\ 11.72 \\ 10.44 \\ 6.44 \end{bmatrix}$$

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} 64.5719 \\ 1.9933 \\ -2.5342 \\ -0.0073 \\ 0.2593 \\ 0.0279 \\ -0.0011 \\ -0.0983 \\ -0.0983 \\ 0.0467 \end{bmatrix}$$

จะได้สมการถดถอยมีรูปแบบเป็น

$$\begin{aligned} FAME = & 64.5719 + 1.9933 MO - 2.5342 T \\ & - 0.0073 IM + 0.2593 MO^2 + 0.0279 T^2 \\ & - 0.0011 IM^2 - 0.0983 T \times MO \\ & + 0.0017 T \times IM + 0.0467 MO \times IM \end{aligned}$$

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ความสมรูปของสมการในการออกแบบการทดลอง
พื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken

ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ความสมรูปของสมการในการออกแบบการทดลอง
พื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken

การออกแบบการทดลองพื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken มีข้อดีประการ
หนึ่งคือมีการทดสอบความสมรูปของสมการที่ได้ โดยการทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลางของการ
ทดลอง ($T = 40^{\circ}\text{C}$, $MO = 3.75:1$ และ $IM = 30$) โดยทดสอบความสมรูปของสมการเป็นดังนี้

H_0 = ไม่มีความไม่สมรูประหว่างข้อมูลการทดลองกับสมการ

H_1 = มีความไม่สมรูประหว่างข้อมูลการทดลองกับสมการ

การทดสอบความสมมติฐานถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์นี้ โดยผลรวมกำลังสอง
ของความผิดพลาดถูกแบ่งออกเป็นสองส่วนดังนี้ (Box *et.al.*, 1993)

ผลรวมกำลังสองของความผิดพลาดรวม = ผลรวมกำลังสองของความไม่สมรูปของสมการ
+ ผลรวมกำลังสองของความผิดพลาดจากการทดลอง

$$SSE = SS_{LOF} + SS_{PE}$$

นั่นคือ

$$SS_{LOF} = SSE - SS_{PE}$$

ตารางผนวก จ1 การทดสอบความไม่สมบูรณ์ของแบบจำลอง และ ข้อมูลการทดลอง

No.	T	MO	IM	y_i	$\hat{y}_i$
1*	40	3.75	30	9.74	10.33
2	30	1.5	30	13.74	15.23
3	30	3.75	10	17.18	15.82
4	50	3.75	10	3.75	2.79
5*	40	3.75	30	10.8	10.33
6	30	3.75	50	20.89	21.85
7	50	1.5	30	6.22	7.31
8	40	6	10	6.44	8.89
9	50	3.75	50	8.83	10.19
10	40	1.5	10	6.89	6.76
11	50	6	30	10.7	9.21
12	40	1.5	50	11.72	9.27
13	30	6	30	27.07	25.98
14	40	6	50	19.86	19.81
15*	40	3.75	30	10.44	10.33

หมายเหตุ * คือการทดลองที่ตำแหน่งกึ่งกลาง

y_i = ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์จากการทดลอง

$\hat{y}_i$ = ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์จากแบบจำลอง

$$\begin{aligned}
SSE &= \sum (y_i - \hat{y}) \\
&= [(9.74-10.33)^2 + (13.74-15.23)^2 + \dots + (27.07-25.98)^2 \\
&\quad + (19.68-19.81)^2 + (10.44-10.33)^2] \\
&= 24.927
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
SS_{PE} &= \sum_{Center} (y_i - \hat{y}) \\
&= [(9.74-10.33)^2 + (10.8-10.33)^2 + (10.44-10.33)^2] \\
&= 0.5811
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
SS_{LOF} &= \sum (y_i - \hat{y}) - \sum_{Center} (y_i - \hat{y}) \\
&= 24.927 - 0.5811 \\
&= 24.346
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\text{ค่าองศาความอิสระของ } SS_{PE} &= n_c - 1 \\
&= 3 - 1 = 2
\end{aligned}$$

$$\text{ค่าองศาความอิสระของ } SS_{LOF} = n_c = 3$$

$$\begin{aligned}
\text{ค่าองศาความอิสระของ } SSE &= n_c - 1 + n_c \\
&= 3 - 1 + 3 = 5
\end{aligned}$$

