



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มและเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มกับเมธานอล

โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa*

(Hydrolysis of palm oil and methyl-esterification of palm oil fatty acid  
by *Candida rugosa* lipase)

จัดทำโดย

นางสาวสุรชนี หิมารัตน์ รหัสนักศึกษา 44040778

นายอภิสิทธิ์ กลั่นบางแก้ว รหัสนักศึกษา 44040779

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

24, 3, 2548

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มและเอสเตอร์ฟิเคชันของกรดไขมันจาก  
น้ำมันปาล์มกับเมธานอลโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa*  
(Hydrolysis of palm oil and methyl-esterification of palm oil fatty acid  
by *Candida rugosa* lipase)

จัดทำโดย

นางสาวสุรัชณี หิมารัตน์ รหัสนักศึกษา 44040778

นายอภิสิทธิ์ กลั่นบางแก้ว รหัสนักศึกษา 44040779

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิริโรดม



T096875

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

ป.พ.

๗856๘

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

๘547

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....96875

รับเดือนปี.....5 Jun 2009

รับเดือนปี.....

รายงานฉบับนี้จัดทำขึ้นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

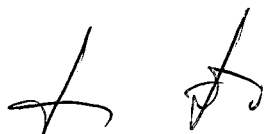
นางสาวสุรชนี หิมารัตน์ และนายอภิสิทธิ์ กลั่นบางแก้ว. 2547 : ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มและเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มกับเมธานอลโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* (Hydrolysis of palm oil and methyl-esterification of palm oil fatty acid by *Candida rugosa* lipase) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

จากการศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหาร และปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดกับเมธานอลโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* พบว่าปริมาณน้ำและปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสคือ 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา และ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา ตามลำดับ ซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดมีค่าประมาณ 96% แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดี ในขณะที่ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดและเมธานอลนั้น การใช้ปริมาณเมธานอลในช่วง 10-50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา และปริมาณเอนไซม์ในช่วง 200-500 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา ให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันต่ำกว่า 20% การใช้เกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ในการควบคุม water activity ( $a_w$ ) เพื่อให้ปริมาณน้ำในระบบคงที่ มีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และจากการทดลองใช้กรดโอเลอิกเป็นสารตั้งต้นเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* พบว่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มที่เตรียมได้เป็นสารตั้งต้น ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันกับเมธานอลภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

สุรชนี หิมารัตน์  
อภิสิทธิ์ กลั่นบางแก้ว

ลายมือนักศึกษา



(ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรตม)

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

24 / ส.ค. / 48

วัน / เดือน / ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ทั้งนี้คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรดม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษฉบับนี้ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่ามาแนะนำ ให้คำปรึกษาและดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างมาก และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งคำแนะนำต่าง ๆ ซึ่งทำให้การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณแม่ คุณแม่และครอบครัวของคณะผู้จัดทำที่คอยให้กำลังใจและกำลังใจผู้ต่ออุปสรรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการทำปัญหาพิเศษจนสำเร็จลงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณที่นักวิทยาศาสตร์ห้อง B305 และ D327 ที่คอยให้เบิกและยืมอุปกรณ์ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ สาขาเทคโนโลยีการหมัก รุ่นที่ 8 ทั้ง 23 คน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีในการทำปัญหาพิเศษจนสำเร็จลงไปได้ด้วยดี และให้ความเป็นเพื่อนที่คิดตลอด 4 ปี คอยรับฟัง ช่วยเหลือ แก้ไขปัญหา พร้อมทั้งให้คำแนะนำในเรื่องต่าง ๆ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณมาก ๆ นอกจากนี้ขอขอบคุณน้องรหัสผู้นำรักของคณะผู้จัดทำทุกคนที่คอยช่วยเหลือยกของและให้กำลังใจคณะผู้จัดทำเสมอ

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณตัวเองที่ทำงานสำเร็จจนได้ การทำปัญหาพิเศษเป็นบททดสอบชีวิตอีกด้านจริง ๆ ขอขอบคุณตัวเองที่สู้ ออกทนและฝ่าฟันอุปสรรคจนปัญหาพิเศษสำเร็จลงได้ด้วยดี ขอขอบคุณทุกคนมาก ๆ

นางสาวสุรัชณี หิมารัตน์

นายอภิสิทธิ์ กลั่นบางแก้ว

24 มีนาคม 2548



## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 วิธีการทดลอง	29
3.4.1 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Candida rugosa</i>	29
3.4.2 การเตรียมกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มที่ เหลือทิ้งจากการทอดอาหาร โดยวิธี saponification	30
3.4.3 วิธีหาค่า acid value (AV)	30
3.4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมัน- ปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Candida rugosa</i>	31
3.4.4.1 ศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส	31
3.4.4.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส	31
3.4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	31
3.4.5.1 การเตรียมกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมัน- ปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหาร	31
3.4.5.2 การศึกษาปริมาณเมธานอลที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิ- เคชัน	32
3.4.5.3 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	32
3.4.5.4 การศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) ต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	33
3.4.5.5 การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	33
3.4.5.6 การศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมธานอล	34
<b>บทที่ 4 ผลการทดลอง</b>	
4.1 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Candida rugosa</i>	35
4.2 การหาค่า acid value (AV)	36
4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดย เอนไซม์ไลเปสจาก <i>Candida rugosa</i>	37
4.3.1 ศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส	37
4.3.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส	38
4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	41
4.4.1 การศึกษาปริมาณเมธานอลที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4.2 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	42
4.4.3 การศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) ต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	44
4.4.4 การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	45
4.4.5 การศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมธานอล	46
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ</b>	
5.1 สรุปผลการทดลอง	49
5.2 ข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	53
ประวัติผู้เขียน	71



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบกรดไขมันหลักของน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ	5
2.2	ปฏิกิริยาเมธานอลิซิสของน้ำมันพืชโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปชนิดต่าง ๆ	15
2.3	การยับยั้งปฏิกิริยาเมธานอลิซิสของน้ำมันพืช โดยแปรปริมาณน้ำ	17
2.4	ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันแบบสองขั้นตอนของกรดไขมันเหลือทิ้ง	25
4.1	ค่า acid value (AV) ของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร	36



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การผลิตไบโอดีเซลโดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง TAG และเมธานอล	6
2.2 ปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่สามารถเร่งโดยเอนไซม์ไลเปส	9
2.3 ช่วงเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเมธานอลไลซิสของน้ำมันพืช	10
2.4 ปฏิกิริยาเมธานอลไลซิสโดยใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคในครัวเรือนเป็นวัตถุดิบ	12
2.5 ปฏิกิริยาเมธานอลไลซิสแบบครึ่งคราว 3 ขั้นตอน โดยใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคเป็นวัตถุดิบ	13
2.6 ปริมาณน้ำที่มีผลต่อปฏิกิริยาเมธานอลไลซิสของน้ำมันพืชโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก <i>Candida antarctica</i>	16
2.7 ปริมาณเมธานอลที่มีผลต่อปฏิกิริยาเมธานอลไลซิสของน้ำมันพืช	18
2.8 ช่วงเวลาการเติมเมธานอลในปฏิกิริยาเมธานอลไลซิสของน้ำมันพืช	19
2.9 ปริมาณเอนไซม์ที่มีผลต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันเหลือทิ้ง	21
2.10 ปริมาณเมธานอลที่มีผลต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมัน	22
2.11 การยับยั้งเอนไซม์โดยเมธานอลที่มากเกินไป	23
2.12 การยับยั้งเอนไซม์ไลเปส โดยอุณหภูมิที่ต่างกัน	24
4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Candida rugosa</i>	35
4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยแปรปริมาณน้ำ	37
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร โดยแปรปริมาณน้ำ	38
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยแปรปริมาณเอนไซม์	39
4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร โดยแปรปริมาณเอนไซม์	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยแปรปริมาณเมธานอล	41
4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหารโดยแปรปริมาณเมธานอล	42
4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยแปรปริมาณเอนไซม์	43
4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของสารละลายปฏิกิริยาที่ควบคุม $\alpha_w$ โดยใช้เกลือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	44
4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของปฏิกิริยาที่มีน้ำแตกต่างกัน	46
4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของการศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรด โอเลอิกและเมธานอล	47

## บทที่ 1

### บทนำ

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามคิดค้นหาแหล่งพลังงานใหม่ ๆ เพื่อลดปัญหามลพิษในอากาศอันเนื่องมาจากการเผาผลาญน้ำมันเชื้อเพลิงที่ได้จากปิโตรเลียม ซึ่งแหล่งพลังงานทดแทนที่กำลังได้รับความสนใจมากที่สุดแหล่งหนึ่งคือ ไบโอดีเซล ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงที่ผลิตจากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ ไบโอดีเซลสามารถย่อยสลายโดยกระบวนการทางธรรมชาติ นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่เป็นพิษ และการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ที่ใช้ไบโอดีเซลยังมีสารทำลายสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้ปิโตรเลียมดีเซล ทำให้มีแนวโน้มในการนำไบโอดีเซลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงแทนน้ำมันปิโตรเลียมมากขึ้นในอนาคต

องค์ประกอบของไบโอดีเซลคือ เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน การผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลในปัจจุบันจะใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์หรือน้ำมันที่ใช้แล้วซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร โดยมีกระบวนการผลิต 2 แบบคือ กระบวนการทางเคมี (ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี) และกระบวนการทางเอนไซม์ (ใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) เนื่องจากความยุ่งยากและข้อเสียเปรียบหลายประการของกระบวนการทางเคมีจึงทำให้กระบวนการผลิตโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้รับความสนใจมากขึ้นมีการศึกษากันมากขึ้นในปัจจุบัน

สำหรับกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์นั้นสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาได้หลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับลักษณะของน้ำมันพืชที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ตัวอย่างเช่นการใช้ไลเปสเร่งปฏิกิริยาเมธานอลิซิส (methanolysis) โดยมีน้ำมันในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol, TAG) เป็นสารตั้งต้น หรือการใช้ไลเปสเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของกรดไขมันอิสระจากน้ำมันพืชกับเมธานอล เป็นต้น

ในประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันปาล์มในปริมาณมาก ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารก็มีการใช้น้ำมันปาล์มสำหรับทอดอาหาร ทำให้เกิดน้ำมันเหลือทิ้งในปริมาณสูง ปัญหาพิเศษนี้จึงทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มเหลือทิ้งจากการทอดอาหารรวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมกับการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสดังกล่าวกับเมธานอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ซึ่งจะเป็นแนวทางในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มต่อไป

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และน้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหารด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa*
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และน้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหารกับเมธานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์

### 2.1 ลักษณะทั่วไปของไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลโดยทั่ว ๆ ไปจะเป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (monoalkyl esters) ที่ผลิตได้จากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ มีคุณสมบัติเป็นเชื้อเพลิงประเภทดีเซลเช่นเดียวกับน้ำมันปิโตรเลียม ไบโอดีเซลผลิตได้โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) โดยการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาผ่านการกรองและสกัดเอาไขมันและสิ่งสกปรกออก (degumming) ก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยากับด่างเพื่อกำจัดอนุภาคไขมันอิสระ แล้วจึงผสมรวมกับโมโนไฮดริกแอลกอฮอล์ (monohydric alcohol) โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเข้าร่วมในปฏิกิริยา โดยทั่ว ๆ ไปตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ส่วนใหญ่คือไฮดรอกไซด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ หรืออาจใช้ไฮดรอกไซด์หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเมธานอล การผลิตโดยทั่วไปจะใช้เมธานอลเป็นโมโนไฮดริกแอลกอฮอล์เพราะเป็นแอลกอฮอล์ที่มีราคาไม่แพง ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้สารไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ในน้ำมันถูกเปลี่ยนเป็นสารประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอลอิสระ และเมื่อกลีเซอรอลถูกแยกออกจากผลิตภัณฑ์ที่ได้แล้ว โมเลกุลที่เหลือจะมีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันปิโตรเลียม จะต่างกันที่โมเลกุลของไบโอดีเซลเป็นกลุ่มของไฮโดรคาร์บอนที่ปลอดจากกำมะถัน หรือองค์ประกอบที่ซับซ้อนอื่น ๆ สำหรับกลีเซอรอลที่แยกออกมาเป็นผลพลอยได้ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางค์ ฯลฯ วัตถุประสงค์ของกระบวนการดังกล่าวคือเพื่อช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม ไบโอดีเซลประเภทนี้คือเชื้อเพลิงจากพืชที่รู้จักกันทั่วไป สามารถใช้แทนน้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์ดีเซลระบบบี้มหัวฉีดทุกประเภทโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ ซึ่งอาจใช้ไบโอดีเซลอย่างเดียวกับหรือผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่าง ๆ ก็ได้ (สุพรรณณี ,2544)

### 2.2 วัตถุดิบที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมดีเซลซึ่งมีระบบการทำงานที่รวดเร็ว ปลอดภัย และสะอาดกว่าน้ำมันปิโตรเลียม นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากน้ำมันพืชที่ผ่านการใช้แล้วได้อีกด้วย บริษัท Pacific Biodiesel Inc. ในฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากภัตตาคาร และร้านอาหารทั่วไปที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองในการทอดอาหาร ส่วนประเทศในทวีปยุโรปผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน (ศิริวรรณ , 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตั้งแต่แรกวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซลโดยส่วนมากจะเป็นน้ำมันพืชที่หามาได้ในประเทศนั้น ๆ ซึ่งพืชน้ำมันที่ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดเรพ (rape seed) และน้ำมันเมล็ดทานตะวัน ส่วนในยุโรปใช้น้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน เมล็ดเรพ หรือน้ำมันที่เหลือจากการปรุงอาหารแล้ว และในภูมิภาคเมืองร้อนจะใช้น้ำมันจากปาล์มและมะพร้าว สำหรับประเทศไทยมีการเพาะปลูกพืชน้ำมันหลายชนิดใช้ในการบริโภค เช่น ถั่วเหลือง ปาล์ม น้ำมัน ถั่วลิสง มะพร้าว ทุเรียน ฯลฯ ในบรรดาพืชน้ำมันทั้งหมด ปาล์มน้ำมันมีปริมาณผลผลิตสูงและราคาถูกจึงเหมาะสมในการนำมาผลิตไบโอดีเซล แต่ในการผลิตควรคำนึงถึงปริมาณและความต้องการใช้น้ำมันในการบริโภคและในอุตสาหกรรมด้วย เช่น ในปี พ.ศ. 2545 มีผลผลิตปาล์มน้ำมัน 4 ล้านตัน หรือน้ำมันปาล์ม 68,000 ตันต่อเดือน ตลาดมีความต้องการใช้ 55,000 ตันต่อเดือน จะเหลือน้ำมันปาล์มส่วนเกิน 13,000 ตันต่อเดือน นั่นคือปริมาณของน้ำมันที่จะนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์ไม่มากนัก ดังนั้นจึงต้องมีการวางแผนให้รอบคอบเพื่อให้คุ้มค่าที่สุดในเชิงเศรษฐศาสตร์ อย่างไรก็ตามความพยายามในการลดวัตถุดิบที่มีราคาแพง โดยหาแหล่งน้ำมันอื่น ๆ ที่จะนำมาผลิตไบโอดีเซล อันได้แก่ ไขมันสัตว์ และน้ำมันที่ใช้แล้ว ก็ต้องคำนึงถึงกรรมวิธีการผลิตไบโอดีเซลที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย เนื่องจากไขมันสัตว์และน้ำมันที่ใช้ทอดแล้วมีองค์ประกอบที่ไม่เหมือนกับน้ำมันพืชทั่วไป จึงต้องมีการคำนึงถึงในส่วนนี้ด้วย (สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง, 2544)

วัตถุดิบหลักที่นิยมใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้แก่ น้ำมันพืช ซึ่งน้ำมันพืชทั่วไปจะมีไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol , TAG) เป็นองค์ประกอบหลักโครงสร้างของ TAG จะประกอบด้วยกรดไขมัน 3 โมเลกุล จับอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลด้วยพันธะเอสเทอร์ (รูปที่ 2.1) ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมันใน TAG ที่ได้จากน้ำมันพืชแต่ละประเภทจะแตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์ม จะประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (กรดลอริก, กรดปาล์มิติก) ในปริมาณสูงกว่าน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งจะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (กรดโอเลอิก, กรดลิโนเลอิก) ในปริมาณสูง องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพหรือสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของไบโอดีเซลที่ได้ ตัวอย่างเช่น ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันมะพร้าว หรือน้ำมันปาล์มจะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันถั่วเหลือง ทำให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันมะพร้าวหรือน้ำมันปาล์มไม่เหมาะที่จะใช้ในประเทศแถบหนาวเนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำไบโอดีเซล ดังกล่าวจะอยู่ในสภาพแข็งตัว อย่างไรก็ตามไบโอดีเซลที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวในปริมาณสูงก็จะมีปัญหาในเรื่องของความคงตัวเนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะถูกออกซิเดชันได้ง่าย สำหรับองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบกรดไขมันหลักของน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ

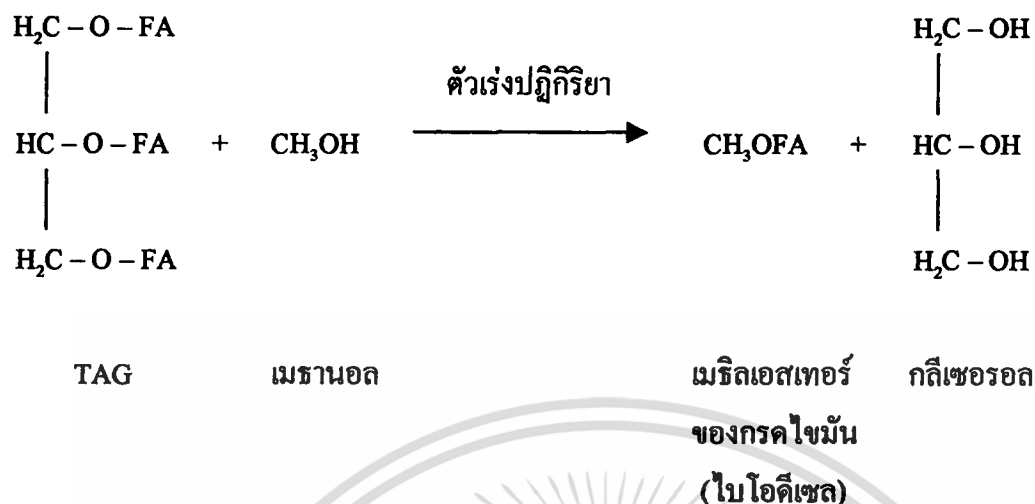
น้ำมันพืช	องค์ประกอบกรดไขมันหลัก (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)						
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
น้ำมันปาล์ม	ND-0.5	0.5-2.0	39.3-47.5	3.5-6.0	36.0-44.0	9.0-12.0	ND-0.5
น้ำมันปาล์ม โอลีน	0.1-0.5	0.5-1.5	38.0-43.5	3.5-5.0	39.8-46.0	10.0-13.5	ND-0.6
น้ำมันปาล์มสเตียรีน	0.1-0.5	1.0-2.0	48.0-74.0	3.9-6.0	15.5-36.0	3.0-10.0	0.5
น้ำมันเมล็ดในปาล์ม	45.0-55.0	14.0-18.0	6.5-10.0	1.0-3.0	12.0-19.0	1.0-3.5	ND-0.2
น้ำมันมะพร้าว	45.1-53.2	16.8-21.0	7.5-10.2	2.0-4.0	5.0-10.0	1.0-2.5	ND
น้ำมันถั่วลิสง	ND-0.1	ND-0.1	8.0-14.0	1.0-4.5	35.0-67.0	13.0-43.0	ND-0.3
น้ำมันเมล็ดสบู่ดำ	ND	ND	14.9	6.0	41.2	37.4	ND
น้ำมันเมล็ดเรพ	ND	ND-0.2	1.5-6.0	0.5-3.1	8.0-60.0	11.0-23.0	5.0-13.0
น้ำมันถั่วเหลือง	ND-0.1	ND-0.2	8.0-13.5	2.0-5.4	17.7-28.0	49.8-59.0	5.0-11.0