ดังนั้นจะได้

$$\begin{aligned}
MSRE &= SSRE / (n_c - 1 + n_c) \\
&= 24.927 / 5 \\
&= 4.985
\end{aligned}$$

$$MS_{LOF} = SS_{LOF} / (n_c)$$

$$\begin{aligned}
 &= 24.346/3 \\
 &= 8.115 \\
 MS_{PE} &= SS_{PE}/(n_c-1) \\
 &= 0.581/2 \\
 &= 0.291
 \end{aligned}$$

จะได้ตารางสรุปค่าสถิติของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken เป็นดังนี้

ตารางผนวก จ2 ค่าสถิติของการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	548.232	548.232	60.915	12.22	0.007
Linear	3	475.118	42.4211	14.140	2.84	0.145
Square	3	35.382	35.3820	11.794	2.37	0.187
Interaction	3	37.732	37.7319	12.577	2.52	0.172
Residual Error	5	24.927	24.9271	4.985		
Lack-of-Fit	3	24.346	24.3460	8.115	27.93	0.035
Pure Error	2	0.581	0.5811	0.291		
Total	14	573.159				

ภาคผนวก จ

การหาช่วงความเชื่อมั่นของร้อยละโดยใช้น้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตด้วยสภาวะที่เหมาะสม

ภาคผนวก ฉ1 การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันในไบโอดีเซลตัวอย่างเพื่อยืนยัน
สถานะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ตัวอย่างที่ 1

น้ำหนักของไบโอดีเซลตัวอย่าง = 42.28 mg

พื้นที่ใต้กราฟเมทิลเอสเทอร์ = 8,590,263

พื้นที่ใต้กราฟไตรแคปรีน = 55579

พื้นที่ใต้กราฟเมทิลเอสเทอร์/ไตรแคปรีน = 154.56

น้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่าง

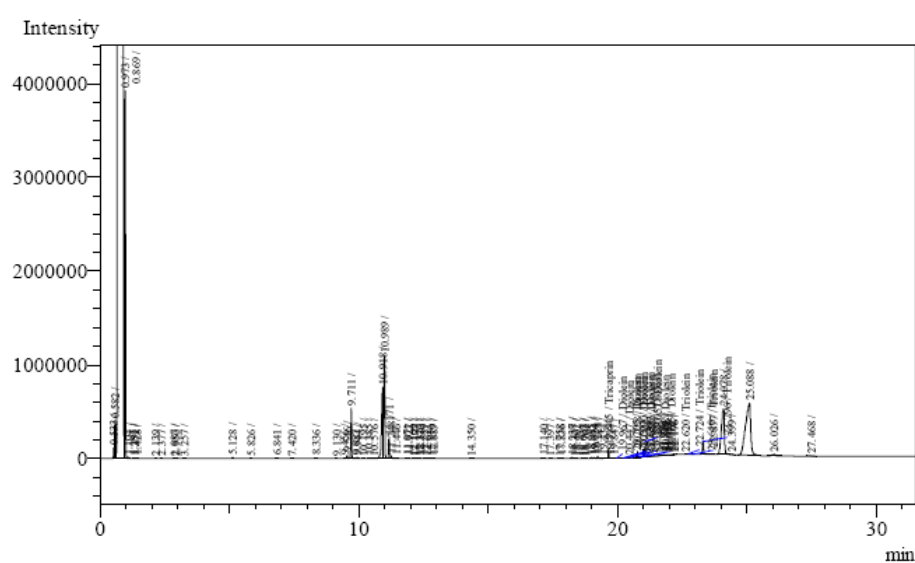
$$W_{FAME} = 0.0681 \times \left(\frac{8590263}{55579} \right) + 0$$

$$= 10.53 \text{ mg}$$

ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่าง (FAME)

$$FAME = \frac{10.53}{42.28} \times 100$$

$$= 24.9$$



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	0.533	211448	111222	0.000				
2	0.582	1050344	394510	0.000		V		
3	0.869	3760713188	34003127	0.000		V		
4	0.973	8197239	3892678	0.000		V		
5	1.104	19581	8003	0.000		V		
6	1.291	2538	2043	0.000				
7	1.352	2567	1906	0.000				
8	1.428	8195	2963	0.000		V		
9	2.139	2804	1598	0.000				
10	2.377	1254	698	0.000				
11	2.887	1387	791	0.000				
12	2.950	1351	888	0.000				
13	3.257	1898	1079	0.000				
14	5.128	22266	13482	0.000				
15	5.826	1361	882	0.000				
16	6.841	6052	3447	0.000				
17	7.420	1069	645	0.000				
18	8.336	10176	3761	0.000				
19	9.130	2248	961	0.000				
20	9.456	13060	7281	0.000				
21	9.546	67694	30125	0.000		V		
22	9.711	1049065	526674	0.000		V		
23	9.887	10039	4846	0.000		V		
24	9.944	20047	9826	0.000		V		
25	10.195	5277	1944	0.000				
26	10.385	12872	6141	0.000				
27	10.576	3855	1693	0.000				
28	10.918	2835009	759529	0.000				
29	10.989	3997756	1084694	0.000		V		
30	11.171	557056	215873	0.000		V		
31	11.248	70623	26903	0.000		V		
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
32	11.446	10008	3984	0.000		V		
33	11.871	13013	5581	0.000				
34	11.927	9015	4082	0.000		V		
35	12.109	2832	1285	0.000				
36	12.177	3990	1487	0.000		V		
37	12.327	5464	2430	0.000				
38	12.370	5574	2592	0.000		V		
39	12.529	7949	3164	0.000				
40	12.621	5621	1785	0.000		V		
41	12.819	4894	2052	0.000				
42	12.889	10467	4443	0.000		V		
43	14.350	4175	1576	0.000				
44	17.140	18171	5310	0.000				
45	17.397	4538	2169	0.000				
46	17.758	1477	755	0.000				
47	17.836	4454	2358	0.000				
48	18.237	12624	7674	0.000				
49	18.327	1693	905	0.000				
50	18.402	1394	757	0.000		V		
51	18.632	2421	1520	0.000				
52	18.703	2281	1382	0.000		V		
53	18.762	1810	1092	0.000		V		
54	18.985	11337	6656	0.000				
55	19.074	11513	7233	0.000				
56	19.124	2723	1331	0.000		V		
57	19.224	33934	20535	0.000		V		
58	19.434	3481	1345	0.000				
59	19.645	55579	109694	0.000	mg		5	Tricaprin
60	19.717	1825	1085	0.000		V		
61	19.847	2556	1485	0.000				
62	19.967	1431	985	0.000	mg		3	Diolein
63	20.205	1446	959	0.000	mg		3	Diolein
64	20.383	3214	1599	0.000	mg		3	Diolein
65	20.447	5203	2438	0.000	mg	V	3	Diolein
66	20.501	1675	516	0.000	mg	V	3	Diolein

ภาพผนวกที่ ๑1 โครมาโตแกรมของไบโอดีเซลสำหรับยืนยันสถานะที่เหมาะสม

($T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 1:6$ $IM = 30$) ตัวอย่างที่ 1

ตัวอย่างที่ 2

น้ำหนักของไบโอดีเซลตัวอย่าง = 49.24 mg

พื้นที่ใต้กราฟเมทิลเอสเทอร์ = 8,652,494

พื้นที่ใต้กราฟไตรแคปรีน = 51867

พื้นที่ใต้กราฟเมทิลเอสเทอร์/ไตรแคปรีน = 135.114

น้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่าง

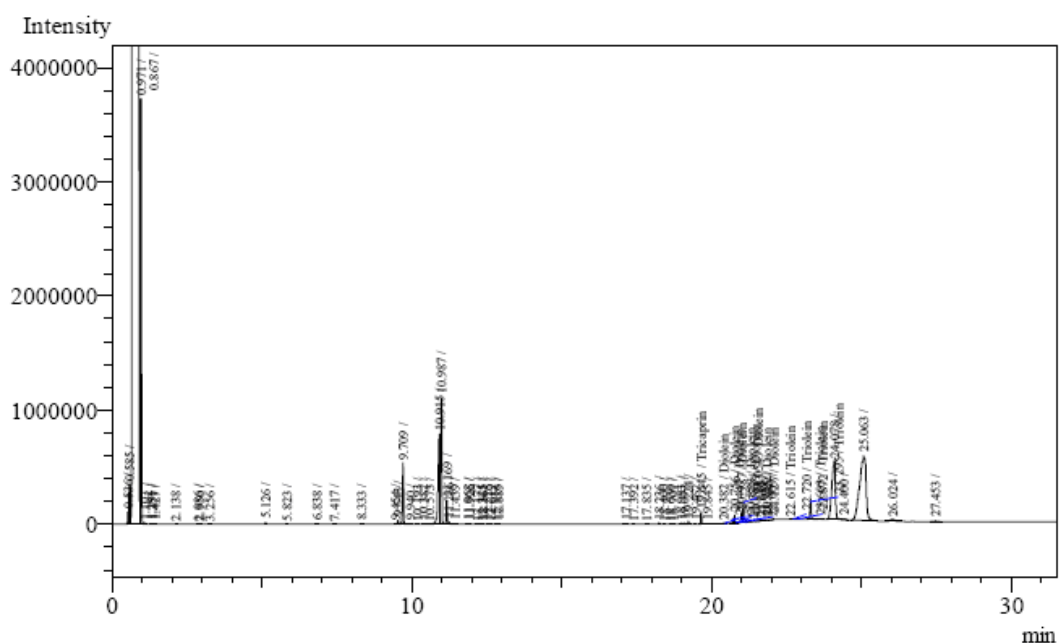
$$W_{FAME} = 0.0681 \times \left(\frac{8652494}{51867} \right) + 0$$