หมายเหตุ หมายเลขหน้าเครื่องหมาย : หมายถึง จำนวนคาร์บอนอะตอม

หมายเลขหลังเครื่องหมาย : หมายถึง จำนวนพันธะคู่

ND หมายถึง ไม่พบ

ที่มา : ญัฐพงศ์ และ วิธาน , 2544



ภาพที่ 2.1 การผลิตไบโอดีเซลโดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง TAG และเมทานอล  
ที่มา : ประพันธ์ , 2546

เนื่องจากปัจจุบันมีน้ำมันพืชที่ใช้แล้วเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร รวมทั้งร้านอาหารต่าง ๆ ในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังมีวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชซึ่งเกิดจากขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการสกัดน้ำมันพืชและการทำให้บริสุทธิ์ วัสดุดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้ ซึ่งถือเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งอีกทางหนึ่ง (Haas *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2001; Leung, 2001)

นอกจากน้ำมันพืชแล้ววัสดุที่จำเป็นในการผลิตไบโอดีเซลอีกชนิดหนึ่งได้แก่ แอลกอฮอล์ ที่นิยมใช้จะเป็นแอลกอฮอล์สายสั้นได้แก่ เมทานอล หรือเอทานอล ดังนั้นไบโอดีเซลจึงรู้จักกันในรูปของเมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์จำเป็นต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีหรือตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ กรดซัลฟูริก หรือด่าง (โซเดียมเมทริกไซด์,  $\text{NaOCH}_3$ ) สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพได้แก่ เอนไซม์ไลเปส (lipases, EC 3.1.1.3)

### 2.3 การผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลโดยกระบวนการทางเอนไซม์

การผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลในปัจจุบันน้ำมันพืชบริสุทธิ์หรือน้ำมันพืชที่ใช้แล้วซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากน้ำมันพืชแล้วยังมีวัสดุที่จำเป็นในการผลิตไบโอดีเซลได้แก่ แอลกอฮอล์ที่นิยมใช้เป็นแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอลหรือเอทานอล ดังนั้นไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงรู้จักกันในรูปของเมธิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยการทำให้ปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์จำเป็นต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีหรือตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ

ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ กรดซัลฟูริกหรือด่าง (โซเดียมเมธอกไซด์ ,  $\text{NaOCH}_3$ ) สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพได้แก่ เอนไซม์ไลเปส จากตัวเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันสามารถจำแนกรูปแบบของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลออกเป็น 2 แบบ คือ กระบวนการทางเคมี (ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี) และกระบวนการทางเอนไซม์ (ใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) การผลิตไบโอดีเซลทั้งสองกระบวนการมีข้อได้เปรียบเสียเปรียบแตกต่างกันไป

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจกระบวนการผลิตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามากขึ้น เนื่องจากขั้นตอนแยกกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาและการทำให้บริสุทธิ์สำหรับผลิตภัณฑ์ที่สามารถทำได้โดยง่าย รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพเกิดได้ที่อุณหภูมิ และความดันปกติ ( อุณหภูมิห้องและความดันปกติ ) ซึ่งโดยทั่วไปปฏิกิริยาทางเคมีจะต้องการอุณหภูมิและความดันที่สูงกว่า

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ใน โมเลกุลไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันพืชทั่วไป โครงสร้างของ TAG จะประกอบด้วยกรดไขมัน 3 โมเลกุลจับกับหมู่ไฮดรอกซิลของกลีเซอรอลด้วยพันธะเอสเทอร์ อย่างไรก็ตามในสภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 2.1

แหล่งเอนไซม์ไลเปสได้แก่ จุลินทรีย์ทั้งประเภทแบคทีเรีย ยีสต์ และรา นอกจากนี้ยังพบไลเปสในพืชบางชนิดอีกด้วย ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสที่นิยมใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* , *Candida rugosa* , *Pseudomonas cepacia* , *Pseudomonas fluorescens* และ *Rhizomucor miehei* เป็นต้น

ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็น TAG ด้วยการทำให้ปฏิกิริยากับเมธานอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งอาจประกอบด้วยปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียวหรือหลายขั้นตอนได้ดังต่อไปนี้ (ประพันธ์ , 2546)

## 2.4 ปฏิกิริยาในการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

### 2.4.1 ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส ( Alcoholysis )

เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (หรือเมธานอลไลซิสในกรณีที่ใช้แอลกอฮอล์เป็นเมธานอล) ของ TAG ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (ไบโอดีเซล) กับกลีเซอรอล โดยวิธีนี้พบว่าปฏิกิริยาจะเกิดค่อนข้างช้าและการทำงานของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลเปสอาจถูกยับยั้งโดยปริมาณของเมธานอลที่มากเกินไป ทำให้ปฏิกิริยาเกิดไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามวิธีแก้ไขสามารถทำได้โดยแบ่งปฏิกิริยาเป็นหลายขั้นตอนด้วยการเติมเมธานอลในปฏิกิริยาละน้อยเพื่อป้องกันการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสโดยเมธานอล ซึ่งโดยทั่วไปปริมาณของเมธานอลต่อปริมาณของกรดไขมันทั้งใน TAG หรือน้ำมันพืชไม่ควรเกิน 3 : 1 โดยโมล

**2.4.1.1 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาเมธานอลซิสตโดยใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์เป็นวัตถุดิบ**

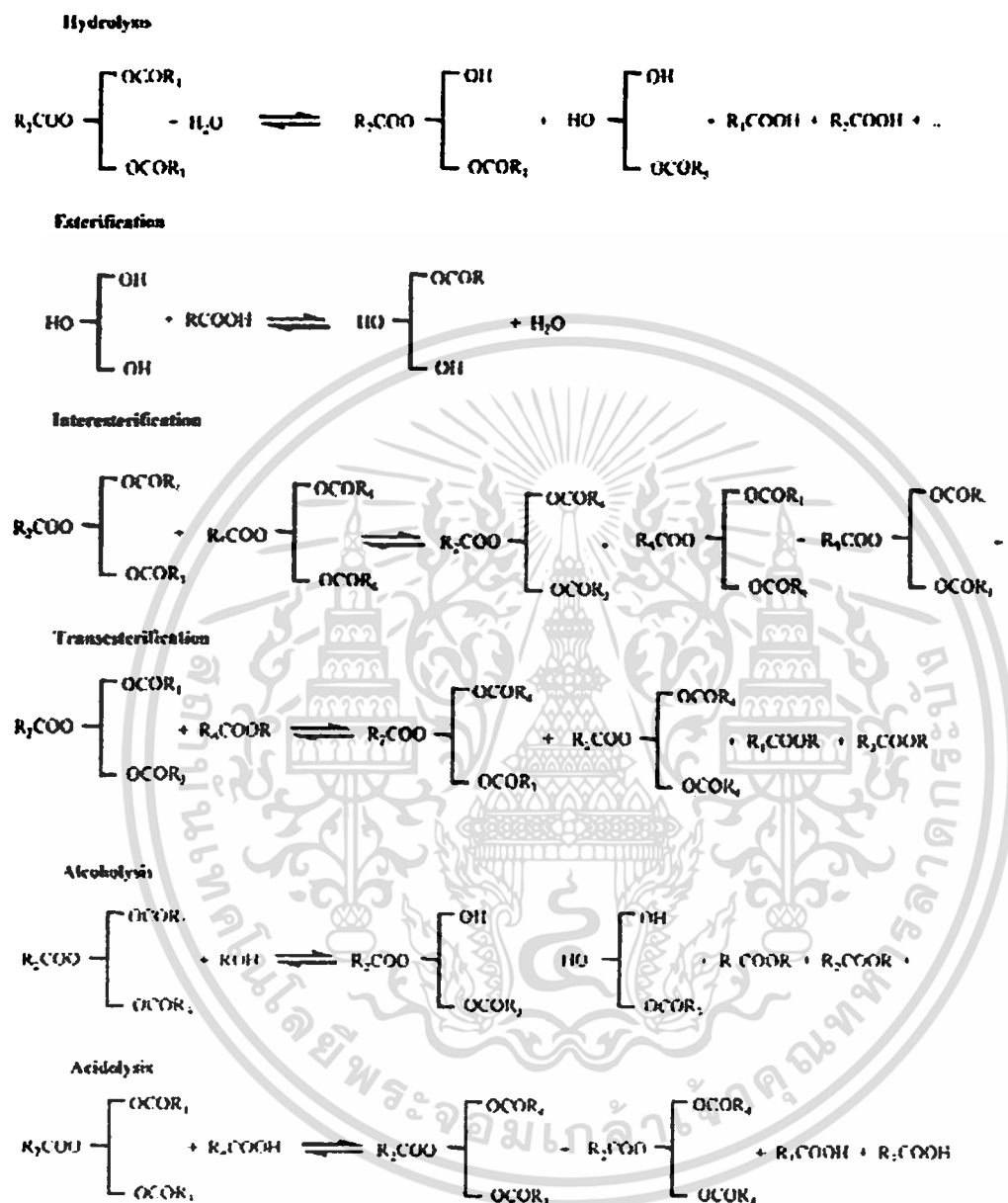
ในปี ค.ศ. 2000 Shimada และคณะ ได้ศึกษาน้ำมันพืชมาผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลโดยมีการเติมเมธานอลและใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica* โดยการศึกษปฏิกิริยาแบบครั้งคราว (Batch reaction)

ปฏิกิริยาแบบครั้งคราว (Batch reaction) แบ่งปฏิกิริยาออกเป็น 2 ขั้นตอนและปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน เนื่องจากในการเติมเมธานอลลงในปฏิกิริยาจะยับยั้งเอนไซม์ไลเปสที่ใช้เป็นตัวเร่ง ดังนั้นในปฏิกิริยาแบบครั้งคราวทั้ง 2 แบบแตกต่างกันที่ปริมาณเมธานอลที่ใช้เติมลงในปฏิกิริยาและประสิทธิภาพของการเปลี่ยนน้ำมันเป็น ไบโอดีเซลดังจะอธิบายต่อไปนี้

- ปฏิกิริยาแบบครั้งคราว 2 ขั้นตอน (Two-step batch reaction)

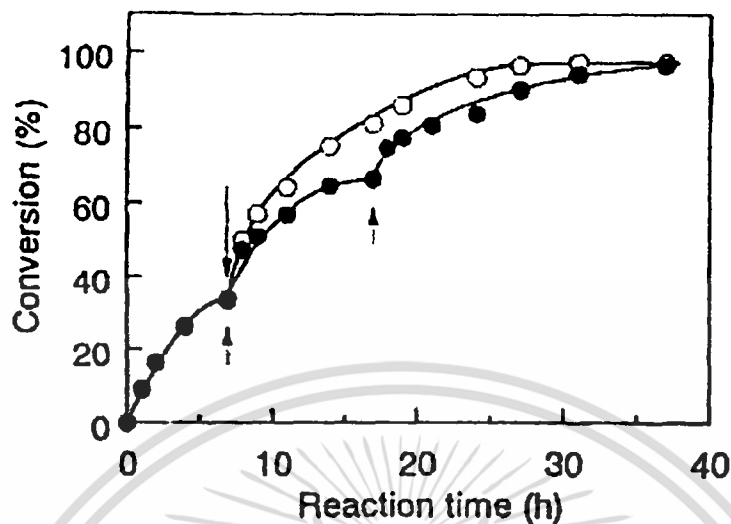
ปฏิกิริยานี้เป็นการศึกษาเอนไซม์ไลเปสที่ใช้เป็นตัวเร่ง จะไม่ถูกยับยั้งเมื่อเติมเมธานอลอัตราส่วน 2 : 3 โดยโมล ในส่วนผสมของ acylglycerols (AG) และ 33% methyl ester (ME) ซึ่งโดยทั่วไปการเติมเมธานอลจะเติมอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลต่อเนื่องกัน 3 ครั้ง เพื่อทำปฏิกิริยาพอดี้กับกรดไขมันในน้ำมันพืชที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา

จากภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาขั้นตอนแรกผสมน้ำมันพืชกับเมธานอลด้วยอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปสเข้าให้เข้ากัน เมื่อเวลาผ่านไป 7 ชั่วโมงการเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซล (methyl ester) ได้ 33.2% ปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สองคือการเติมเมธานอลอัตราส่วน 2 : 3 โดยโมลลงไปในช่วงที่ 10 เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงทำให้ได้ไบโอดีเซลได้ 96.8%



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาต่างๆ ที่สามารถเร่งโดยเอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 ช่วงเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเมธานอลิซิสของน้ำมันพืช ปฏิกิริยาแบบครั้งคราว 2 ขั้นตอน (O) ปฏิกิริยาขั้นตอนแรกผสมน้ำมันพืช, เมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปสครึ่งรูป และปฏิกิริยาขั้นตอนที่สองเติมเมธานอลอัตราส่วน 2 : 3 โดยโมลในชั่วโมงที่ 10 ปฏิกิริยาแบบครั้งคราว 3 ขั้นตอน (□) ขั้นตอนแรกใช้ส่วนผสมและสถานะการเกิดปฏิกิริยาเดียวกับปฏิกิริยาแบบครั้งคราว 2 ขั้นตอน และเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลในชั่วโมงที่ 10 และชั่วโมงที่ 24

ที่มา : Shimada *et al.* , 2002

- ปฏิกิริยาแบบครั้งคราว 3 ขั้นตอน (Three-step batch reaction)

ศึกษาการเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลอย่างต่อเนื่องกัน 3 ครั้งเพื่อทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไขมันในน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้นและทำให้เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งโดยเมธานอลที่มากเกินไป

จากภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกผสมน้ำมันพืชกับเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปส เมื่อเวลาผ่านไป 7 ชั่วโมง ได้ไบโอดีเซล 33.1% ปฏิกิริยาขั้นตอนที่สองเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลลงในชั่วโมงที่ 10 หลังจาก 10 ชั่วโมงผ่านไปได้ไบโอดีเซล 66.4% ปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สามเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลที่ชั่วโมงที่ 24 หลังปฏิกิริยาเกิดขึ้นสุดจะได้ไบโอดีเซล 97.3%

จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาแบบครั้งคราว 3 ขั้นตอนมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลเกือบจะสมบูรณ์ เอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะไม่ถูกยับยั้งในเมธานอลเพราะการเติมเมธานอลจะค่อยๆเติมอย่างต่อเนื่องเป็นระยะๆปฏิกิริยาแบบครั้งคราว 3 ขั้นตอนจะมีความเร็วในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

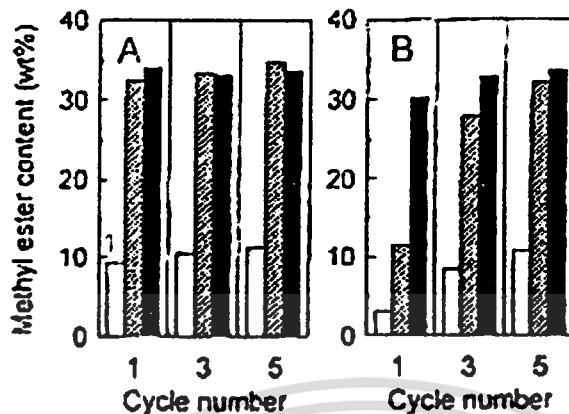
การเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าปฏิกิริยาแบบ 2 ขั้นตอน แต่ให้การเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลได้สูงกว่าปฏิกิริยาแบบครั้งคราว 2 ขั้นตอน

**2.4.1.2 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาเมธานอลิซิสโดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคในครัวเรือนเป็นวัตถุดิบ**

ในปี ค.ศ. 2001 Shimada และคณะได้ศึกษาการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลจากน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคในครัวเรือน เป็นการทดลองที่ได้รับความสนใจและมีความสำคัญในการช่วยลดและนำน้ำมันเหลือทิ้งกลับมาใช้ประโยชน์อีกครั้ง น้ำมันที่เหลือทิ้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบมาจากน้ำมันที่ใช้แล้วตามบ้านเรือน น้ำมันจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น การผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลในอุตสาหกรรมจากน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคในครัวเรือนจะใช้กระบวนการทางเคมีโดยใช้สารละลายต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา




การใช้กระบวนการทางเคมีผลพลอยได้จากผลิตภัณฑ์คือ การเกิดสบู่ สบู่ที่เกิดขึ้นจะกำจัดโดยการล้างด้วยน้ำ การกำจัดสบู่จะรวมทั้งการกำจัดกลีเซอรอล เมธานอลและเอนไซม์ตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นน้ำที่ใช้ในการล้างสบู่ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาจึงทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม ในขณะที่การใช้กระบวนการทางเอนไซม์ไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม การใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคเป็นวัตถุดิบมีผลกระทบจากน้ำและสิ่งปนเปื้อนรวมอยู่ด้วย นอกจากนี้ส่วนของกรดไขมันนั้นเมื่อโดนความร้อนและรวมตัวกับออกซิเจนในอากาศ (Oxidized) กรดไขมันจะเปลี่ยนเป็น aldehydes , epoxides , polymers และอื่นๆ เป็นต้น ดังนั้นการเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลจะลดลง เนื่องจากกรดไขมันที่รวมตัวกับออกซิเจนไม่ทำปฏิกิริยากับ ไลเปสที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Nawar, 1984 , Cuesta, 1993)

นอกจากนี้ในน้ำมันที่ใช้แล้วมีน้ำปนเปื้อนอยู่ ซึ่งมีผลทำให้การเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลน้อยกว่าน้ำมันพืชบริสุทธิ์ ในการทำปฏิกิริยาจะทำปฏิกิริยาซ้ำหลายๆครั้งเพื่อให้ปริมาณน้ำลดลงและช่วยให้การเปลี่ยนไบโอดีเซลได้เพิ่มขึ้น จากภาพที่ 2.4 วัตถุดิบที่ใช้คือน้ำมันพืชบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภค เติมนเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำปฏิกิริยาซ้ำทั้งหมด 1 , 3 และ 5 ครั้ง