$$= 11.36 \text{ mg}$$

ร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสารตัวอย่าง (*FAME*)

$$FAME = \frac{11.36}{49.24} \times 100$$

$$= 23.07$$



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
1	0.536	199369	106540	0.000			
2	0.585	926692	340278	0.000	V		
3	0.867	3709870887	31635726	0.000	V		
4	0.971	7717583	3663262	0.000	V		
5	1.103	16373	6862	0.000	V		
6	1.291	2109	1706	0.000			
7	1.351	2341	1864	0.000			
8	1.427	7973	2628	0.000	V		
9	2.138	2813	1589	0.000			
10	2.886	1375	789	0.000			
11	2.950	1329	874	0.000			
12	3.256	1797	1079	0.000			
13	5.126	22037	13213	0.000			
14	5.823	1321	879	0.000			
15	6.838	6368	3632	0.000			
16	7.417	1080	646	0.000			
17	8.333	8110	3711	0.000			
18	9.454	7593	4075	0.000			
19	9.543	63693	29909	0.000	V		
20	9.709	1056044	530391	0.000	V		
21	9.940	17232	7157	0.000			
22	10.193	4004	1828	0.000			
23	10.382	10044	5002	0.000			
24	10.573	3359	1533	0.000			
25	10.915	2986132	780901	0.000			
26	10.987	3961118	1095367	0.000	V		
27	11.169	535434	208061	0.000	V		
28	11.236	50073	18869	0.000	V		
29	11.439	7549	2788	0.000	V		
30	11.868	11342	5021	0.000			
31	11.926	8279	3634	0.000	V		
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
32	12.177	2473	985	0.000			
33	12.325	6267	2610	0.000			
34	12.365	5607	2735	0.000	V		
35	12.525	8078	3196	0.000			
36	12.619	4288	1578	0.000	V		
37	12.816	5216	2099	0.000			
38	12.885	10473	4508	0.000	V		
39	17.137	18240	5210	0.000			
40	17.392	4679	2368	0.000			
41	17.835	4292	2319	0.000			
42	18.236	12860	7851	0.000			
43	18.400	1199	705	0.000			
44	18.630	2606	1595	0.000			
45	18.701	2213	1389	0.000	V		
46	18.983	11559	7119	0.000			
47	19.073	12366	7477	0.000			
48	19.224	35894	21490	0.000	V		
49	19.462	1324	875	0.000			
50	19.645	51867	106389	0.000 mg		5	Tricaprin
51	19.845	2331	1373	0.000			
52	20.382	1813	1328	0.000 mg		3	Dioclein
53	20.447	3374	2133	0.000 mg	V	3	Dioclein
54	20.689	64203	30922	0.000 mg		3	Dioclein

ภาพผนวกที่ ๒ โครมาโตแกรมของไบโอดีเซลสำหรับยืนยันสถานะที่เหมาะสม
($T = 30^{\circ}$ ซ $MO = 1:6$ $IM = 30$) ตัวอย่างที่ 2

Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
1	0.532	236101	126477	0.000			
2	0.584	977306	359049	0.000	V		
3	0.866	3712759748	33346878	0.000	V		
4	0.971	8211473	3895312	0.000	V		
5	1.101	18988	8074	0.000	V		
6	1.288	2759	2122	0.000			
7	1.350	2560	1958	0.000			
8	1.425	8605	3046	0.000	V		
9	2.137	2711	1564	0.000			
10	2.885	1456	823	0.000			
11	2.948	1296	862	0.000			
12	3.255	2249	1173	0.000			
13	4.796	1007	648	0.000			
14	5.125	23116	13873	0.000			
15	5.822	1290	848	0.000			
16	6.837	5966	3374	0.000			
17	8.333	7106	3304	0.000			
18	9.454	5086	2853	0.000			
19	9.542	60392	28088	0.000	V		
20	9.707	1015490	503283	0.000	V		
21	9.889	2649	1223	0.000	V		
22	9.936	12891	6007	0.000	V		
23	10.192	3787	1746	0.000			
24	10.381	6572	3283	0.000			
25	10.572	3821	1724	0.000			
26	10.912	2872996	749965	0.000			
27	10.983	3888173	1037738	0.000	V		
28	11.075	18820	5317	0.000	V		
29	11.167	484332	202663	0.000	V		
30	11.232	34028	14808	0.000	V		
31	11.436	5333	2197	0.000			
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit Mark	ID#	Cmpd Name
32	11.867	11308	4888	0.000			
33	11.925	8033	3652	0.000	V		
34	12.178	2539	1048	0.000			
35	12.321	5647	2415	0.000			
36	12.365	6226	2766	0.000	V		
37	12.524	7043	2943	0.000	V		
38	12.617	3924	1513	0.000	V		
39	12.815	4800	1981	0.000			
40	12.884	9956	4279	0.000	V		
41	17.134	17277	5082	0.000			
42	17.391	4419	2136	0.000			
43	17.833	4166	2273	0.000			
44	18.234	12751	7647	0.000			
45	18.399	1144	682	0.000			
46	18.629	2529	1551	0.000			
47	18.701	2205	1373	0.000	V		
48	18.982	11376	6733	0.000			
49	19.071	13405	7510	0.000			
50	19.222	34487	21092	0.000	V		
51	19.643	56760	107503	0.000	mg	5	Tricaprin
52	19.844	2368	1422	0.000			
53	20.383	1790	1309	0.000	mg	3	Diolein
54	20.446	3535	2116	0.000	mg V	3	Diolein

ภาพผนวกที่ 3 โครมาโตแกรมของไบโอดีเซลสำหรับยืนยันสถานะที่เหมาะสม

($T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 1:6$ $IM = 30$) ตัวอย่างที่ 3

ภาคผนวก ฉ2 การทดสอบค่าเฉลี่ยของร้อยละโดยนํ้าหนักของเมทิลเอสเทอร์ในไบโอดีเซลตัวอย่าง
ที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมด้วยเอินไซม์ไลเปสที่ถูกต้อง

ค่าเฉลี่ยของร้อยละโดยนํ้าหนักของเมทิลเอสเทอร์จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากการ
ออกแบบการทดลองพื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken สามารถหาได้จากสมการที่ 17 ที่มี
การแทนตัวแปร $MO = 6$ $T = 30$ $IM = 50$ จะได้

$$\begin{aligned} FAME &= 64.5719 + 1.9933 MO - 2.5342 T \\ &\quad - 0.0073 IM + 0.2593 MO^2 + 0.0279 T^2 \\ &\quad - 0.0011 IM^2 - 0.0983 T \times MO \\ &\quad + 0.0017 T \times IM + 0.0467 MO \times IM \end{aligned} \quad (17)$$

$$\begin{aligned} FAME &= 64.5719 + (1.9933 \times 6) - (2.5342 \times 30) \\ &\quad (-0.0073 \times 50) + (0.2593 \times 6^2) + (0.0279 \times 30^2) \\ &\quad (-0.0011 \times 50^2) - (0.0983 \times 30 \times 6) \\ &\quad (+0.0017 \times 30 \times 50) + (0.0467 \times 6 \times 50) \\ &= 30.7\% \end{aligned}$$

จากการทดลองยืนยันสภาวะที่เหมาะสมโดยการทำการทดลองผลิตไบโอดีเซลจากนํ้ามันเมล็ดดอก
ทานตะวันจำนวน 3 ครั้งได้ร้อยละโดยนํ้าหนักของเมทิลเอสเทอร์เป็นดังนี้

ตารางผนวก ฉ1 ค่าร้อยละโดยนํ้าหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทดลองในสภาวะที่เหมาะสม
ที่ได้จากการออกแบบการทดลองพื้นผิวผลตอบสนองแบบ Box-Behnken