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาเมธานอลิซิสโดยใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์ (A) และน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคในครัวเรือน (B) เป็นวัตถุดิบ

หมายเหตุ

-  แทนการเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลหลัง 1 ชั่วโมง
-  แทนการเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลหลัง 7 ชั่วโมง
-  แทนการเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลหลัง 24 ชั่วโมง

ที่มา : Shimada *et al.*, 2001

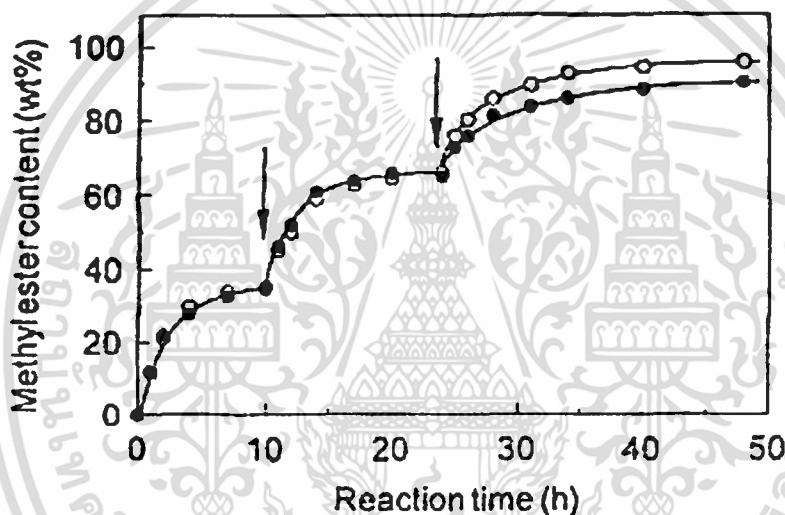
จากภาพที่ 2.4 ผลการเปรียบเทียบของการใช้น้ำมันทั้ง 2 ชนิดเป็นวัตถุดิบ หลังจากการเกิดปฏิกิริยาได้ 1, 7 และ 24 ชั่วโมง โดยจากรูป A ใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์เป็นวัตถุดิบ การเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลหลัง 1 ชั่วโมงเมื่อปฏิกิริยาทำซ้ำ 1, 3 และ 5 ครั้ง ไบโอดีเซลที่ได้คือ 9.3, 10.5 และ 11.2% ตามลำดับ แสดงว่าปฏิกิริยาจะค่อยๆเพิ่มเมื่อทำการทดลองซ้ำ ในการเกิดปฏิกิริยาหลังจาก 24 ชั่วโมง การเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลจะคงที่ ในขณะที่รูป B วัตถุดิบที่ใช้จะเป็นน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภค ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลหลังจาก 1 ชั่วโมงเท่ากับ 3.0, 8.3 และ 10.7% ในการทดลองใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคจะให้ไบโอดีเซลที่น้อยกว่าการใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์เป็นวัตถุดิบ

เนื่องจากการใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคเป็นวัตถุดิบมีปริมาณน้ำที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำมันจึงทำให้ได้ไบโอดีเซลที่น้อยกว่า ดังนั้นการแก้ปัญหาปริมาณน้ำที่ปนเปื้อนโดยการทำปฏิกิริยาซ้ำหลายๆ ครั้งเพื่อเป็นการกำจัดน้ำออก โดยน้ำที่ปนอยู่ในน้ำมันตอนเริ่มต้นเมื่อถูกทำปฏิกิริยาครั้งแรกน้ำจะย้ายไปอยู่ในชั้นของกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลและน้ำจะถูกกำจัดไปพร้อมกับกลีเซอรอลทำให้การทำปฏิกิริยารั้งต่อไปจะค่อยๆ เพิ่มปริมาณของไบโอดีเซลขึ้น

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งเป็นวัตถุดิบโดยใช้ปฏิกิริยาเมธานอลิซิสเหมือนการใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์เป็นวัตถุดิบและใช้ปฏิกิริยาแบบครั้งคราว (batch reaction) ได้อธิบายดังต่อไปนี้

- ปฏิกิริยาแบบครั้งคราว (Batch reaction)

การศึกษาโดยใช้น้ำมันเหลือทิ้งโดยปฏิกิริยาแบบครั้งคราวจะใช้ปฏิกิริยา 3 ขั้นตอนเหมือนกับการใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์เป็นวัตถุดิบ แต่ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลน้อยกว่า จากการทดลองปฏิกิริยาผสมน้ำมันกับเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปสในการเติมเมธานอลจะลดลงไปในชั่วโมงที่ 10 และชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ต่อไปนี้



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาเมธานอลิซิสแบบครั้งคราว 3 ขั้นตอน โดยใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคเป็นวัตถุดิบ ส่วนผสมในปฏิกิริยาน้ำมันเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลและเอนไซม์ ถูกตรึงแสดงการเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 3 โดยโมลลงในน้ำมันพืชบริสุทธิ์ (○) และน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคในครัวเรือน (●)

ที่มา : Shimada *et al.* , 2001

จากภาพที่ 2.5 การเกิดปฏิกิริยาเมธานอลิซิสแบบครั้งคราว 3 ขั้นตอน โดยวัตถุดิบที่ใช้คือ น้ำมัน 2 ชนิด น้ำมันพืชบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภค จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกและปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สอง การเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลได้ไม่แตกต่างกันคือ 33 และ 66% แต่การใช้น้ำมันเหลือทิ้งเป็นวัตถุดิบในปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายทำการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลได้ 90.4% เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์แล้วในปฏิกิริยาสุดท้ายจะได้ไบโอดีเซลคือ 97.3%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคเป็นวัตถุดิบทำให้การเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลน้อยกว่าการใช้น้ำมันพืชเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากคุณสมบัติของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเปลี่ยนแปลงไปตามที่กล่าวมาแล้วในตอนแรก แต่ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาได้ดีแม้จะใช้หลายๆ ครั้ง โดยในการใช้น้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคเป็นวัตถุดิบ สิ่งปนเปื้อนที่อยู่ในน้ำมันเหลือทิ้งไม่มีผลต่อความคงตัวของไลเปส แต่มีต่อประสิทธิภาพในการเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลเท่านั้น

#### 2.4.1.3 การคัดเลือกเอนไซม์ที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาเมธานอลิซิส

จากการวิจัยปฏิกิริยาเมธานอลิซิสได้ใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการบริโภคเป็นสารตั้งต้นเพื่อทำปฏิกิริยากับเมธานอล นอกจากนี้ในปฏิกิริยายังต้องการตัวเร่งคือเอนไซม์ไลเปสช่วยเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซล การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีความสำคัญมาก เมื่อทำการเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่เสียสภาพหลังจากทำปฏิกิริยาแล้ว และสามารถใช้เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาได้หลายๆ ครั้ง

ปัญหาหลักของการใช้เอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซลคือ ต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสมีราคาแพง รวมทั้งปัญหาความเสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการเร่งปฏิกิริยา ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการใช้เอนไซม์ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูปหรือการตรึงเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสแทนการใช้เอนไซม์อิสระ โดยวิธีนี้สามารถทำให้เอนไซม์กลับมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้หลายๆ ครั้ง เป็นการลดต้นทุนในการผลิต

ในการศึกษาไลเปส *Candida antarctica* ในการผลิตไบโอดีเซลจากตารางที่ 2.1 เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Rizopus* และ *Fusarium* ต้องการน้ำเพียงเล็กน้อยในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นในปฏิกิริยาขั้นตอนแรกส่วนผสมที่ใช้คือ น้ำมัน เมธานอล เอนไซม์ไลเปส และน้ำ ส่วนในปฏิกิริยาต่อมาเอนไซม์จะใสในส่วนผสมที่ไม่เค็มน้ำ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida* และ *Rhizomucor* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ค่อนข้างดี โดยดูจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ในการเปลี่ยนน้ำมัน

โดยเฉพาะเอนไซม์ไลเปส *Candida* เมื่อทำการทดลองซ้ำ ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่สี่ปฏิกิริยาการเปลี่ยนของน้ำมันจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 33.1% ในขณะที่การเปลี่ยนของน้ำมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส *Rhizomucor* จะคงที่ ส่วนการใช้เอนไซม์ตัวอื่นๆ ในการเร่งปฏิกิริยาน้ำมันสามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้น้อยกว่า 10%

ตารางที่ 2.2 ปฏิกริยาเมธานอลิซิสของน้ำมันพืชโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปชนิดต่างๆ

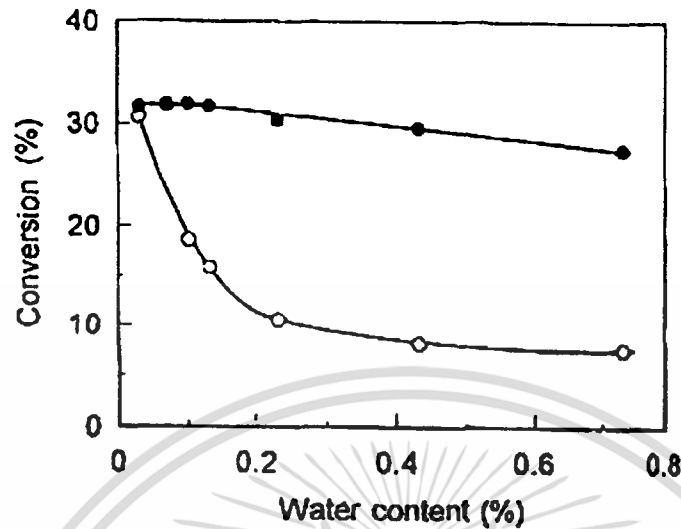
Lipase	Conversion (%) <sup>b</sup>			
	First	Second	Third	Fourth
<i>Rhizomucor miehei</i>	19.1	21.8	18.6	19.4
<i>Candida antarctica</i>	16.0	26.6	30.6	33.1
<i>Rizopus delemar</i>	2.0	0.5	0.3	0.5
<i>Fusarium heterosporum</i>	8.7	1.8	0.5	0.6
<i>Aspergillus niger</i>	0.4	0.5	0.5	0.6

หมายเหตุ b คือ อัตราการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล โดยใช้น้ำมันพืชเป็นสารตั้งต้น  
ที่มา : Shimada *et al.* , 1999

#### 2.4.1.4 ผลกระทบที่มีต่อปฏิกริยาไฮโดรไลซิส

##### ปริมาณน้ำ

จากการเติมน้ำในปฏิกริยาขั้นตอนแรกที่ใช้ในการคัดเลือกเอนไซม์ พบว่าการเติมน้ำไม่จำเป็นต่อการเปลี่ยนแปลงปฏิกริยาของเอนไซม์ไลเปสตรังรูปจาก *Candida antarctica* ผลกระทบของปริมาณน้ำในปฏิกริยาเมธานอลิซิสของน้ำมันพืช โดยใช้เอนไซม์ไลเปส *Candida antarctica* ปฏิกริยามีส่วนผสมคือ น้ำมัน เมธานอล เอนไซม์ไลเปสตรังรูปและปริมาณน้ำที่แตกต่างกันดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 ปริมาณน้ำที่มีผลต่อปฏิกิริยาเมธานอลิซิสของน้ำมันพืชโดยใช้เอนไซม์ไลเปส *Candida antarctica* ส่วนผสมของปฏิกิริยา คือ น้ำมัน เมธานอล เอนไซม์ไลเปสและปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 °C ให้ผลการเปลี่ยนของน้ำมัน โดยใช้เวลา 6 ชั่วโมง (○) และการเปลี่ยนของน้ำมัน โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง (●)

ที่มา : Shimada *et al.*, 1999

นอกจากนี้ปริมาณน้ำยังเป็นตัวบ่งชี้ปฏิกิริยาเมธานอลิซิส จากตารางที่ 2.3 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลและการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อมีการเติมน้ำในปริมาณที่แตกต่างกันในขั้นตอนแรก การเติมปริมาณน้ำลงไปในส่วนผสมทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลลดลง จากการเติมน้ำ 2% ทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสขึ้น 5.7% และการเปลี่ยนของน้ำมันเท่ากับ 6.7% การกำจัดน้ำที่มีอยู่ในปฏิกิริยาสามารถทำได้ โดยการทำปฏิกิริยาซ้ำๆ ทั้งหมด 5 ทำให้ผลของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสลดลง และการเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลเพิ่มขึ้น เพราะน้ำที่เติมเข้าไปในปฏิกิริยาขั้นต้นถูกใช้จนหมดและไม่มีการเติมน้ำเข้าไปในปฏิกิริยาถัดมา ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจะถูกยับยั้งโดยปฏิกิริยาที่เติมน้ำแต่จะกลับมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นได้โดยการเกิดปฏิกิริยาต่อๆ มาไม่มีการเติมน้ำ

### ตารางที่ 2.3 การยับยั้งปฏิกิริยาเมธานอลิซิสของน้ำมันพืชโดยแปรปริมาณน้ำ

Water <sup>b</sup> (%)	First reaction		Fifth reaction		
	Conversion <sup>c</sup> (%)	Hydrolysis (%)	Conversion <sup>c</sup> (%)	Hydrolysis (%)	Water <sup>d</sup> (%)
0	31.9	1.1	32.2	0.7	374
0.2	10.5	2.7	32.8	0.8	421
0.7	7.5	4.3	31.5	0.7	353
2.0	6.7	5.7	31.9	0.7	319

หมายเหตุ b แทนปริมาณของน้ำที่เติมในปฏิกิริยา

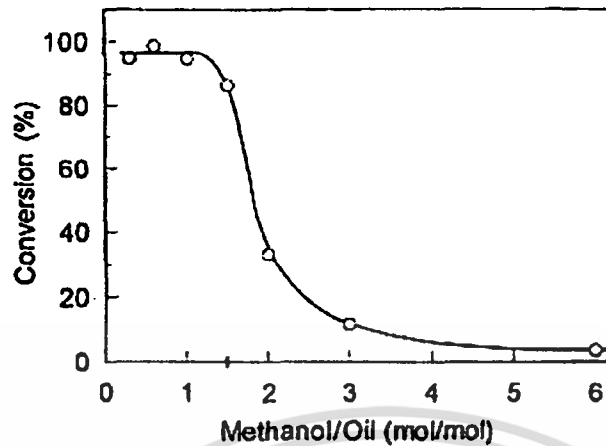
c แทนอัตราการเปลี่ยนของน้ำมันเป็น ไบโอดีเซล

d แทนปริมาณน้ำที่ผสมอยู่ในปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 5

ที่มา : Shimada *et al.* , 1999

#### ปริมาณเมธานอล

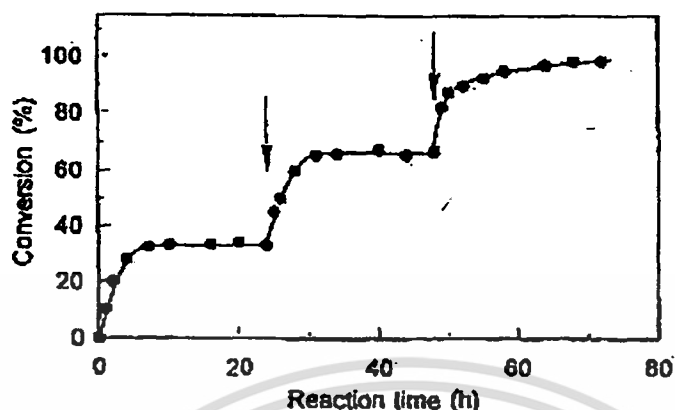
การทำปฏิกิริยาของน้ำมันพืช เอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณเมธานอลที่แตกต่างกันในภาพที่ 2.7 ปริมาณของการเติมเมธานอลที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนของน้ำมันเป็น ไบโอดีเซลในปฏิกิริยาเมธานอลิซิส เมื่อมีการเติมเมธานอลในอัตราส่วนที่มากกว่า 1.5 โดยโมล ลงในน้ำมันมีผลทำให้ปฏิกิริยาเมธานอลิซิสลดลง เอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเสถียรภาพ โดยการยับยั้งจากเมธานอลที่มีปริมาณมากในปฏิกิริยา



ภาพที่ 2.7 ปริมาณเมธานอลที่มีผลต่อปฏิกิริยาเมธานอไลซิสของน้ำมันพืช ปฏิกิริยาเริ่มต้นผสมน้ำมันและเอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลแตกต่างกันตามปริมาณเมธานอลที่เติมลงในปฏิกิริยา

ที่มา : Shimada *et al.* , 1999

นอกจากการเติมเมธานอลที่มากเกินไปในปฏิกิริยาจะยับยั้งเอนไซม์ให้เสถียรแล้วจึงได้มีการศึกษาการเติมเมธานอลโดยค่อยๆ เติมอย่างต่อเนื่องในปฏิกิริยาตัวอย่างในภาพที่ 2.8 แสดงช่วงเวลาการเติมเมธานอลในปฏิกิริยาทุก 24 ชั่วโมง ส่วนผสมคือ น้ำมันพืช เมธานอลอัตราส่วน 1 : 1 โดยโมล และเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* เมธานอลจะเติมลงไปปฏิกิริยาที่ละ 1 โมลในชั่วโมงที่ 24 และชั่วโมงที่ 48 เมธานอลที่ต้องการในการเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลอย่างน้อย 3 โมล เอนไซม์ไลเปสจะถูกยับยั้งได้ในปฏิกิริยาถ้าเติมมากกว่า 1 โมล



ภาพที่ 2.8 ช่วงเวลาการเติมเมธานอลในปฏิกิริยาเมธานอลไลซิสของน้ำมันพืช ปฏิกิริยามีส่วนผสมของน้ำมันเมธานอลอัตราส่วน 1 : 1 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปส ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 °C ถูกسرเป็นการเติมเมธานอล 1 โมลในชั่วโมงที่ 24 และชั่วโมงที่ 48 ของปฏิกิริยา

ที่มา : Shimada *et al.*, 1999

จากภาพที่ 2.8 ที่เวลา 7 ชั่วโมง การเปลี่ยนของน้ำมันเป็นไบโอดีเซลได้ 32.5% และเติมเมธานอลครั้งที่สองอีก 1 โมลที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังการเติมผ่านไป 7 ชั่วโมง การเปลี่ยนของน้ำมันพืชได้ 65.4% ต่อมาเติมเมธานอลครั้งที่สามที่เวลา 48 ชั่วโมง ปฏิกิริยาจะดำเนินต่อไปจนเปลี่ยนน้ำมันเป็นไบโอดีเซลได้ 98.4% ดังนั้นการเติมเมธานอลทีละขั้นตอนทำให้การเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลมีประสิทธิภาพเกือบสมบูรณ์

#### 2.4.2 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสร่วมกับเอสเทอร์ฟิเคชัน (Hydrolysis and Esterification)

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชโดยวิธีนี้จะอาศัยปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนคือ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หรือการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ใน TAG โดยอาศัยเอนไซม์ไลเปส ซึ่งผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ได้แก่ กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล กลีเซอรอลที่เกิดขึ้นสามารถแยกออกได้ง่ายเนื่องจากเกิดการแยกชั้นกับกรดไขมันอิสระ สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนที่สองคือ เอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันอิสระกับเมธานอล และผลิตภัณฑ์ที่ได้สุดท้ายคือ เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหรือไบโอดีเซลนั่นเอง ในขั้นตอนที่สองของเอสเทอร์ฟิเคชันอาจทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเมธานอลที่มากเกินไป ดังนั้นปริมาณของเมธานอลที่เติมลงในปฏิกิริยาจำเป็นต้องมีการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เหมาะกับสารตั้งต้นและชนิดของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งโดยทั่วไปปริมาณของเมธานอลต่อกรดไขมันอิสระจะอยู่ในช่วง 1 : 1 ถึง 5 : 1 โดยโมล

**2.4.2.1 ตัวอย่างงานวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดไขมันเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมหมู่น้ำ**

ในปี ค.ศ. 2002 Shimada และคณะ ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากกรดไขมันเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมหมู่น้ำ เนื่องจากในอุตสาหกรรมหมู่น้ำจะให้กรดไขมันอิสระที่เป็นของเสียออกมาซึ่งเป็นของเสียในอุตสาหกรรมที่ยากจะบำบัดเพราะกรดไขมันอิสระอยู่ในสภาพของแข็งที่อุณหภูมิห้อง Shimada และคณะได้พยายามเปลี่ยนกรดไขมันเหลือทิ้งให้เป็นไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทางเอนไซม์ เนื่องจากกรดไขมันอิสระอยู่ในสถานะของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจะทำให้กรดไขมันอิสระมีจุดหลอมเหลวลดลง ทำให้ได้เอสเทอร์เป็นเชื้อเพลิงไบโอดีเซล

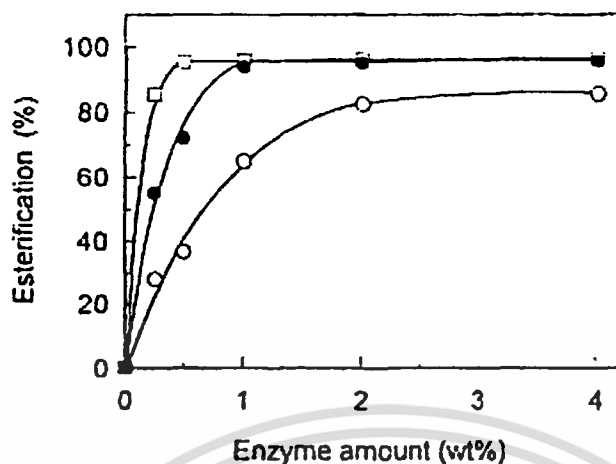
ในการผลิตไบโอดีเซลจากกรดไขมันเหลือทิ้งด้วยกระบวนการทางเคมีจะใช้เมธานอลและตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดเช่น กรดซัลฟูริก เป็นต้น เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลและจะต้องกำจัดตัวเร่งปฏิกิริยาออกไป โดยการทำให้เป็นกลางด้วยด่าง ในขั้นตอนนี้จะทำให้เกิดสบู่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ การกำจัดสบู่ที่เกิดขึ้นนี้ต้องใช้น้ำปริมาณมากในการล้างสบู่ ซึ่งน้ำที่ได้จากการล้างนี้ทำให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อมตามมา จากปัญหาที่เกิดขึ้นผู้ทำการทดลองได้ศึกษาแก้ปัญหาโดยใช้กระบวนการทางเอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซล

**2.4.2.2 ผลกระทบที่มีต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน**

**ปริมาณเอนไซม์**

จากการศึกษาโดยการผสมกรดไขมันเหลือทิ้งจากหมู่น้ำกับเมธานอลอัตราส่วน 1 : 2 โดยโมลและปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นหลังจาก 1, 3 และ 24 ชั่วโมง ดังภาพที่

2.9



ภาพที่ 2.9 ปริมาณเอนไซม์ที่มีผลต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันเหลือทิ้ง ในปฏิกิริยาผสมกรดไขมันกับเมธานอลอัตราส่วน 1 : 2 โดยโมลและปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 °C ให้ระดับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน 1 ชั่วโมง (○) ระดับปฏิกิริยาหลัง 3 ชั่วโมง (●) และระดับปฏิกิริยาหลัง 24 ชั่วโมง (□)

ที่มา : Shimada *et al.* , 2002

จากภาพที่ 2.9 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลังจาก 1 ชั่วโมงและ 3 ชั่วโมง ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลัง 24 ชั่วโมง ระดับของการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันสูงถึง 95% โดยเอนไซม์ไลเปสที่ใช้น้อยกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจึงใช้เอนไซม์ไลเปส 0.5 หรือ 1 เปอร์เซ็นต์

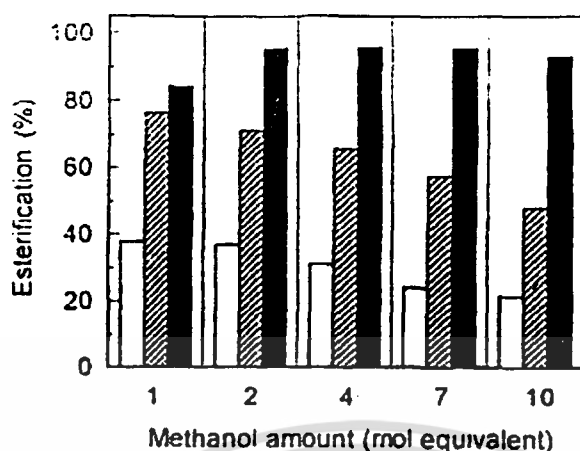
#### ปริมาณเมธานอล

จากการศึกษาโดยการผสมกรดไขมันเหลือทิ้งกับเอนไซม์ไลเปสตรงรูป 0.5% ปริมาณเมธานอลที่แตกต่างกัน เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นหลังจาก 1 , 3 และ 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สวนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

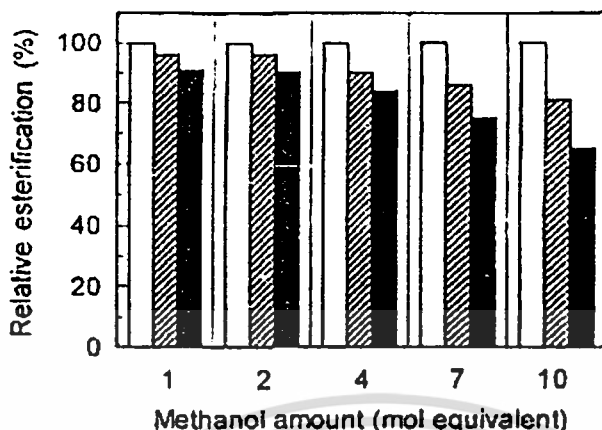


ภาพที่ 2.10 ปริมาณเมทานอลที่มีผลต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมัน ในปฏิกิริยาจะผสมกรดไขมันกับเอโนไซม์ไลเปส และปริมาณเมทานอลที่แตกต่างกัน ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  ระดับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันหลัง 1 ชั่วโมง (□) ระดับของปฏิกิริยาหลัง 7 ชั่วโมง (▨) และระดับของปฏิกิริยาของปฏิกิริยาหลัง 24 ชั่วโมง (■)

ที่มา : Shimada *et al.* , 2002

จากภาพที่ 2.10 ระดับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันหลังจาก 1 และ 3 ชั่วโมงลดลงเมื่อปริมาณเมทานอลเพิ่มขึ้น แสดงว่าปริมาณเมทานอลที่เพิ่มขึ้นจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน แต่ระดับการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันหลังจาก 24 ชั่วโมงคือ 84.3% โดยเมทานอลที่ใช้ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยโมล เมื่อมีการเติมเมทานอลเพิ่มขึ้นระดับของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจะไม่เพิ่มขึ้นมากกว่า 95%

นอกจากปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแล้ว ปริมาณของเมทานอลที่ความเข้มข้นสูงยังมีผลในการยับยั้งเอโนไซม์ไลเปสในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำการวิเคราะห์ความเสถียรของเอโนไซม์ด้วยการทำปฏิกิริยซ้ำกัน 5 ครั้ง และเมื่อทำปฏิกิริยาครบ 24 ชั่วโมงจะเริ่มการทำปฏิกิริยาใหม่โดยเอโนไซม์ตัวเดิม ดังภาพที่ 2.11



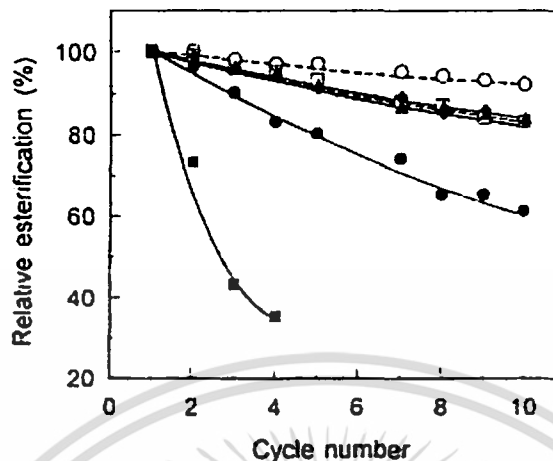
ภาพที่ 2.11 การยับยั้งเอนไซม์โดยเมธานอลที่มากเกินไป ปฏิกริยาจะย้ายเอนไซม์ไปยังสารตั้งต้นใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง ปฏิกริยาเอสเทอริฟิเคชันครั้งที่หนึ่ง (□) ปฏิกริยาทำซ้ำ 3 ครั้ง (▨) และปฏิกริยาทำซ้ำ 5 ครั้ง (■)

ที่มา : Shimada *et al.* , 2002

จากภาพที่ 2.11 การทำปฏิกริยาซ้ำ 1, 3 และ 5 ครั้ง พบว่าปฏิกริยาเอสเทอริฟิเคชันเดิม เมธานอลอัตราส่วน 1 : 1 โดยโมลและอัตราส่วน 1 : 2 โดยโมล ระดับของปฏิกริยาที่ทำซ้ำ 5 ครั้ง จะลดลงถึง 90% และลดลงมากขึ้นเมื่อเมธานอลอัตราส่วนมากกว่า 1 : 4 โดยโมล แสดงว่าเอนไซม์ไม่เสถียรในปริมาณเมธานอลที่มาก

#### อุณหภูมิในการเกิดปฏิกริยา

การศึกษาผสมกรดไขมันเหลือทิ้งกับเมธานอลอัตราส่วน 1 : 2 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปส 0.5% โดยน้ำหนัก อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกริยาอยู่ในช่วง 20 ถึง 50 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสโดยอุณหภูมิที่ต่างกัน โดยผสมกรดไขมันกับเมธานอลอัตราส่วน 1 : 2 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปสโดยอุณหภูมิที่ใช้แบ่งเป็น 20 องศาเซลเซียส (◆) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (▲) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (●) และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (■)

ที่มา : Shimada *et al.*, 2002

จากภาพ 2.12 จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 20 , 30 , 40 และ 50 องศาเซลเซียส ระดับของปฏิกิริยาได้ 29.6 , 35.2 , 39.2 และ 44.7% ตามลำดับ แสดงว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา คือ มากกว่า 50 องศาเซลเซียส

### ปริมาณน้ำที่เกิดในปฏิกิริยา

ในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันแบบขั้นตอนเดียวเมื่อเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 2 โดยโมล การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันสูงถึง 95% โดยในปฏิกิริยายังไม่กำจัดน้ำที่เกิดขึ้นออก ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจะเพิ่มสูงขึ้น โดยการกำจัดน้ำที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์และใช้เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาซ้ำต่อไป

ในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันแบบสองขั้นตอน ในปฏิกิริยาขั้นตอนแรกเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 2 โดยโมลใช้เอนไซม์ 1.0% โดยน้ำหนัก ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับปฏิกิริยาที่ได้คือ 82.5% ส่วนผสมที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาจะแยกชั้นน้ำมันกับชั้นน้ำโดยใช้ stand นำชั้นของน้ำมันมาทำปฏิกิริยาต่างๆ ที่ชั้นนี้ยังมีปริมาณน้ำปนอยู่ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 1 , 1 : 5 และ 1 : 10 โดย

โมล เพื่อทำปฏิกิริยากับกรดไขมันที่เหลืออยู่และเติมเอนไซม์ไลเปส 1.0% โดยน้ำหนัก ทำให้ได้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน 43.1 , 64.7 และ 68.2% ตามลำดับ

ในขณะที่อีกวิธีหนึ่งกำจัดน้ำที่มีในชั้นน้ำมันและทำปฏิกิริยาโดยเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 1 , 1 : 5 และ 1 : 10 โดยโมล และเติมเอนไซม์ 1.0% โดยน้ำหนัก ดังแสดงนำตารางที่ 2. 4 ต่อไปนี้

ตารางที่ 2.4 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันแบบสองขั้นตอนของกรดไขมันเหลือทิ้ง

First reaction <sup>a</sup>		Second reaction <sup>b</sup>		Total
FFA / MeOH (mol / mol)	Esterification (%)	FFA / MeOH (mol / mol)	Esterification (%)	Esterification (%)
1 : 1	82.5	1 : 1	53.8	91.9
		1 : 5	82.1	96.9
		1 : 10	81.4	96.7
1 : 2	95.2	1 : 1	26.5	96.4
		1 : 5	52.0	97.7
		1 : 10	54.8	97.8

หมายเหตุ a แทนการผสมกรดไขมันกับเมธานอล และเอนไซม์ไลเปส ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

b แทนส่วนผสมในปฏิกิริยาขั้นตอนแรกที่แยกชั้นน้ำและน้ำมัน โดยชั้นน้ำมันนำมากำจัดน้ำแล้วเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 1 , 1 : 5 และ 1 : 10 โดยโมล ตามด้วยเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Shimada *et al.* , 2002

จากตารางที่ 2.4 จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันมีค่า 53.8 , 82.1 และ 81.4% ตามลำดับ ในการเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 5 โดยโมลจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันทั้งหมด 96.9% การกำจัดน้ำออกจากปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันทั้งหมดมีค่าใกล้เคียง 97% ในการศึกษาอีกวิธีหนึ่งใช้กรดไขมันเหลือทิ้งทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 2 โดยโมลและเอนไซม์ไลเปส 1.0% โดยน้ำหนัก จากตารางที่ 2.3 ทำให้ได้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน 95.2% นำส่วนผสมที่ได้จากปฏิกิริยากำจัดน้ำออกและทำปฏิกิริยาที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 1 , 1 : 5 และ 1 : 10 โดยโมลและเติม เอนไซม์ไลเปส ได้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน 26.5 , 52.0 และ 54.8% ตามลำดับ จากตารางการเติม เมธานอลอัตราส่วน 1 : 5 โดยโมล ให้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันทั้งหมด ของการเปลี่ยนกรดไขมัน เป็นไบโอดีเซล 97.7% ดังนั้นการเปลี่ยนของน้ำมันโดยใช้เมธานอลที่สูงกว่า 1% มีผลต่อปฏิกิริยา เอสเทอร์ฟิเคชันในปฏิกิริยาขั้นตอนแรก จากผลในตารางทำให้ในการศึกษาสามารถเติมเมธานอล 1 : 1 โดยโมลในปฏิกิริยาขั้นตอนแรกและเติมเมธานอล 1 : 5 โดยโมลในขั้นตอนที่สอง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 อุปกรณ์

- เครื่องเขย่า (GLF 3017 , Germany)
- เครื่องปั่น
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hettic EBA 3S)
- หลอดหมุนเหวี่ยงพลาสติก
- เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (BUCHI Roravapor R-114 , Switzerland)
- เครื่อง cooling (CTL 911 , Thailand)
- ตู้อบลมร้อน (memmert M15 , Germany)
- เครื่องชั่ง
- พีเอชมิเตอร์
- ชุดรีฟลักซ์
- ชุดเครื่องมือสกัด
- โถดูดความชื้น
- aluminium can
- เทอร์โมมิเตอร์
- magnetic stirrer
- magnetic bar
- บิวเรตและขวด
- กรวยกรอง
- หลอดหยด
- แท่งแก้วคน
- ช้อนตักสาร
- ถังมือทนกรด
- จุกยางปิดขวดรูปชมพู่เบอร์ 10
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 , 125 , 250 , 500 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 10 , 50 , 100 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาด 100 , 250 , 600 , 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 , 250 , 500 , 1000 มิลลิลิตร
- บีเปิดขนาด 1 , 5 , 10 , 50 มิลลิลิตร
- กระดาษวัดพีเอชช่วง 0-14
- กระดาษกรองเบอร์ 4
- อลูมิเนียมฟลอยด์

### 3.2 วัตถุดิบ

- น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ ยี่ห้อ หยก ผลิตโดย บริษัท ถ้ำสูง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)
- น้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหาร ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เทสโก้ โลตัส สาขาซีคอนสแควร์ ตัวอย่างที่ได้จะนำมากรองเพื่อกำจัดอนุภาคของแข็ง และเก็บไว้ในขวดพลาสติกโดยนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป
- เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ผลิตโดย Meito Sangyo Co. ประเทศญี่ปุ่น

### 3.3 สารเคมี

- แอลกอฮอล์ 95%
- โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์
- โซเดียมไฮดรอกไซด์
- กรดไฮโดรคลอริก
- ฟีนอล์ฟทาลีน
- เมธานอล
- olive oil
- กัมอะราบิก
- โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0
- ไทมอลทาลีน
- เฮกเซน
- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhydrous)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 0\text{H}_2\text{O}$
- กรดโอเลอิก

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa*

การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจะใช้วิธีที่รายงานโดย Pinsirodom และ Parkin (2001) โดยใช้มีลชันของ olive oil เป็นสับสเตรทซึ่งเตรียมโดยใช้ส่วนผสมของ olive oil 12.5 กรัม กัม-อะราบิก (gum arabic) 12.5 กรัม และ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 250 มิลลิลิตร นำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 3 นาที จะได้สารละลายปฏิกิริยาที่มีลักษณะเป็นอิมัลชันสีขาวขุ่น ถ่ายสับสเตรทที่เตรียมได้ลงในบีกเกอร์และกวนตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ปิเปตสับสเตรทปริมาณ 50 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ทำการกวนตลอดเวลา จากนั้นเติมผงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ปริมาณ 5 มิลลิกรัม พร้อมกับกวนตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer เก็บตัวอย่างปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 2.5, 5, 10, 15 และ 20 นาที ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีเอธานอล 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ ไทมอลทาลีน 3 หยด นำไปไตเตรตกับสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล จดปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้ จากนั้นเตรียมสารละลายปฏิกิริยาเพื่อเปรียบเทียบ (blank) โดยปิเปตสับสเตรทปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเอธานอล 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ ไทมอลทาลีน 3 หยด ไตเตรตกับสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล จดปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้ นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น ( ไมโคร โมล / มิลลิลิตร )} = \frac{(\text{มิลลิกรัมของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง} - \text{มิลลิกรัมของ NaOH ที่ใช้ไตเตรต blank}) \times (\text{ความเข้มข้นของ NaOH}) \times 1000}{5 \text{ มิลลิลิตร}}$$

นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่าง เวลาในการทำปฏิกิริยา กับ ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นหาค่าความชันจากกราฟและคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับปริมาณที่เปลี่ยนสับสเตรท (olive oil) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ (กรดไขมันอิสระ) 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และ pH 8.0

### 3.4.2 การเตรียมกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหารโดยวิธี saponification

เตรียมสารละลายปฏิกิริยา คือ น้ำมันปาล์ม 100 กรัม ผสมกับสารละลาย NaOH ในแอลกอฮอล์ (NaOH 250 กรัม ละลายในเอทานอล 400 มิลลิลิตร) ในขวดก้นกลมขนาด 1 ลิตร นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส และกวนตลอดเวลา จากนั้นนำสารละลายปฏิกิริยามาปรับให้มี pH เท่ากับ 1 โดยใช้ HCl 6 นอร์มอล (ใช้กระดาษวัด pH ในการตรวจสอบ pH ของสารละลายปฏิกิริยา) จะเห็นการแยกชั้นของไขมันอย่างชัดเจน นำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้ใส่ลงในกรวยแยกขนาด 1 ลิตร เติมเฮกเซนปริมาณ 100 มิลลิลิตร เขย่าผสมจากนั้นแยกส่วนของเฮกเซนที่มีกรดไขมันละลายอยู่ ( ชั้นล่าง ) ใส่ในกรวยแยกอีกอันหนึ่ง จากนั้นนำส่วนของ aqueous phase ( ชั้นบน ) มาสกัดด้วยเฮกเซนซ้ำอีก 2 ครั้ง (รวมปริมาณเฮกเซนที่ใช้เท่ากับ 300 มิลลิลิตร) เก็บรวบรวมชั้นเฮกเซนที่มีกรดไขมันที่สกัดได้ในแต่ละครั้งนำไปกรองผ่าน  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhydrous) โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นระเหยเฮกเซนออกที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ เก็บตัวอย่างกรดไขมันที่ได้ในขวดสีชาที่ 5-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.4.3 วิธีหาค่า acid value (AV)

การติดตามความก้าวหน้าของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจะใช้วิธีติดตามค่า AV ที่เพิ่มขึ้น หรือ ค่า AV ที่ลดลง ตามลำดับ ซึ่งค่า AV หมายถึง จำนวนมิลลิกรัมของ KOH ที่ใช้ในการสะเทิน (neutralize) กรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมัน 1 กรัม โดยที่ตัวอย่างน้ำมันที่ TAG ถูกย่อยสลายและเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระมากขึ้นจะมีค่า AV สูงขึ้น และในกรณีของตัวอย่างของกรดไขมันอิสระเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมธานอลมากขึ้นก็จะมีค่า AV ลดลง

สำหรับการหาค่า AV นั้น ทำได้โดยชั่งตัวอย่างน้ำมันในข้อ 3.4.2 หรือตัวอย่างของสารละลายปฏิกิริยามาประมาณ 1.5-2.0 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 95% ปริมาตร 30 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด นำไปไตเตรตกับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่า AV ดังนี้

$$\text{Acid value (AV)} = \frac{\text{ปริมาณ KOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของ KOH (นอร์มอล)} \times 56.11}{\text{ปริมาณตัวอย่างน้ำมันหรือสารละลายปฏิกิริยาที่ใช้ (กรัม)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์

#### ไลเปสจาก *Candida rugosa*

##### 3.4.4.1 ศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ทำการทดลองโดยเตรียมขบวนการผสมพูนขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างน้ำมันปาล์มและน้ำเท่ากับ 70 กรัม โดยแปรปริมาณน้ำกลั่น 5 ระดับ คือ 10 , 20 , 30 , 40 และ 50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นเติมผงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ลงในแต่ละขวดปริมาณ เท่ากันคือ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา นำขบวนการผสมพูนทั้งหมดเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 1 , 3 , 6 , 9 , 12 และ 24 ชั่วโมง นำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที นำชั้นน้ำมัน (ชั้นบน) ไปวิเคราะห์หาค่า AV ตามวิธีในข้อ 3.4.3 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสโดยใช้ค่า AV ของกรดไขมันอิสระของตัวอย่างน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดที่ได้จากการเตรียมโดยปฏิกิริยา saponification เป็นมาตรฐาน 100% ไฮโดรไลซิส (ดูตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวก) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสกับเวลาในการทำปฏิกิริยา พิจารณาปริมาณน้ำที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสมากที่สุด

##### 3.4.4.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ทำการทดลองโดยเลือกสภาวะของปริมาณน้ำที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองข้อ 3.4.4.1 เตรียมขบวนการผสมพูนขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างน้ำมันและน้ำเท่ากับ 70 กรัม โดยแปรปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ต่าง ๆ กันในช่วง 25-300 ยูนิตต่อกรัมสารละลายปฏิกิริยา นำขบวนการผสมพูนเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างและทำการทดลองเหมือนข้อ 3.4.4.1 ทุกประการ

### 3.4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

#### 3.4.5.1 การเตรียมกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหาร

การเตรียมกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหารโดยใช้วิธี saponification เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 3.4.2 ทุกประการ เก็บรวบรวมกรดไขมันอิสระที่ได้โดยนำตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า AV ตามวิธีในข้อ 3.4.3 เก็บรวบรวมกรดไขมันอิสระที่ได้ในขวดสีชาที่ 5-8 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.5.2 การศึกษาปริมาณเมธานอลที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ทำการทดลองโดยเตรียมขบวนการหมักขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 และเมธานอลเท่ากับ 70 กรัม โดยแปรปริมาณเมธานอล 5 ระดับคือ 10 , 20 , 30 , 40 และ 50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นเติมผงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ลงในแต่ละขวด ปริมาณเท่ากันคือ 200 ยูนิต์ต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา นำขบวนการหมักทั้งหมดเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 1, 3 , 6 , 9 , 12 และ 24 ชั่วโมง นำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที นำชั้นน้ำมัน(ชั้นบน) ไปวิเคราะห์หาค่า AV ตามวิธีในข้อ 3.4.3 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ค่า AV เริ่มต้นของสารละลายปฏิกิริยาในแต่ละระดับปริมาณเมธานอลมาคำนวณตามสมการต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน} = \frac{AV_{\text{เริ่มต้น}} - AV_{\text{ที่เวลาใดๆ}}}{AV_{\text{เริ่มต้น}}} \times 100$$

\* เป็น  $AV_{\text{เริ่มต้น}}$  ของชั้นไขมันที่ได้จากการเหวี่ยงแยกสารละลายปฏิกิริยาที่แต่ละระดับปริมาณเมธานอล

นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันกับเวลาในการทำปฏิกิริยา พิจารณาปริมาณเมธานอลที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมากที่สุด

### 3.4.5.3 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ทำการทดลองโดยเลือกสภาวะของปริมาณเมธานอลที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 3.4.5.2 เตรียมขบวนการหมักขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระและเมธานอลเท่ากับ 70 กรัม โดยแปรปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ต่างๆกันในช่วง 200-500 ยูนิต์ต่อกรัมสารละลายปฏิกิริยา นำขบวนการหมักเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างและทำการทดลองเหมือนข้อ 3.4.5.2 ทุกประการ แต่ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันใช้ค่า AV เริ่มต้นของตัวอย่างสารละลายปฏิกิริยาตามสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณเมธานอล ซึ่งได้จากการทดลองข้อ 3.4.5.2

#### 3.4.5.4 การศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) ต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

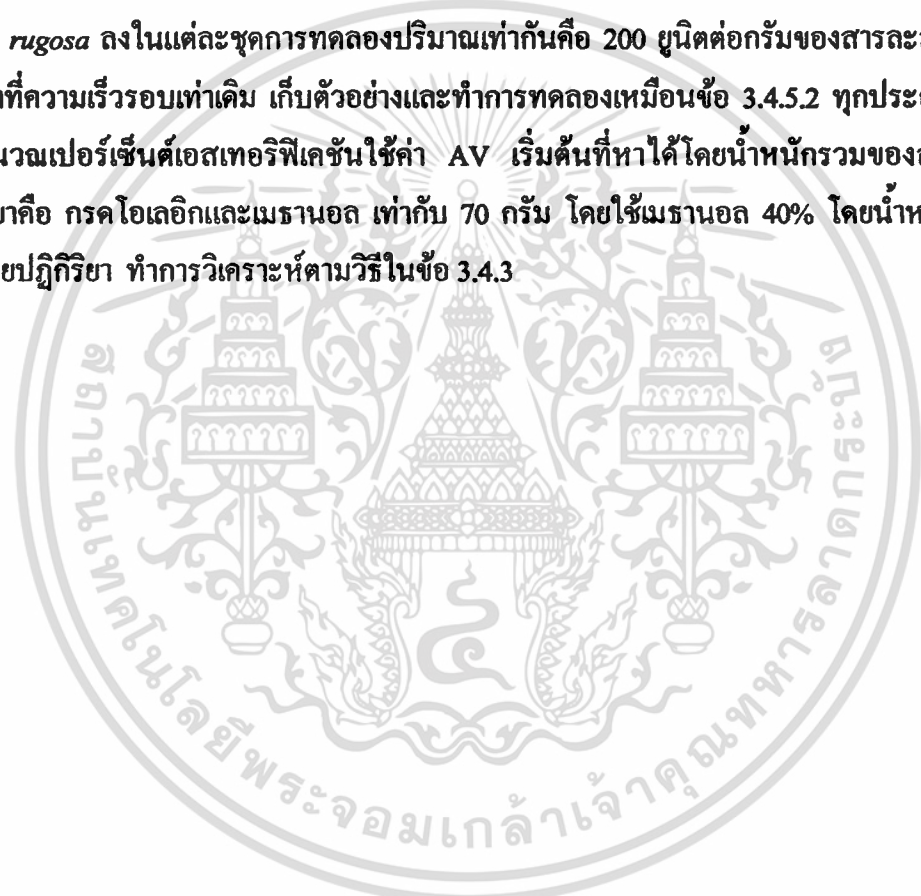
การควบคุม water activity ของปฏิกิริยาจะใช้วิธีที่รายงานโดย Halling, P. J. 1992. Salt hydrates for water activity control with biocatalysis in organic media. Biotechnol. Techniques. : 271-276. โดยใช้  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ซึ่งให้ค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.85,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  มีค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.65 และ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 0\text{H}_2\text{O}$  ให้ค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.18 ที่อุณหภูมิ 30 °C ทำการทดลองโดยเตรียมขบวนการหมักขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 และเมธานอลเท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นเติมเกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ปริมาณอย่างละ 3 กรัม รวม 6 กรัม ในแต่ละชุดการทดลอง นำขบวนการหมักทั้งหมดเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เติมผงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ลงในแต่ละชุดการทดลองปริมาณเท่ากันคือ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา เขย่าที่ความเร็วรอบเท่าเดิม เก็บตัวอย่างที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.4.5.2 ทุกประการ แต่ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันใช้ค่า AV เริ่มต้นของตัวอย่างสารละลายปฏิกิริยาที่มีเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ค่า AV ตามวิธีในข้อ 3.4.3

#### 3.4.5.5 การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ทำการทดลองโดยเตรียมขบวนการหมักขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่ได้จากข้อ 3.4.5.1, เมธานอล และน้ำเท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา และแปรปริมาณน้ำ 2 ระดับ คือ 10 และ 20% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นเติมผงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ลงในแต่ละชุดปริมาณเท่ากันคือ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา นำขบวนการหมักเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 1, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.4.5.2 ทุกประการ แต่ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันใช้ค่า AV เริ่มต้นที่หาได้โดยน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่ได้, เมธานอลและน้ำ เท่ากับ 70 กรัม โดยแปรปริมาณน้ำ 2 ระดับคือ 10 และ 20% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ค่า AV ตามวิธีในข้อ 3.4.3

### 3.4.5.6 การศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมธานอล

ทำทดลองโดยเตรียมขบวนการผสมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ กรดโอเลอิกและเมธานอล เท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นเติมเกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ปริมาณอย่างละ 3 กรัม ในหนึ่งชุดการทดลองเพื่อควบคุม  $a_w$  ของสารละลายปฏิกิริยาให้มีค่าประมาณ 0.85 ที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  และอีกหนึ่งชุดการทดลองไม่เติมเกลือ นำชุดการทดลองที่เติมเกลือเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำชุดการทดลองทั้งสองชุดเติมเอนไซม์ไลเปส จาก *Candida rugosa* ลงในแต่ละชุดการทดลองปริมาณเท่ากันคือ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา เขย่าที่ความเร็วรอบเท่าเดิม เก็บตัวอย่างและทำการทดลองเหมือนข้อ 3.4.5.2 ทุกประการ แต่ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันใช้ค่า AV เริ่มต้นที่หาได้โดยน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ กรดโอเลอิกและเมธานอล เท่ากับ 70 กรัม โดยใช้เมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.4.3

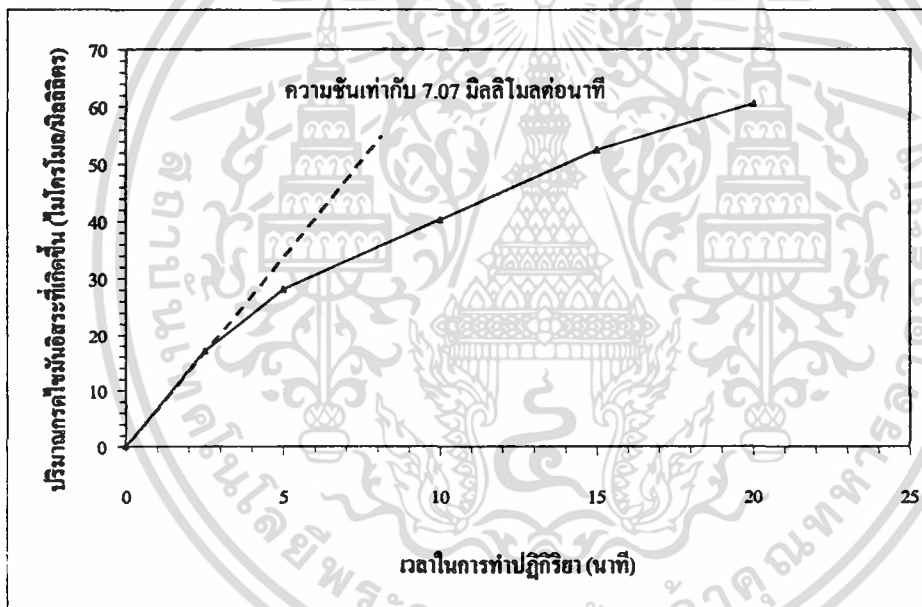


## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa*

จากการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยใช้อิมัลชันของ olive oil เป็นสับสเตรท และติดตามปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส โดยไตเตรทกับสารละลาย NaOH นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าปริมาณกรดไขมันอิสระ (ดูตัวอย่างในการคำนวณในภาคผนวก ข.) นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยากับปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa*

จากภาพที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าค่าความชันของเส้นตรงเท่ากับ 7.07 มิลลิโมลต่ออนาที โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนสับสเตรท (olive oil) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ (กรดไขมันอิสระ) 1 ไมโครโมลต่ออนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และ pH 8.0 ดังนั้นแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* มีค่าเท่ากับ 70 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

ตัวอย่างการคำนวณการใช้ปริมาณเอนไซม์ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลาย ในสารละลาย ปฏิกริยา 50 กรัม

สารละลายปฏิกริยา 1 กรัม ใช้ปริมาณเอนไซม์ 200 ยูนิต

ถ้าสารละลายปฏิกริยา 50 กรัม ใช้ปริมาณเอนไซม์  $\frac{200 \times 50}{1} = 10000$  ยูนิต

จากแอกติวิตีของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 70 ยูนิต ต่อปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิกรัม

ถ้าปริมาณเอนไซม์ 10000 ยูนิต ดังนั้นจะชั่งปริมาณเอนไซม์เท่ากับ  $\frac{10000 \times 1}{70}$

เท่ากับ 143 มิลลิกรัม

#### 4.2 การหาค่า acid value (AV)

จากการทดลองหาค่า acid value (AV) ซึ่งค่า AV หมายถึง จำนวนมิลลิกรัมของ KOH ที่ใช้ในการสะเทิน (neutralize) กรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมัน 1 กรัม โดยในการหาค่า AV ของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหารที่ได้จากการเตรียมโดยวิธี saponification จะ ได้ค่า AV ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่า acid value (AV) ของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร

ชนิดของกรดไขมัน	ค่า acid value (AV)
กรดไขมันจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์	206.10 ± 2.245
กรดไขมันจากน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร	202.52 ± 0.005

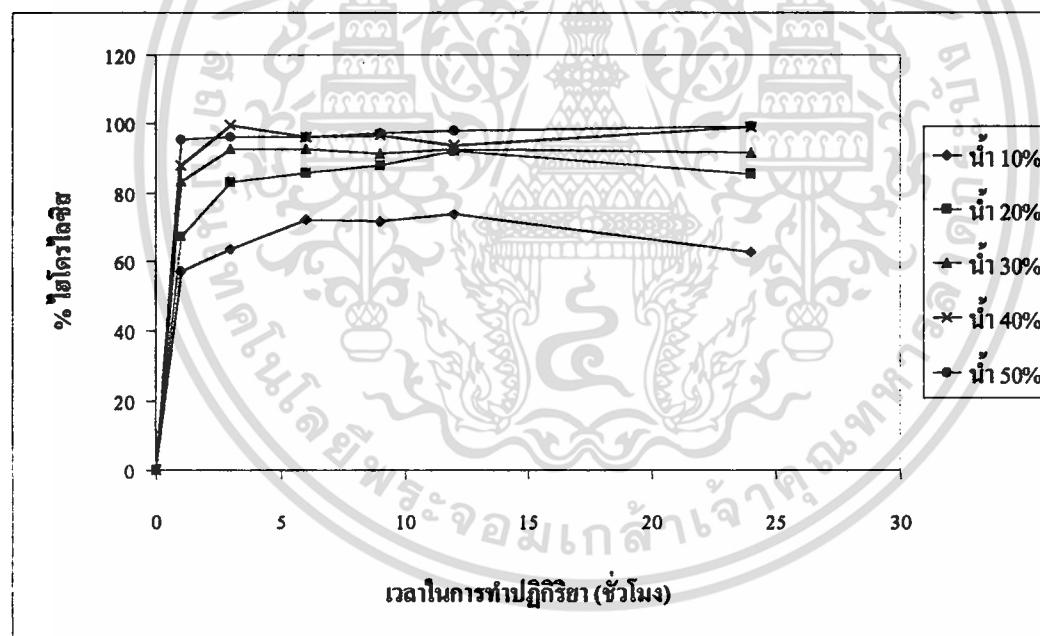
ค่า AV ที่หาได้ในกรณีของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหารดังกล่าวจะนำไปใช้เป็นค่า AV เริ่มต้นในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa*

#### 4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสจาก

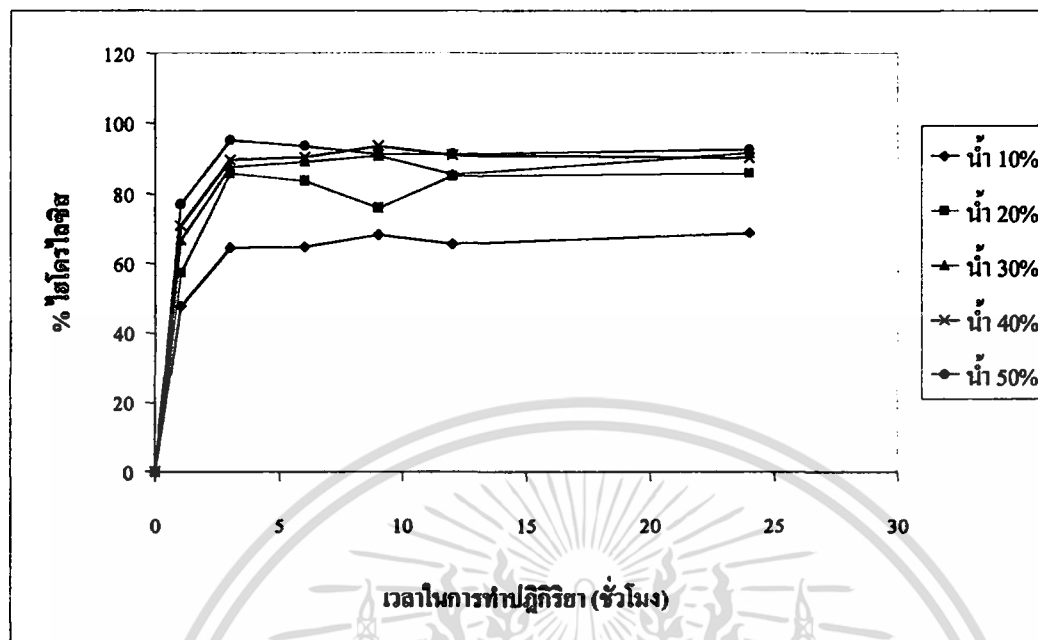
##### *Candida rugosa*

##### 4.3.1 ศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

จากการเตรียมสารละลายปฏิกิริยาโดยชั่ง ตัวอย่างน้ำมันปาล์มและน้ำให้มีน้ำหนักรวมเท่ากับ 70 กรัม และแปรปริมาณน้ำ 5 ระดับ คือ 10 , 20 , 30 , 40 และ 50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา และใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* เท่ากับ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยเก็บตัวอย่างที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 1 , 3 , 6 , 9 , 12 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่า AV และคำนวณเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสโดยใช้ค่า AV ของกรดไขมันอิสระของตัวอย่างน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดที่ได้จากการเตรียมโดยปฏิกิริยา saponification เป็น มาตรฐาน 100% ไฮโดรไลซิส นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสกับเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 4.2 และภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยแปรปริมาณน้ำ



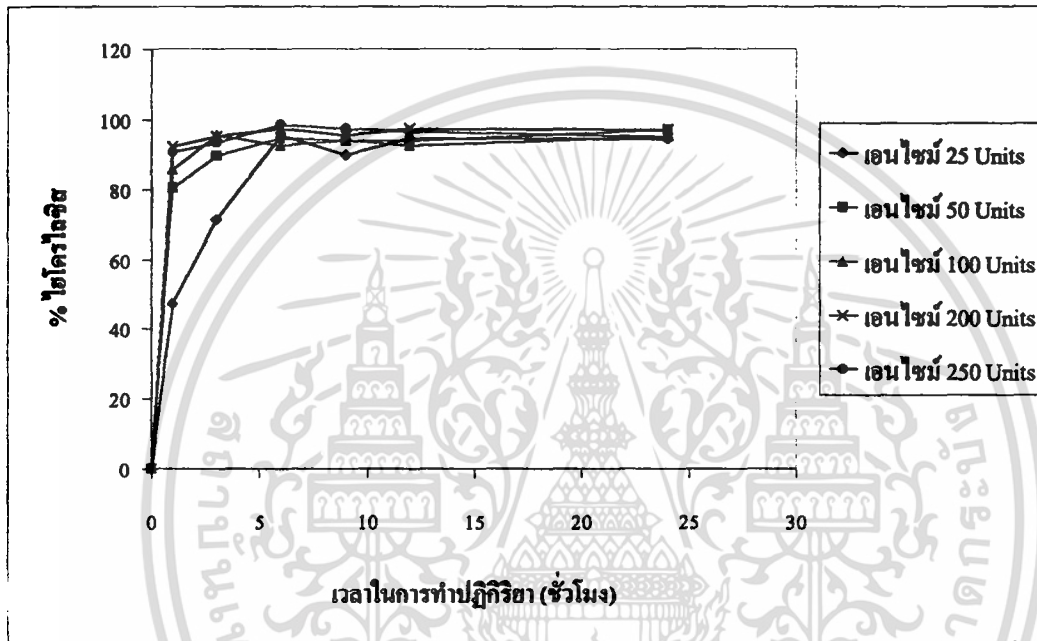
ภาพที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลของน้ำมันเหลืองที่จากการทอดอาหาร โดยแปรปริมาณน้ำ

จากภาพที่ 4.2 และภาพที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาไขมันคอเลสเตอรอลของน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดจะสูงขึ้นด้วย โดยเฉพาะในช่วงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามเมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 40-50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยาให้ค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลมากที่สุด แต่ปริมาณน้ำ 50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยาจะมีผลในขั้นตอนการแยกกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลออกจากกัน เนื่องจากปริมาณน้ำที่มากจะสะสมในชั้นของกลีเซอรอลทำให้เกิดน้ำทิ้งในปริมาณมากที่เป็นมลพิษและไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ดังนั้นปริมาณน้ำที่เหมาะสมที่เลือกใช้ในขั้นตอนต่อไปคือ 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา ซึ่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์มีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลเท่ากับ 98.96% และน้ำมันเหลืองที่จากการทอดอาหารมีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลเท่ากับ 90.17% ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง

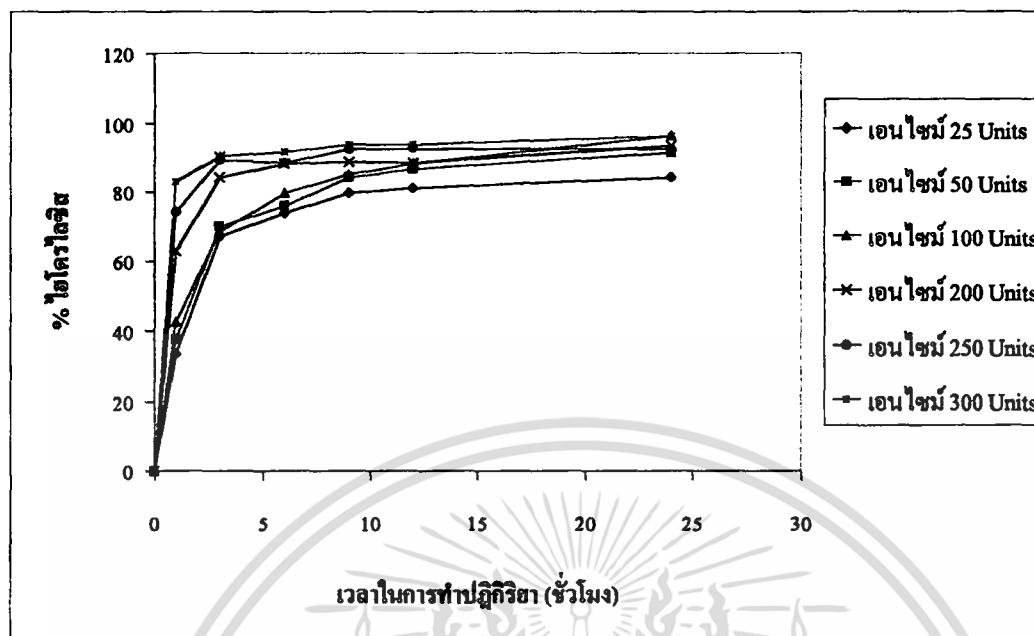
#### 4.3.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาไขมันคอเลสเตอรอล

จากการเตรียมสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างน้ำมันปาล์มและน้ำเท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณน้ำ 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา โดยแปรปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ต่าง ๆ กันคือ 25 , 50 , 100 , 200 และ 250 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นติด-เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามปฏิกิริยาโดยเก็บตัวอย่างที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่า AV และคำนวณเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสโดยใช้ค่า AV ของกรดไขมันอิสระของตัวอย่างน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดที่ได้จากการเตรียมโดยปฏิกิริยา saponification เป็น มาตรฐาน 100% ไฮโดรไลซิส นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสกับเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 4.4 และภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยแปรปริมาณเอนไซม์



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลของน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร โดยแปรปริมาณยีสต์

จากภาพที่ 4.4 และภาพที่ 4.5 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณยีสต์ 200-300 ยูนิต์ต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยาให้ค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลมากที่สุด แต่ปริมาณยีสต์ที่มากเกินไปจะมีผลทำให้สิ้นเปลืองต้นทุนในการผลิต เนื่องจากยีสต์มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นปริมาณยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไขมันคอเลสเตอรอลของน้ำมันทั้ง 2 ชนิดคือ 200 ยูนิต์ต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา โดยที่เมื่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 24 ชั่วโมงน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์มีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลเท่ากับ 97.09% และ น้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหารมีค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลเท่ากับ 93.57%

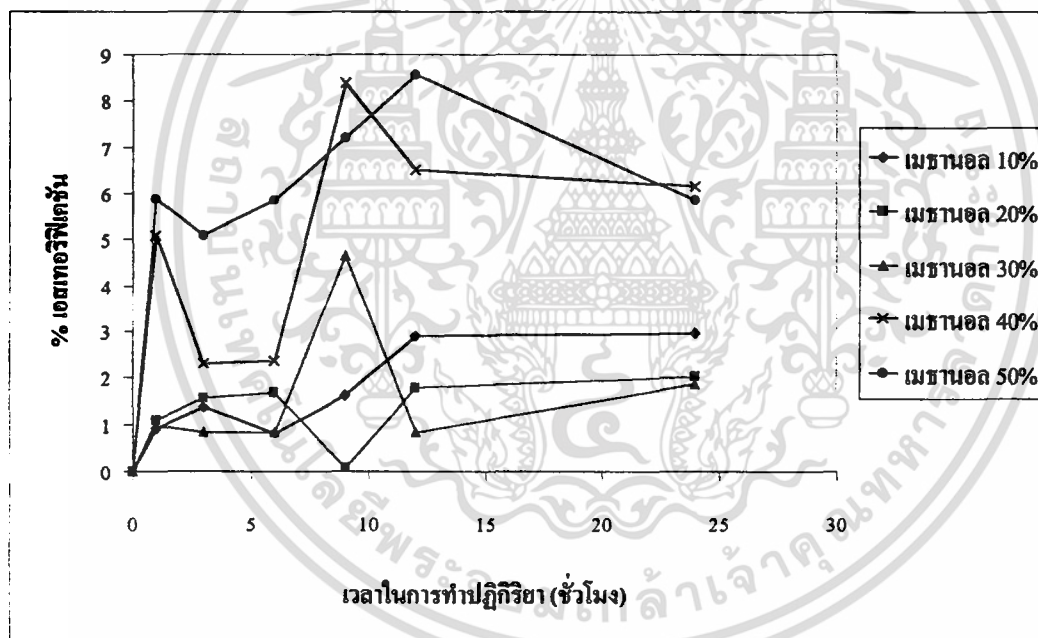
จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไขมันคอเลสเตอรอลของน้ำมันปาล์มโดยยีสต์ไลเปสจาก *Candida rugosa* คือใช้ปริมาณน้ำ 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยาและปริมาณยีสต์ 200 ยูนิต์ต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา โดยที่ยีสต์ไลเปสจาก *Candida rugosa* สามารถเร่งปฏิกิริยาไขมันคอเลสเตอรอลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพกล่าวคือให้ค่าเปอร์เซ็นต์ไขมันคอเลสเตอรอลอยู่ในช่วง 93-97%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

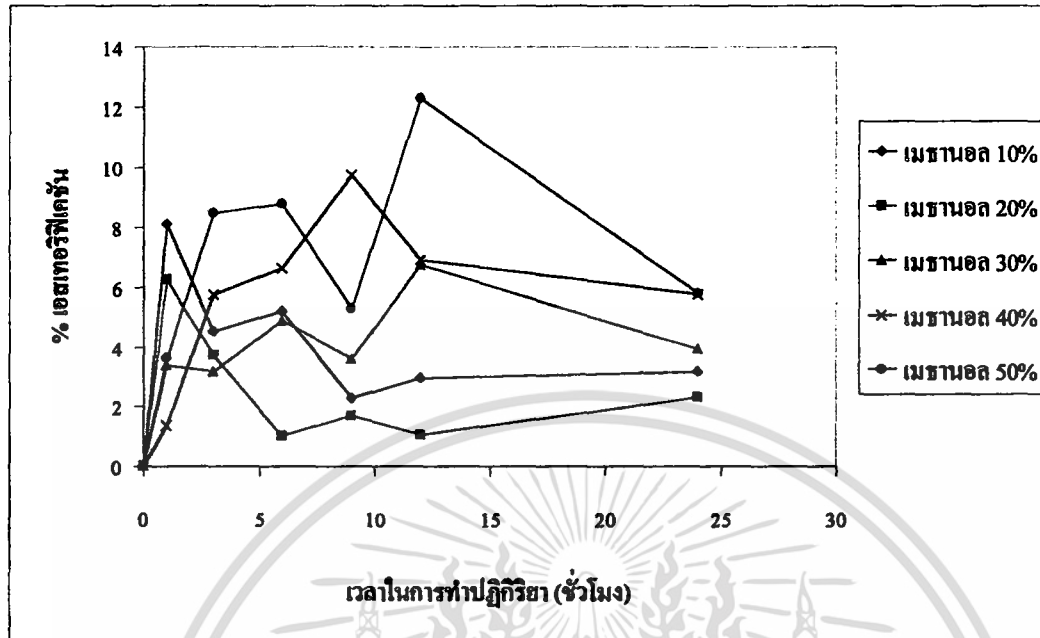
#### 4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

##### 4.4.1 การศึกษาปริมาณเมธานอลที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการเตรียมสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่เตรียมโดยวิธี saponification และเมธานอลเท่ากับ 70 กรัม โดยแปรปริมาณเมธานอล 5 ระดับ คือ 10 , 20 , 30 , 40 และ 50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา และใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* เท่ากับ 200 หน่วยต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นติดตามปฏิกิริยาโดยเก็บตัวอย่างที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 1 , 3 , 6 , 9 , 12 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่า AV และคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ค่า AV เริ่มต้นของสารละลายปฏิกิริยาในแต่ละระดับของปริมาณเมธานอล นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน ดังแสดงในภาพที่ 4.6 และภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยแปรปริมาณเมธานอล



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร โดยแปรปริมาณเมฆานอล

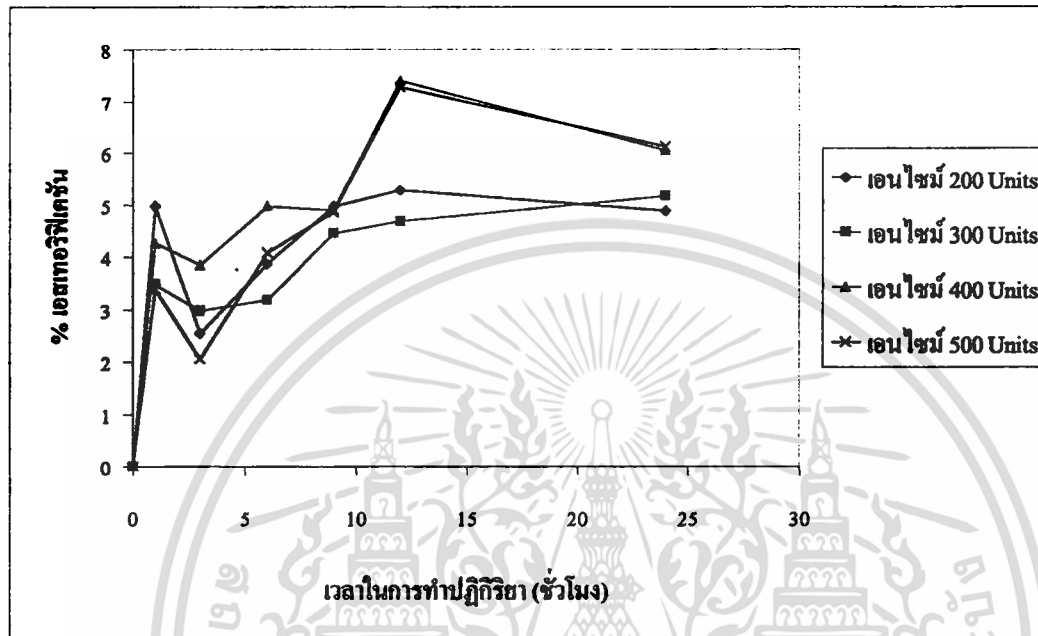
จากภาพที่ 4.6 และภาพที่ 4.7 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณเมฆานอล 40 และ 50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยาให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมากที่สุด แต่ปริมาณเมฆานอลที่มากเกินไปจะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ดังนั้นปริมาณเมฆานอลที่เลือกใช้ในขั้นตอนต่อไปคือ 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา ซึ่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์มีค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 6.15% และน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหารมีค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 5.77%

#### 4.4.2 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการเตรียมสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่เตรียมโดยวิธี saponification และเมฆานอลเท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณเมฆานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา โดยแปรปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ต่าง ๆ กันคือ 200 , 300 , 400 และ 500 หน่วยต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นติดตามปฏิกิริยาโดยเก็บตัวอย่างที่เวลาของปฏิกิริยาเท่ากับ 1 , 3 , 6 , 9 , 12 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่า AV และคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ค่า AV เริ่มต้นของตัวอย่างสารละลายปฏิกิริยาที่ระดับของปริมาณเมฆานอล 40%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยนำหน้าของสารละลายปฏิกิริยา นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน ดังแสดงในภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์โดยแปรปริมาณเอนไซม์

จากภาพที่ 4.8 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ในช่วง 200-500 ยูนิตคือกรัมของสารละลายปฏิกิริยาให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันประมาณ 6.13% ในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ จากการศึกษาระดับเอนไซม์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันต่ำกว่า 20% ดังนั้นในการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหารจึงไม่ได้ศึกษาต่อไปเนื่องจากเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ได้ก็คงไม่ถึง 20% เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน สรุปได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระกับเมธานอลโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ในสภาวะที่ใช้ในการทดลองยังคงมีประสิทธิภาพค่าคือสภาวะที่ดีที่สุดให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันต่ำกว่า 20%

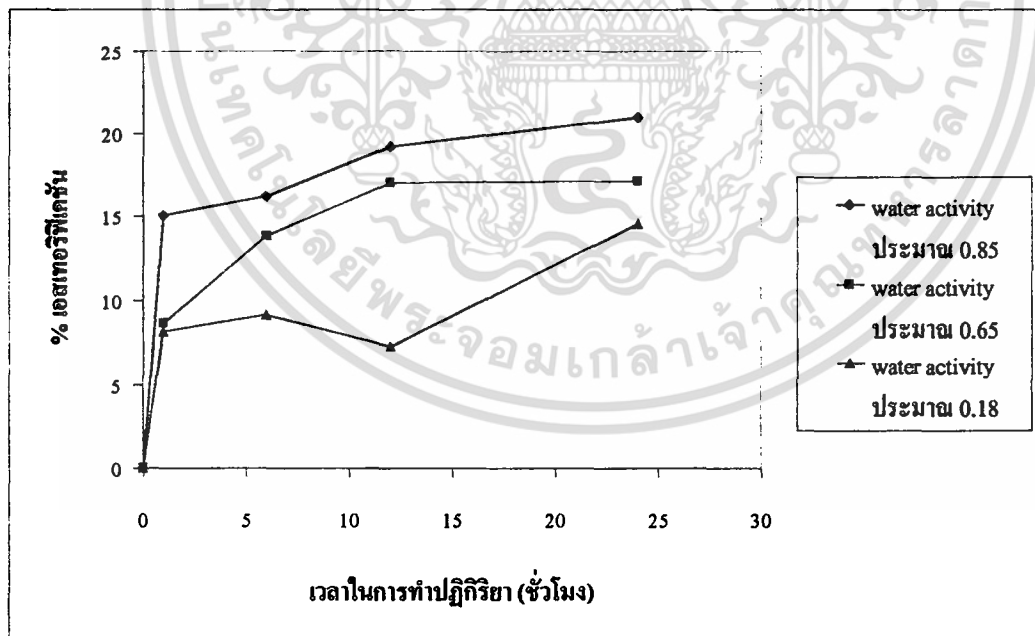
การที่เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันต่ำกว่า 20% อาจเนื่องมาจากสมมติฐานดังต่อไปนี้คือ ปริมาณน้ำที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมีค่าต่ำกว่า 20% จึงได้ศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) ต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันต่อไป

#### 4.4.3 การศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) ต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

การควบคุม water activity ของปฏิกิริยา โดยใช้  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ซึ่งให้ค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.85 ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  มีค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.65 และ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 0\text{H}_2\text{O}$  ให้ค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.18 ที่อุณหภูมิ 30 °C จากการเตรียมสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่เตรียมโดยวิธี saponification และเมธานอลเท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา เติมเกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ในแต่ละชุดการทดลองและเติมเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ปริมาณ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นติดตามปฏิกิริยาโดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 1 , 6 , 12 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่า AV และคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ค่า AV เริ่มต้นของตัวอย่างสารละลายปฏิกิริยาที่ระดับของปริมาณเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน ดังแสดงในภาพที่ 4.9



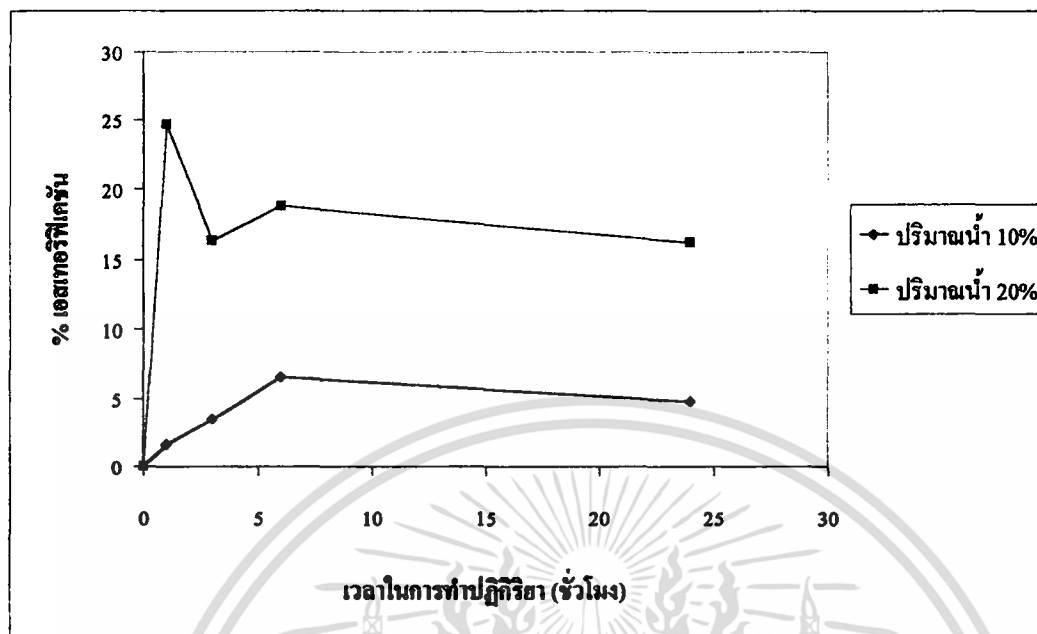
ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของสารละลายปฏิกิริยาที่ควบคุมค่า  $a_w$  โดยใช้เกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

จากภาพที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง การเติมเกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ซึ่งควบคุม  $a_w$  ให้อยู่ที่ประมาณ 0.85 และเป็นค่า  $a_w$  สูงสุดที่ทดลองให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันถึง 21% หลังจากปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ในการศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) นี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำในระบบมากขึ้นจะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมากขึ้นตามไปด้วย

จากผลการทดลองศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) ทำให้ทราบว่าปริมาณน้ำในระบบช่วยให้เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมีค่าเพิ่มขึ้น ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนต่อไปได้ทำการเพิ่มปริมาณน้ำให้กับระบบดังนี้

#### 4.4.4 การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการเตรียมสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่เตรียมโดยวิธี saponification, เมธานอลและน้ำเท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา ซึ่งแปรปริมาณน้ำ 2 ระดับ คือ 10 และ 20% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา เติมเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ปริมาณ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นติดตามปฏิกิริยา โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 1, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่า AV และคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ค่า AV เริ่มต้นที่หาได้โดยน้ำหนักรวมของสารละลายปฏิกิริยา คือ ตัวอย่างกรดไขมันอิสระที่ได้, เมธานอลและน้ำ เท่ากับ 70 กรัม โดยแปรปริมาณน้ำ 2 ระดับคือ 10 และ 20% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน ดังแสดงในภาพที่ 4.10



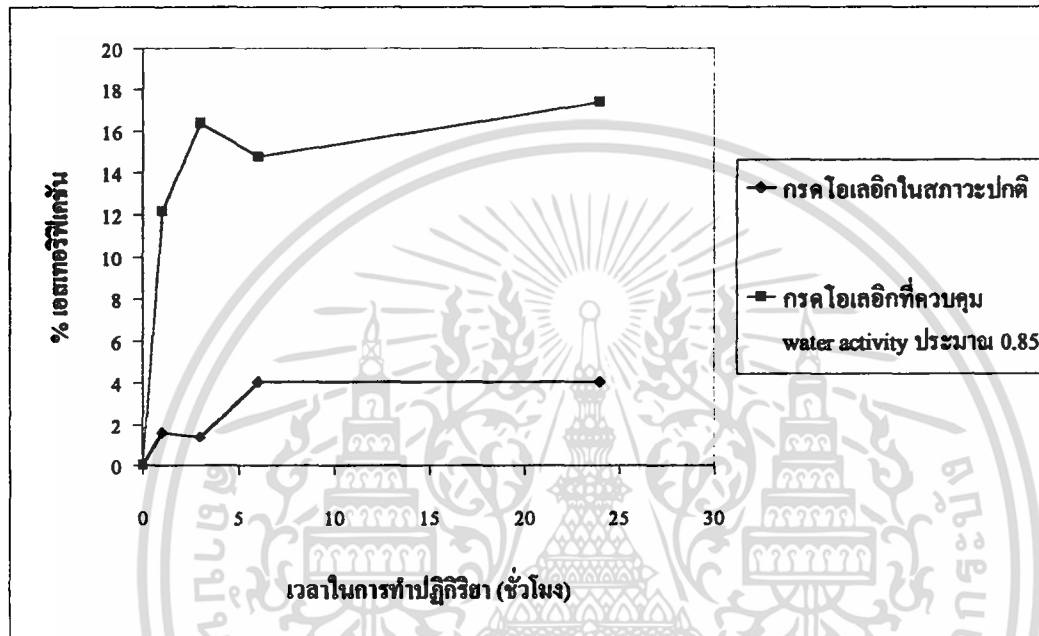
ภาพที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกิริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของปฏิกิริยาที่มีปริมาณน้ำแตกต่างกัน

จากภาพที่ 4.10 จะเห็นได้ว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำ 20% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยาให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันสูงกว่าเมื่อปริมาณน้ำเท่ากับ 10% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา โดยมีค่าเท่ากับ 16.24% อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณน้ำเป็น 20% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยายังให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ต่ำกว่า 20% ดังนั้นปริมาณน้ำอาจไม่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเนื่องจากเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ต่ำกว่า 20% อาจมาจากปัจจัยอื่น เช่น กรดไขมันอิสระที่เตรียมโดยวิธี saponification อาจมีการปนเปื้อนของเฮกเซนจากขั้นตอนการสกัดซึ่งมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ดังนั้นได้มีการศึกษาเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นกรดโอเลอิกบริสุทธิ์ในการทดลองต่อไป

#### 4.4.5 การศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมธานอล

จากการเตรียมสารละลายปฏิกิริยา คือ กรดโอเลอิกและเมธานอลเท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา เติมเกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $a_w \approx 0.85$ ) และอีกชุดการทดลองไม่เติมเกลือ (สภาวะปกติ) จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ปริมาณ 200 ยูนิตต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา จากนั้นติดตามปฏิกิริยาโดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 1, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาค่า AV และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ค่า AV เริ่มต้นที่หาได้โดยน้ำหนักรวมของสารละลาย ปฏิกริยา คือ กรดโอเลอิกและเมธานอลเท่ากับ 70 กรัม โดยใช้ปริมาณเมธานอล 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกริยา นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างเวลาในการทำปฏิกริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน ดังแสดงในภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการทำปฏิกริยาและเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของการศึกษาปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรด โอเลอิกและเมธานอล

จากภาพที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สารละลายปฏิกริยาของกรด โอเลอิกในสภาวะปกติให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 4.05% และสารละลายปฏิกริยาของกรด โอเลอิกที่ใส่เกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 17.41% ซึ่งให้ค่าที่ต่ำกว่า 20% เช่นเดียวกับกรณีของกรดไขมันอิสระที่เตรียมได้จากปฏิกริยา saponification ดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเฮกเซนที่ติดมากับกรดไขมันอิสระที่เตรียมโดยวิธี saponification ไม่ได้เป็นสาเหตุของเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ต่ำ

จากการศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) ต่อปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน , การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและการศึกษาปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรด โอเลอิกและเมธานอล ให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันต่ำกว่า 20% อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ไม่เหมาะสมต่อปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน , อุณหภูมิในการเกิดปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคซีนไม่เหมาะสม หรือปริมาณเมธานอลที่เติมลงในปฏิกริยาอาจมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ  
เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* จึงได้มีการศึกษาต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และน้ำมันปาล์มที่เหลือทิ้งจากการทอดอาหาร และปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดกับเมธานอลโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* พบว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิด โดยแปรปริมาณน้ำกลั่น 5 ระดับ คือ 10 , 20 , 30 , 40 และ 50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยาและแปรปริมาณเอนไซม์ในช่วง 25-300 หน่วยต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา ซึ่งปริมาณน้ำและปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสคือ 40% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา และ 200 หน่วยต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา ตามลำดับ ซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดมีค่าประมาณ 96% แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดี

จากการศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดกับเมธานอล โดยแปรปริมาณเมธานอล 5 ระดับ คือ 10 , 20 , 30 , 40 และ 50% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยาและแปรปริมาณเอนไซม์ในช่วง 200-500 หน่วยต่อกรัมของสารละลายปฏิกิริยา พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ได้ต่ำกว่า 20% อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลของ water activity ( $a_w$ ) ต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ซึ่งให้ค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.85 ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  มีค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.65 และ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 0\text{H}_2\text{O}$  ให้ค่า  $a_w$  เท่ากับ 0.18 ที่อุณหภูมิ 30 °C ในการควบคุม water activity เพื่อให้ปริมาณน้ำในระบบคงที่มีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากผลการศึกษาค่า water activity ทำให้ทราบว่าปริมาณน้ำในระบบช่วยให้เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมีค่าเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยแปรปริมาณน้ำ 2 ระดับ คือ 10 และ 20% โดยน้ำหนักของสารละลายปฏิกิริยา พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 4.77 และ 16.24% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันต่ำกว่า 20% ดังนั้นการปนเปื้อนของเฮกเซนที่ติดมากับกรดไขมันอิสระที่เตรียมโดยวิธี saponification อาจมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ซึ่งอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่าเอสเทอร์ฟิเคชัน จึงได้มีการศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมธานอล จากการทดลองใช้กรดโอเลอิกเป็นสารตั้งต้นเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองได้ศึกษาสภาวะปกติ (ไม่เติมเกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) และในสภาวะที่เติมเกลือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  เพื่อควบคุม water activity พบว่าให้ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 4.05 และ 17.41% ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มทั้งสองชนิดที่เตรียมได้เป็นสารตั้งต้น ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดไขมันกับเมธานอลภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

การที่เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมีค่าต่ำกว่า 20% อาจเนื่องมาจาก

5.2.1 เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ไม่ชอบเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน จึงทำให้เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันมีค่าต่ำกว่า 20% ดังนั้นอาจจะต้องมีการทดลองใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดอื่น ๆ สำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสที่นิยมใช้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Rhizomucor miehei* เป็นต้น (ประพันธ์, 2546)

5.2.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองอาจไม่เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ดังนั้นต้องมีการทดลองเพิ่มอุณหภูมิในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาให้สูงขึ้น (Shimada *et al.*, 2002)

5.2.3 ปริมาณเมธานอลที่เติมลงไปในสารละลายปฏิกิริยามากเกินไป อาจมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ดังนั้นการเติมเมธานอลจะต้องเติมครั้งละปริมาณน้อยเป็นลำดับขั้น (Shimada *et al.*, 2001)

## เอกสารอ้างอิง

กรมอุทกหารเรือ. 2544 . “ไบโอดีเซล” [online]. เข้าถึงได้จาก :

<http://www.navy.mi.th/dockyard/biodiesel.html>

ณัฐพงศ์ เสนาธิบติ และ วิชาน เกียรติอุบลไพบูล. 2544 . “การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดในปาล์ม โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน.” ปรียญณานิพนธ์ . สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม. 2546 . “การผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชโดยกระบวนการทางเอนไซม์” วารสารโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง : หน้า 44-46.

ศิริวรรณ บุรีคำ. 2544 . “ไบโอดีเซล : ทางเลือกใหม่ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิง” [online]. เข้าถึงได้จาก : [http://clgc.rdi.ku.ac.th/newsletter/news15\\_2/biodiesel.html](http://clgc.rdi.ku.ac.th/newsletter/news15_2/biodiesel.html)

สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง. 2546 . “ดีเซลจากพืช ทางเลือกใหม่ของพลังงาน” [online]. เข้าถึงได้จาก : [http://clgc.rdi.ku.ac.th/newsletter/news15\\_2/biodiesel.html](http://clgc.rdi.ku.ac.th/newsletter/news15_2/biodiesel.html)

สุพรรณิ อัสวศิริเลิศ. 2544 . “ผลกระทบทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการใช้น้ำมันพืชทดแทนน้ำมันดีเซล” [online]. เข้าถึงได้จาก : [http://www.baac.or.th/technical/bio\\_diesel.pdf](http://www.baac.or.th/technical/bio_diesel.pdf)

Halling , P.J. 1992 . Salt hydrates for water activity control with biocatalysis in organic media. *Biotechnol. Teahniques* . 6 : 271-276.

Pinsirodom P. , Parkin L.P. 2001 . Lipase assays . *In Current Protocols In Food Analytical Chemistry Volume I* . ( Wrolstad , R.E. et al. eds. ). New York : John Wiley & Sons , Inc.

Shimada, Y., Y.Watanabe, T.Samukawa, H.Noda, and Y.Tominaga,. 1999 . “Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida Antarctica* Lipase” . *J.Am. Oil Chem.Soc.*76(7):789-793.

Watanabe, Y., Y.Shimada, A.Sugihara, H.Noda, and Y.Tominaga,. 2000 . “Continuous Production Of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida Antarctica* Lipase” . *J.Am. Oil Chem.Soc.*77(4):355-360.

Watanabe, Y., Y.Shimada, A.Sugihara, and Y.Tominaga,. 2001 . “Enzymatic Conversion of Waste Edible Oil to Biodiesel Fuel in Fixed-Bed Bioreactor” . *J.Am. Oil Chem.Soc.*78(7):703-707.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Watanabe, Y., Y. Shimada, B. Takashi, N. Ohyagi, and A. Sugihara. 2002 . “Methyl Esterification of Waste Fatty Acids with Immobilized *Candida Antarctica* Lipase”. *J. Oleo Sci.* 51(10):655-661.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก.

## การเตรียมสารเคมีต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

## การเตรียมสารเคมี

## 1. 50 mM Sodium phosphate buffer pH8

ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  มา 27.60 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร (solution A)

ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  มา 53.65 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร (solution B)

นำสารละลาย solution A มา 5.30 มิลลิลิตรและสารละลาย solution B มา 94.70 มิลลิลิตร มาผสมกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร นำมาวัด pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย 0.1N HCl หรือ 0.1N NaOH จะได้ pH เท่ากับ 8 ที่มีความเข้มข้น 100 mM นำสารละลายที่ได้มา 125 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 250 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร เทใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น

## 2. สารละลาย NaOH ในแอลกอฮอล์

ชั่ง NaOH มา 120 กรัม และชั่ง EDTA มา 1.25 กรัม นำสารทั้งสองมาละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอธานอล 400 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด เก็บไว้ในขวดพลาสติก

## ภาคผนวก ข.

การคำนวณปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นในการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์จาก *Candida rugosa*

ตารางที่ 1 ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นที่เวลาแตกต่างกัน

เวลา ( นาที )	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต ( ml )					$\mu\text{mol fatty acid /}$ $\text{ml subsample}$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย	
2.5	3.10	3.10	3.10	3.10	3.10	17.14
5	4.10	4.50	4.10	4.10	4.20	28.22
10	5.50	5.70	5.20	5.20	5.40	40.32
15	6.50	6.80	6.30	6.80	6.60	52.42
20	7.10	7.70	7.10	7.70	7.40	60.48
blank	1.40	1.30	1.40	1.50	1.40	-

หมายเหตุ ในการคำนวณปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น ใช้ค่าปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตเฉลี่ย

## การคำนวณ

สูตรการคำนวณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น

$$\text{ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น} = \frac{(\text{มิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง}) - (\text{มิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต blank}) \times [\text{ความเข้มข้นของ NaOH}] \times 1000}{5 \text{ มิลลิลิตร}}$$

( ไมโครโมล / มิลลิลิตร )

## ตัวอย่างการคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของ NaOH} = 0.05 \text{ N}$$

ที่เวลา 2.5 นาที

มิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างเท่ากับ 3.10 มิลลิลิตร

มิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต blank เท่ากับ 1.40 มิลลิลิตร

แทนค่าสูตร

$$\text{ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น} = \frac{[(3.10 - 1.40) \times 0.05 \times 1000]}{5} = 17.14 \text{ ไมโครโมล / มิลลิลิตร}$$

( ไมโครโมล / มิลลิลิตร )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก.

## การคำนวณค่า Acid value (AV) ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

## ตารางที่ 2 ค่า AV ของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์

ครั้งที่	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	AV (mg/g)
1	1.74	7.50	205.58
2	1.67	7.30	208.48
3	1.74	7.50	205.57
4	1.77	7.60	204.79

## ตารางที่ 3 ค่า AV ของน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร

ครั้งที่	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	AV (mg/g)
1	1.89	8.00	201.88
2	1.74	7.40	202.83
3	1.78	7.60	203.64
4	1.86	7.90	202.56
5	1.75	7.40	201.68

## การคำนวณ

## สูตรการคำนวณค่า Acid value (AV)

$$\text{Acid value (AV)} = \frac{\text{ปริมาณ KOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของ KOH (นอร์มอล)} \times 56.11}{\text{ปริมาณตัวอย่างน้ำมันหรือสารละลายปฏิกิริยาที่ใช้ (กรัม)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ตัวอย่างการคำนวณ

ความเข้มข้นของ KOH = 0.85 N

ครั้งที่ 1

ปริมาณตัวอย่างน้ำมันที่ใช้เท่ากับ 1.74 กรัม

ปริมาณ KOH ที่ใช้เท่ากับ 7.50 มิลลิลิตร

### แทนค่าสูตร

$$\text{Acid value} = \frac{7.50 \times 0.85 \times 56.11}{1.74}$$

$$= 205.58 \text{ มิลลิลิตร / กรัม}$$

ดังนั้นค่า AV ที่ได้จากการคำนวณของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์มาหาค่าเฉลี่ยจะได้ค่า AV ของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส



## ภาคผนวก ง.

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของการศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสที่ปริมาณน้ำแตกต่างกันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์

เวลา (ชม)  ปริมาณ น้ำ (%)	1		3		6		9		12		24	
	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส
10	117.68	57.09	140.96	63.39	148.82	72.21	147.57	71.60	152.14	73.82	129.28	62.72
20	138.31	67.11	171.35	83.14	176.84	85.80	181.21	87.92	189.74	92.06	176.22	85.50
30	171.92	83.42	191.08	92.71	191.22	92.78	188.43	91.43	190.80	92.58	188.60	91.51
40	180.93	87.79	205.16	99.54	198.31	96.22	199.08	96.59	193.06	93.67	203.95	98.96
50	196.40	95.29	198.23	96.18	198.28	96.21	200.02	97.05	201.80	97.91	204.90	99.42

ตารางที่ 5 ค่าเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสที่ปริมาณน้ำแตกต่างกันของน้ำมันเหลืองทิ้งจากการทอดอาหาร

เวลา (ชม)  ปริมาณ น้ำ (%)	1		3		6		9		12		24	
	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส
10	96.89	74.84	130.84	64.61	131.23	64.79	138.19	68.24	132.62	65.48	138.99	68.63
20	116.30	57.43	173.47	85.66	169.15	83.52	153.78	75.93	171.99	84.92	173.84	85.84
30	134.98	66.65	177.59	87.69	180.68	89.22	183.78	90.75	173.38	85.61	185.62	91.66
40	143.69	70.95	181.48	89.61	183.51	90.61	189.74	93.68	184.38	91.04	182.62	90.17
50	156.00	77.03	192.88	95.24	189.74	93.68	184.89	91.29	185.06	91.38	187.46	92.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การคำนวณ

ค่า AV เริ่มต้นของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เท่ากับ	206.10 มิลลิกรัม / กรัม
ค่า AV ที่เวลา 1 ชั่วโมงและปริมาณน้ำ 10% เท่ากับ	118.76 มิลลิกรัม / กรัม

## ตัวอย่างการคำนวณ

ค่า AV เริ่มต้นของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เท่ากับ 206.10 มิลลิกรัม / กรัม มีค่า 100 %

## ไฮโดรไลซิส

ดังนั้น ค่า AV ที่เวลา 1 ชั่วโมงและปริมาณน้ำ 10% เท่ากับ  $\frac{118.76 \times 100}{206.10} = 57.09 \%$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวก จ.**  
**การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสของการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม**  
**ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส**

ตารางที่ 6 ค่าเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสที่ปริมาณเอนไซม์แตกต่างกันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์

เวลา (ชม)	1		3		6		9		12		24	
	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส
25	98.66	47.10	147.56	71.60	197.33	95.74	185.50	90.00	195.40	94.81	194.82	94.53
50	167.54	80.54	185.09	89.81	195.47	94.84	194.09	94.17	193.89	94.08	200.21	97.14
100	176.85	85.81	197.35	95.75	191.13	92.74	194.55	94.40	191.22	92.78	196.40	95.29
200	191.85	92.58	196.43	95.31	201.10	97.57	197.27	95.72	200.70	97.38	200.11	97.09
250	188.36	90.86	192.83	93.56	203.13	98.56	200.11	97.52	199.16	96.63	196.26	95.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ค่าเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิสที่ปริมาณเอนไซม์แตกต่างกันของน้ำมันเหลืองที่งอกจากการทอด  
อาหาร

เวลา (ชม)	1		3		6		9		12		24	
	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส	ค่าAV (mg/g)	% ไฮโดร ไลซิส
25	68.39	33.77	135.55	66.93	149.90	74.02	161.28	79.64	164.33	81.14	170.76	84.32
50	76.33	37.69	141.63	69.93	154.01	76.05	170.59	84.23	175.48	86.65	184.98	91.34
100	86.22	42.57	138.88	68.58	161.44	79.72	172.00	84.93	178.55	88.16	195.40	96.48
200	127.01	62.71	170.41	84.14	178.77	88.27	179.82	88.79	178.92	88.35	189.49	93.57
250	150.36	74.24	181.00	89.37	178.92	88.35	187.37	92.52	187.91	92.69	187.46	92.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ฉ.

## การคำนวณค่า AV เริ่มต้นของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ตารางที่ 8 ค่า AV เริ่มต้นของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่ปริมาณเมฆานอดแตกต่างกันของน้ำมัน  
ปาล์มบริสุทธิ์

ปริมาณ เมฆานอด (%)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			AV เริ่มต้น ค่า (mg/g)
	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	ค่า AV (mg/g)	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	ค่า AV (mg/g)	
10	0.60	2.20	174.28	0.53	1.95	174.88	173.08
	0.66	2.40	172.84	1.20	4.30	170.32	
20	0.57	1.90	158.45	0.52	1.70	155.39	156.91
	0.52	1.70	155.39	0.60	2.00	158.44	
30	0.72	2.20	145.23	0.61	1.80	140.25	143.99
	0.63	1.90	143.35	0.63	1.95	147.12	
40	0.56	1.50	127.31	0.54	1.45	127.63	127.71
	0.59	1.60	128.89	0.58	1.55	127.02	
50	0.53	1.25	112.10	0.57	1.30	108.40	110.13
	0.56	1.30	110.34	0.52	1.20	109.69	

## การคำนวณ

สูตรการคำนวณค่า Acid value (AV)

$$\text{Acid value (AV)} = \frac{\text{ปริมาณ KOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของ KOH (นอร์มอล)} \times 56.11}{\text{ปริมาณตัวอย่างน้ำมันหรือสารละลายปฏิกิริยาที่ใช้ (กรัม)}}$$

## ตัวอย่างการคำนวณ

ความเข้มข้นของ KOH = 0.85 N

ครั้งที่ 1

ปริมาณเมฆานอด 10 % ปริมาณตัวอย่างน้ำมันที่ใช้เท่ากับ 0.60 กรัม

ปริมาณ KOH ที่ใช้เท่ากับ 2.20 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แทนค่าสูตร

$$\text{Acid value (AV)} = \frac{2.20 \times 0.85 \times 56.11}{0.60} = 174.28 \text{ mg/g}$$

ดังนั้นนำค่า AV ที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 มาหาค่าเฉลี่ยจะได้ค่า AV เริ่มต้นของปริมาณเมฆานอล 10%

ตารางที่ 9 ค่า AV เริ่มต้นของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่ปริมาณเมฆานอลแตกต่างกันของน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร

ปริมาณเมฆานอล (%)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			AV เริ่มต้น (mg/g)
	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	ค่า AV (mg/g)	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	ค่า AV (mg/g)	
10	0.63	2.30	173.53	0.54	2.00	176.04	174.61
	0.53	1.95	174.88	0.56	2.05	174.00	
20	0.63	2.15	162.21	0.64	2.15	159.67	160.76
	0.55	1.85	159.88	0.56	1.90	161.27	
30	0.60	1.90	150.51	0.52	1.60	146.25	148.67
	0.64	2.00	148.53	0.70	2.20	149.38	
40	0.60	1.60	126.75	0.58	1.55	127.02	126.11
	0.91	2.40	125.36	0.55	1.45	125.31	
50	0.65	1.55	113.34	0.55	1.30	112.35	111.43
	0.54	1.25	110.02	0.54	1.25	110.02	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของการศึกษาปริมาณเมธานอลที่เหมาะสมในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ตารางที่ 10 ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ปริมาณเมธานอลแตกต่างกันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์

เวลา (ชม)	1		3		6		9		12		24	
	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication
10	171.79	0.92	170.71	1.37	171.65	0.82	170.26	1.63	168.05	2.91	167.96	2.96
20	155.20	1.09	154.45	1.57	154.28	1.68	156.78	0.08	154.09	1.79	153.74	2.02
30	142.59	0.97	142.79	0.84	142.78	0.84	137.29	4.65	141.15	0.84	141.30	1.87
40	121.20	5.09	124.08	2.30	124.69	2.36	116.99	8.39	119.39	6.51	119.85	6.15
50	103.65	5.88	104.52	5.09	103.66	5.87	102.18	7.22	100.69	8.57	103.67	5.87

ตารางที่ 11 ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ปริมาณเมฆานอลแตกต่างกันของน้ำมันเหลือทิ้งจากการทอดอาหาร

เวลา (ชม)	1		3		6		9		12		24	
	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication
10	160.43	8.12	166.66	4.55	165.49	5.22	170.60	2.30	169.43	2.97	169.04	3.19
20	150.68	6.27	154.76	3.73	159.11	1.03	158.05	1.69	159.08	1.05	157.03	2.32
30	143.61	3.40	143.95	3.17	141.36	4.92	143.29	3.62	138.60	6.77	142.80	3.95
40	124.39	1.36	118.83	5.77	117.73	6.64	113.78	9.78	117.39	6.91	118.83	5.77
50	107.35	3.66	101.97	8.49	101.62	8.80	105.50	5.32	97.74	12.29	104.94	5.82

## การคำนวณ

สูตรการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน} = \frac{AV_{\text{เริ่มต้น}} - AV_{\text{ที่เวลาใดๆ}}}{AV_{\text{เริ่มต้น}}} \times 100$$

\* เป็น  $AV_{\text{เริ่มต้น}}$  ของชั้นไขมันที่ได้จากการหึ่งแยกสารละลายปฏิกิริยาที่แต่ละระดับ

## ปริมาณเมธานอล

ตัวอย่างการคำนวณ ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์

ความเข้มข้นของ KOH = 0.85 N

ค่า AV เริ่มต้นที่ปริมาณเมธานอล 10% เท่ากับ 173.08 mg/g

ค่า AV ที่เวลา 1 ชั่วโมง ปริมาณเมธานอล 10% เท่ากับ 171.49 mg/g

## แทนค่าสูตร

$$\begin{aligned} \text{เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน} &= \frac{173.08 - 171.79}{173.08} \times 100 \\ &= 0.92\% \end{aligned}$$

ภาคผนวก ซ.

การคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของการศึกษาเอนไซม์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ตารางที่ 12 ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ปริมาณเอนไซม์แตกต่างกันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์

เวลา (ชม)	1		3		6		9		12		24	
	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication
200	121.35	4.98	124.46	2.54	122.75	3.88	121.34	4.98	120.96	5.28	121.46	4.89
300	123.26	3.48	123.91	2.98	123.64	3.18	122.02	4.46	121.72	4.69	121.12	5.16
400	122.26	4.26	122.78	3.86	121.35	4.98	121.44	4.91	118.27	7.39	119.97	6.06
500	123.36	3.40	125.06	2.07	122.48	4.09	121.48	4.87	118.42	7.27	119.87	6.13

## การคำนวณ

สูตรการคำนวณ ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน} = \frac{AV_{\text{เริ่มต้น}} - AV_{\text{ที่เวลาใดๆ}}}{AV_{\text{เริ่มต้น}}} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณ ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันจากน้ำมันพืชบริสุทธิ์

ความเข้มข้นของ KOH = 0.85 N

ค่า AV เริ่มต้นที่ปริมาณเมธานอล 40% เท่ากับ 127.71 mg/g

ค่า AV ที่เวลา 1 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ 200 ยูนิต เท่ากับ 121.35 mg/g

แทนค่าสูตร

$$\begin{aligned} \text{เปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชัน} &= 127.71 - 121.35 \\ &= \frac{6.36}{127.71} \times 100 \\ &= 4.98\% \end{aligned}$$

## ภาคผนวก ฉ.

การคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันของผลค่า water activity ( $a_w$ ) ต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ตารางที่ 13 ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ water activity ( $a_w$ ) แตกต่างกัน

เวลา (ชม)	1		6		12		24	
	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication	ค่าAV (mg/g)	% Esteri fication
$a_w \approx 0.85$	108.49	15.05	106.99	16.22	103.12	19.25	100.89	21.00
$a_w \approx 0.65$	116.60	8.69	110.03	13.85	105.95	17.04	105.82	17.14
$a_w \approx 0.18$	117.28	8.17	115.96	9.20	118.41	7.29	109.09	14.58

หมายเหตุ การคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันใช้ค่า AV เริ่มต้นที่ปริมาณเมธานอล 40% และ  
คำนวณเหมือนภาคผนวกที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น

ภาคผนวก ฉ.  
การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ตารางที่ 14 ค่า AV เริ่มต้นของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่ปริมาณน้ำแตกต่างกัน

ปริมาณน้ำ ที่เติม (%)	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			AV เฉลี่ย (mg/g)
	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	ค่า AV (mg/g)	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	ค่า AV (mg/g)	
10	0.52	1.35	123.40	0.51	1.35	125.82	124.23
	0.65	1.70	124.31	0.52	1.35	123.40	
20	0.52	1.65	150.82	0.51	1.65	153.78	152.36
	0.54	1.75	154.03	0.52	1.65	150.82	

**หมายเหตุ** จำนวนค่า AV เหมือนภาคผนวกที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น

ตารางที่ 15 ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ปริมาณน้ำแตกต่างกัน

เวลา (ชม) ปริมาณ น้ำ (%)	1		3		6		24	
	ค่า AV (mg/g)	% Esteri fication	ค่า AV (mg/g)	% Esteri fication	ค่า AV (mg/g)	% Esteri fication	ค่า AV (mg/g)	% Esteri fication
10	122.22	1.62	119.95	3.45	116.15	6.50	118.31	4.77
20	114.72	24.70	127.46	16.34	123.72	18.80	127.61	16.24

**หมายเหตุ** การคำนวณเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันใช้ค่า AV เริ่มต้นจากตารางที่ 14 และคำนวณ  
เหมือนภาคผนวกที่ได้กล่าวมาแล้ว

## ภาคผนวก ก.

## การศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมธานอล

ตารางที่ 16 ค่า AV เริ่มต้นของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้กรดโอเลอิกเป็นสารตั้งต้น

กรดโอเลอิก	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			AV เริ่มต้น (mg/g)
	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	ค่า AV (mg/g)	น้ำมัน (g)	KOH (ml)	ค่า AV (mg/g)	
1	0.52	1.50	137.11	0.68	1.90	132.81	135.39
2	0.53	1.50	134.52	0.52	1.50	137.11	

หมายเหตุ จำนวนค่า AV เหมือนภาคผนวกที่ได้กล่าวมาแล้ว

ตารางที่ 17 ค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันที่สภาวะแตกต่างกัน

สภาวะในการทดลอง	1		3		6		24	
	ค่า AV (mg/g)	%Esterification	ค่า AV (mg/g)	%Esterification	ค่า AV (mg/g)	%Esterification	ค่า AV (mg/g)	%Esterification
ควบคุม $a_w \approx 0.85$	133.25	12.18	113.22	16.37	115.39	14.77	111.82	17.41
สภาวะปกติไม่เติมเกลือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	118.90	1.58	133.53	1.37	129.92	4.04	129.90	4.05

หมายเหตุ จำนวนค่าเปอร์เซ็นต์เอสเทอร์ฟิเคชันใช้ค่า AV เริ่มต้นจากตารางที่ 16 และจำนวนเหมือนภาคผนวกที่ได้กล่าวมาแล้ว

## ประวัติผู้เขียน

### 1. นางสาวสุรชนี หิมารัตน์

เกิดเมื่อวันที่ 11 ตุลาคม พ.ศ. 2525

ภูมิลำเนา จังหวัด นครปฐม

การศึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ปี พ.ศ. 2548

จากโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 2. นายอภิสิทธิ์ กลั่นบางแก้ว

เกิดเมื่อวันที่ 26 กันยายน พ.ศ. 2525

ภูมิลำเนา จังหวัด สมุทรปราการ

การศึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ปี พ.ศ. 2548

จากโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้