ตัวอย่างที่	ร้อยละโดยนํ้าหนักของเมทิลเอสเทอร์
1	24.90
2	23.07
3	21.34

การทดสอบทำได้โดยการทดสอบทางสถิติ จากกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก ($n < 30$) โดยมีสมมติฐานคือค่าเฉลี่ยของร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ในสถานะที่เหมาะสม ($T = 30^{\circ}\text{C}$ $MO = 1:6$ $IM = 30$) เป็นดังนี้

$$H_0 : \mu = 30.7$$

$$H_1 : \mu \neq 30.7$$

ซึ่งใช้ค่าสถิติ t สำหรับทดสอบดังนี้ (สายชล, 2551)

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

ที่ค่าองศาความเป็นอิสระ ($n-1$) เป็นค่าทดสอบ โดยที่

$$\bar{x} = \frac{24.90 + 23.07 + 21.34}{3} = 23.10$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}{n-1}} = \sqrt{\frac{1607.63 - \frac{(69.31)^2}{3}}{3-1}} = 1.78$$

ดังนั้นจะได้ค่าสถิติ t ดังนี้

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}} = \frac{23.10 - 30.7}{(1.78 / \sqrt{3})} = -7.39$$

จะยอมรับ H_0 เมื่อ

$$t \geq -t_{\frac{\alpha}{2}}$$

ที่ระดับนัยสำคัญ 98.5% $\alpha = 0.015$ $\alpha/2 = 0.0075$ $-t_{\frac{\alpha}{2}} = -8.073$

โดยที่ $-7.39 > -8.073$

จึงสรุปได้ว่าสามารถยอมรับ H_0 ได้ที่ระดับนัยสำคัญ 98.5% โดยช่วงค่าเฉลี่ยร้อยละโดยน้ำหนักของเมทิลเอสเทอร์ที่ระดับนัยสำคัญ 98.5% สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\bar{x} - t_{\frac{\alpha}{2}, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + t_{\frac{\alpha}{2}, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

เมื่อ

$$\bar{x} = 23.1 \quad s = 1.78 \quad t_{\frac{\alpha}{2}} = 8.073 \quad n = 3$$

ดังนั้นจะได้

$$23.1 - (8.073) \frac{1.78}{\sqrt{3}} < \mu < 23.1 + (8.073) \frac{1.78}{\sqrt{3}}$$

$$14.81 < \mu < 31.40$$

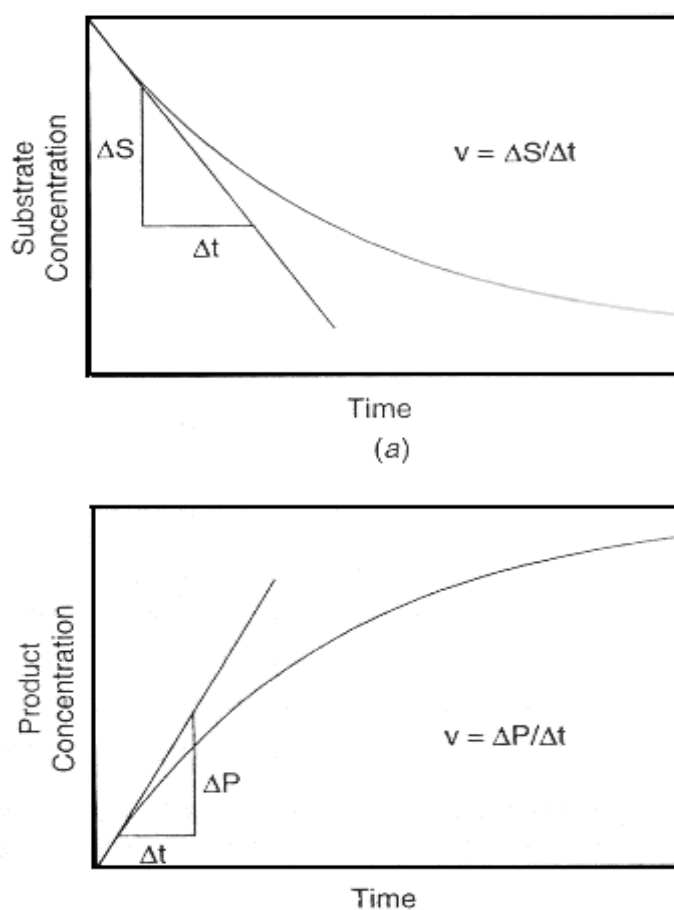
ดังนั้นจะได้ค่าเฉลี่ยของร้อยละโดยน้ำหนักเมทิลเอสเทอร์ ในไบโอดีเซลตัวอย่าง อยู่ในช่วงร้อยละ 14.81 – 31.40 ที่ระดับความเชื่อมั่น 98.5%

ภาคผนวก ข

การหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น

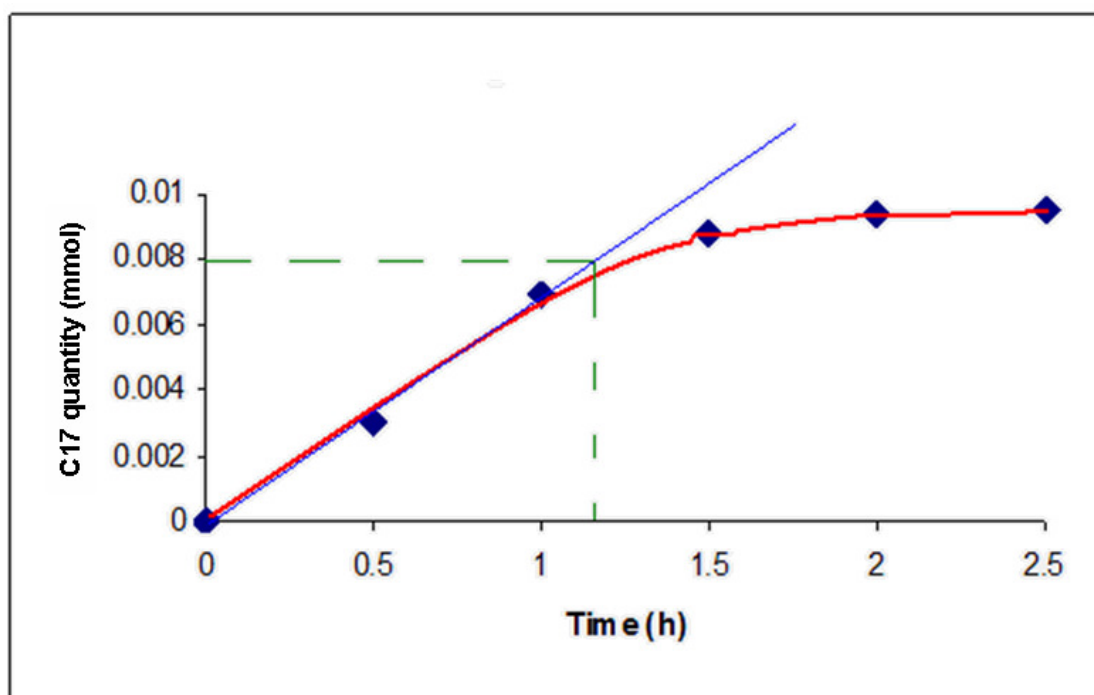
ภาพผนวก ข การหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น

การศึกษาข้อมูลทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์ นิยมหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น (Initial Rate Method) ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องมีการติดตามค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่หายไประหว่างปฏิกิริยา หรือการหาความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยา โดยค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นคือค่าความชันที่ใกล้จุดเริ่มต้นบนกราฟของความเข้มข้นของสารตั้งต้น หรือสารผลิตภัณฑ์กับเวลา ดังแสดงในภาพผนวกที่ ข1



ภาพผนวกที่ ข1 วิธีการหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์

ตัวอย่างการคำนวณหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ 10 มิลลิโมลาร์ของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ 37.5 มิลลิโมลาร์ของเมทานอล



ภาพผนวกที่ ข2 วิธีการหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ 10 มิลลิโมลของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และ 37.5 มิลลิโมลของเมทานอล ที่ 30°ซ

$$\begin{aligned}
 \text{ความชันของกราฟ} &= \text{อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น} \\
 &= 0.0079/1.2 \\
 &= 6.59 \times 10^{-3} \text{ มิลลิโมลต่อชั่วโมง}
 \end{aligned}$$

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายกิตติพล กสิภาร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 สิงหาคม 2518
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	งานวิจัยการผลิตน้ำมันชีวภาพจากจุลินทรีย์ งานวิจัยการผลิตพลาสติกชีวภาพจากจุลินทรีย์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนโครงการพัฒนาอาจารย์จาก สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา