การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. เร่งปฏิกิริยาด้วยยีสต์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*

นางสาววรรณิศา ลีลารุจิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

BIODIESEL PRODUCTION FROM PHYSIC NUT *Jatropha curcas* L. OIL CATALYZED BY YEAST *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*

Miss Wannisa Leelaruji

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. เร่งปฏิกิริยาด้วยยีสต์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*
โดย	นางสาววรรณิศา ลีลารุจิ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…………………………………………..คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……………………………………………ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

…………………………………………... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

……………………………………………อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ)

……………………………………………กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

……………………………………………กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมภูนุช วิรุณานนท์)

……………………………………………กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นาวาเอก ดร. สมัย ใจอินทร์)

นางสาว วรรณิศา ลีลารุจิ : การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. เร่งปฏิกิริยาด้วยยีสต์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ, 80 หน้า.

การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* แบบทั้งเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการนำยีสต์ *A. pullulans* มาเร่งปฏิกิริยา คือชั่วโมงที่ 96 หลังจากเริ่มเลี้ยงยีสต์ *A. pullulans* ในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพสหรือช่วงกลางของระยะคงที่ สามารถวัดค่ากิจกรรมของไลเพส และค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดได้เท่ากับ 7.61±0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 9.67±1.21 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ คือ ที่อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง พบว่าการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 71.8±2.8 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มอุณหภูมิ และอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลเกินกว่าจุดที่เหมาะสม ส่งผลให้การเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์มีปริมาณลดลง เนื่องจากระดับอุณหภูมิ และความเข้มข้นของเมทานอลที่สูงเกินไปจะทำให้ไลเพสซึ่งเป็นโปรตีนเกิดการเสียสภาพ และไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นวิธีการผลิตไบโอดีเซลที่มีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับต้นทุนในการทำปฏิกิริยาที่ต่ำ อันเป็นผลมาจากสารตั้งต้น น้ำมันสบู่ดำเป็นน้ำมันที่รับประทานไม่ได้ มีราคาถูก การทำปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิและปริมาณเมทานอลที่ไม่สูง จึงไม่สิ้นเปลืองต้นทุนในการจัดเตรียม และที่สำคัญตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ มีต้นทุนในการจัดเตรียมที่ต่ำกว่าการใช้ไลเพสทางการค้าเนื่องจากไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และการตรึงบนตัวค้ำจุนที่มีต้นทุนในการเตรียมที่สูง

สาขาวิชา........เทคโนโลยีชีวภาพ....... ลายมือชื่อนิสิต……………………………………………..
ปีการศึกษา.............2555............... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก…………………...
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม……………………

5372465723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: LIPASE / *Aureobasidium pullulans* / BIODIESEL / PHYSIC NUT OIL

WANNISA LEELARUJI: BIODIESEL PRODUCTION FROM PHYSIC NUT *Jatropha curcas* L. OIL CATALYZED BY YEAST *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum.* ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: RUNGTIWA PIAMTONGKAMB, Ph.D., 80 pp.

The results of biodiesel production from physic nut oil (*Jatropha curcas* L.) using transesterification reaction catalyzed by whole cell yeast *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* showed that the optimal time for using *A. pullulans* as a catalyst was 96 hours after cultured in lipase production medium or at the mid log phase. The highest lipase activity and specific activity of *A. pullulans* was 7.61±0.15 unit/ml and 9.67±1.21 Unit/mg protein, respectively. The optimal temperature and physic nut oil to methanol molar ratio of transesterification reaction catalyzed by yeast *A. pullulans* var. *melanogenum* was 30 °C and 1:3, respectively at 72 hours. The highest biodiesel or methyl ester conversion rate was 71.8±2.8 percent. Increasing of temperature and physic nut oil to methanol molar ratio beyond the optimal point reduced biodiesel yield because it's denatured lipase and made it inactivated. Biodiesel production from physic nut oil using transesterification reaction catalyzed by yeast *A. pullulans* is low cost and cost efficiently way to produce biodiesel because physic nut oil is unedible oil. Transesterification reaction can be done in low temperature and oil: methanol molar ratio that help decreased the cost for fuel and methanol. Finally, whole cell yeast *A. pullulans* is a low cost catalyst because it's not need further expensive process of purification and immobilization.

Field of study: ...BIOTECHNOLOGY... Student's Signature.......................................
Academic year: ....2012............Advisor's Signature......................................
Co-advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความสนับสนุน และความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า เพื่อให้คำแนะนำ แนะแนวทางในการทำวิจัยตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่เสมอมา

กราบขอบพระคุณ ดร. รุ่งทิวา เปี่ยมทองคำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อคิดเห็นตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ และเป็นกำลังใจจนงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และอาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ ดร. ชมภูนุช วิรุณานนท์ และนาวาเอก ดร. สมัย ใจอินทร์ ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็น ที่มีส่วนสำคัญในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ จุฬาลักษณานุกูล ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่ดี และเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

นอกจากนี้ขอขอบคุณ สาขาหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือ ทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ และกำลังใจดีๆ จากเจ้าหน้าที่พี่เอื้อย พี่ปลา พี่ฝน ในการติดต่อประสานงานต่างๆ

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ นายธนธร วิทิตศานต์ ที่กรุณาให้ตัวอย่างยีสต์ที่ข้าพเจ้านำมาใช้ในการทดลองตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำ แนวทางการแก้ไขปัญหา และข้อเสนอแนะที่ดี

ขอขอบคุณ นางสาวมนต์ณัฐ ธีระชาติ นางสาวชินพร วงศ์วัฒนไพบูลย์ และนางสาวกิ่งแก้ว พิริยะคณานนท์ รุ่นพี่ ผู้ที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณ นางสาวภาวดี บัวทอง สำหรับมิตรภาพ กำลังใจ คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดเห็นต่างๆ ความช่วยเหลือมากมายทุกๆ ด้านมาโดยตลอดจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

และขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ โบ และครอบครัว ที่คอยให้ความรัก ความเอาใจใส่ สนับสนุน ผลักดัน คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาข้อคิดที่ดี และความห่วงใยเสมอมาแก่ข้าพเจ้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย. .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ.......... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง.......... ฎ

สารบัญภาพ.......... ฏ

บทที่ 1 บทนำ.......... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.......... 4

2.1 ไบโอดีเซล.......... 4

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล.......... 5

2.3 สบู่ดำ.......... 6

2.4 วิธีการผลิตและการนำไบโอดีเซลมาใช้ 9

2.5 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน.......... 10

2.7 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบใช้สารเคมีเป็นตัวเร่ง.......... 11

2.8 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.......... 12

2.9 ไลเพส (lipase) 15

2.10 ประโยชน์ของไลเพส 17

2.11 แหล่งที่มาของไลเพส 18

2.12 กระบวนการผลิตไลเพส.......... 19

2.13 ไลเพสแบบภายนอกเซลล์ และไลเพสแบบภายในเซลล์.......... 19

2.14 ไลเพสทางการค้า โนโวไซม์ 435 (Novozym 435) 21

2.15 ไลเพสทางการค้า ไลโปไซม์ คาลบี แอล (Lipozyme CALB L) 22

2.16 ยีสต์ (yeast).......... 23

2.17 ยีสต์แบบทั้งเซลล์ (whole cell yeast).......... 24

2.18 *Aureobasidium pullulans* 25

2.19 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน 26

2.20 ผลของแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน.......... 26

หน้า

2.21 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 27

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 29

วัสดุอุปกรณ์ 29

สารเคมี 30

วิธีการดำเนินงานวิจัย 32

3.1 การวัดอัตราการเจริญเติบโตและกิจกรรมของไลเพส และปริมาณโปรตีนของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* เมื่อใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นตัวชักนำ 32

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 32

3.1.2 การทดสอบการผลิตไลเพสของยีสต์ 32

3.1.3 การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ 33

3.1.4 การเตรียมหัวเชื้อ และการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลเพส 33

3.1.5 การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส 34

3.1.6 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 34

3.1.7 วิเคราะห์กิจกรรมของไลเพส 35

3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเซลล์ยีสต์แบบทั้งเซลล์ ด้วยการหาอัตราส่วนการเติมเมทานอลและอุณหภูมิในการผลิตไบโอดีเซล 35

3.2.1 การเตรียมตัวเร่งทางชีวภาพไลเพส โดยยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ 36

3.2.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล 36

3.2.3 ศึกษาปริมาณอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล 37

หน้า

3.2.4 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากผล
การวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค
โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง 38
3.2.4.1 การเตรียมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว
แบบสมรรถนะสูง (Shimadzu LC-20 A series, Japan) 38
3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดโครมาโทกราฟี
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง 38
3.2.5 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ เมทานอลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิค
แก๊สโครมาโทกราฟี.. 38
3.2.5.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดโครมาโทกราฟี
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง 39
3.2.5.2 การเตรียมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว
แบบสมรรถนะสูง (Shimadzu AOC-20i, Japan) 39
3.3 ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ ในขวดรูปชมพู่
ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร 39
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 40
4.1 หาอัตราการเจริญเติบโตและกิจกรรมของไลเพสและปริมาณ
โปรตีนของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum*
เมื่อใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นตัวชักนำ.. 40
4.1.1 ผลการศึกษาการผลิตไลเพสเชิงคุณภาพของยีสต์ใน
อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง 40
4.1.2 การเจริญเติบโตของยีสต์ในอาหารเหลวสูตรสำหรับ
เลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ 41
4.1.3 การเจริญเติบโตของยีสต์ในอาหารเหลวสูตรสำหรับ
เลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส 42
4.1.4 การวัดปริมาณโปรตีนของยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว
สูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส 43

หน้า

4.1.5 การวัดค่ากิจกรรมของไลเพสจากยีสต์ที่เลี้ยงใน
อาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส 43
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ของเซลล์ยีสต์แบบทั้งเซลล์ ด้วยการหาอัตราส่วนการเติมเมทานอล
และอุณหภูมิในการผลิตไบโอดีเซล 46
4.2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา
ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เพื่อผลิต ไบโอดีเซล 46
4.2.2 การศึกษาอัตราส่วนโดยโมลต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อ
การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล 49
4.3 ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ ในขวดรูปชมพู่
ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร 52
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 56
รายการอ้างอิง 57
ภาคผนวก 64
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 65
ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมี 67
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน 68
ภาคผนวก ง การคำนวณ 72
ภาคผนวก จ ข้อมูล 77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 80

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณสมบัติของไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล.. 4

2.2 ปริมาณน้ำมัน และไขมันที่ผลิตได้รวมจากทั่วโลก.. 5

2.3 ตัวอย่างปริมาณผลผลิตสูงสุดที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จากวัตถุดิบ ประเภทน้ำมันพืชต่างๆ.. 6

2.4 คุณสมบัติน้ำมันสบู่ดำเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล... 9

2.5 เปรียบเทียบการใช้ด่างและไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.. 13

2.6 เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เร่งด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ และเคมี.. 14

2.7 ตัวอย่างที่มาของไลเพสและสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสชนิดนั้น.......... 16

2.8 ตัวอย่างการนำไลเพสไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น.............. 18

2.9 คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ทางการค้าโนโวไซม์ 435.. 21

2.10 คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ทางการค้าไลโปไซม์ คาลบี แอล.................................... 22

2.11 ผลเปรียบเทียบค่ากิจกรรมไลเพสจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ... 25

4.1 การเปรียบเทียบผลของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์และไลเพสที่ผ่าน การตรึงเป็น ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.......................... 55

ค-1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล 0-20 ไมโครกรัม....... 69

ค-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของ BSA 0-25 ไมโครกรัม.......................... 71

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ต้น ผล และเมล็ดสบู่ดำ.. 7
2.2 (บนซ้าย) เครื่องคั้นน้ำมันสบู่ดำ (บนขวา) น้ำมันสบู่ดำ (ล่าง) กากเมล็ดสบู่ดำ............ 8
2.3 ปฏิกิริยาการเกิดทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน..10
2.4 ปฏิกิริยาการเกิดสบู่ (saponification).. 12
2.5 ตัวอย่างปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Diacyglyceride
และกรดไขมัน..17
2.6 ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส หรือทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของ
ไตรกลีเซอไรด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทิลเอสเทอร์ และกลีเซอรอล................................... 17
2.7 (ซ้าย) เอนไซม์ทางการค้าโนโวไซม์ 435
(ขวา) เอนไซม์ทางการค้าไลโปไซม์ คาลบี แอล.. 22
4.1 ภาพซ้ายแสดงลักษณะของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง
ภาพกลางแสดงลักษณะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่เติมโรดามีน บี
ภาพขวาแสดงการผลิตไลเพสของยีสต์ จากการเกิดการเรืองแสงสีส้ม
เมื่อส่องดูภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต.. 40
4.2 อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ *A. pullulans* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว
สูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ ในช่วงระยะเวลาที่ 0–120 ชั่วโมง......................... 42
4.3 กิจกรรมจำเพาะของไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว
สูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส ในช่วงระยะเวลาที่ 0-120 ชั่วโมง............................. 44
4.4 ค่าล็อกจำนวนเซลล์เปรียบเทียบกับค่าอัตราการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์
ในช่วงอุณหภูมิที่ 25–50 องศาเซลเซียส ที่ชั่วโมงที่ 72... 47
4.5 ค่าล็อกจำนวนเซลล์เปรียบเทียบกับค่าอัตราการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์
ในช่วงอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6
และ 1:7 ชั่วโมงที่ 72.. 51
4.6 การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ เปรียบเทียบกับปริมาณเมทานอล
ที่เหลืออยู่กับปริมาณเซลล์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล
1:3 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตรปริมาตร 200 มิลลิลิตร.............................. 54

ภาพที่ หน้า

ค-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอลปริมาณ 0-20 ไมโครกรัม……………......................68

ค-2 กราฟมาตรฐานของ BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-25 ไมโครกรัม...................................... 70

จ-1 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่เวลา 0 ชั่วโมง...77

จ-2 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่เวลา 24 ชั่วโมง...78

จ-3 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่เวลา 48 ชั่วโมง...78

จ-4 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่เวลา 72 ชั่วโมง...79

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโลกเรามีความต้องการพลังงานจากเชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้นและการเผาไหม้เชื้อเพลิงในรูปแบบเก่าหรือเชื้อเพลิงฟอซซิล (fossil fuels) นั้น ก่อให้เกิดไอเสีย ซึ่งเป็นสาเหตุของปัญหาสิ่งแวดล้อมมากมาย ดังนั้นจึงมีการพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมขึ้นมา

ไบโอดีเซล (biodiesel) หรือ แฟตตีเอซิดเมทิลเอสเทอร์ (fatty acid methyl esters; FAME) เป็นเชื้อเพลิงทดแทนในเครื่องยนต์ดีเซล ที่สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยตรง โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์หรือทำการดัดแปลงเพียงเล็กน้อย น้ำมันไบโอดีเซลมีคุณสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ รวมทั้งมีการสันดาปที่สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซลปกติ จึงมีการเผาไหม้ที่สะอาดกว่า มีการปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่า รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์เมื่อเผาไหม้ ซึ่งเป็นสาเหตุของฝนกรด จึงทำให้น้ำมันไบโอดีเซลเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าน้ำมันดีเซลปกติทั่วไป (Nie และคณะ, 2006)

ในปัจจุบัน การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลนั้น นิยมใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ระหว่างไตรกลีเซอไรด์จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันพืชที่ใช้แล้วหรือพืชให้น้ำมัน และแอลกอฮอล์ห่วงโซ่สั้น (short chain alcohol) เช่น เมทานอล หรือเอทานอล (Gupta และคณะ, 2007) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ได้แก่ เมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) หรือเอทิลเอสเทอร์ (ethyl ester) หรือน้ำมันไบโอดีเซล โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยากรด ด่าง หรือไลเพส โดยทั่วไปกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผ่านมา จะใช้การเร่งปฏิกิริยาด้วยสารเคมีด่าง จากการศึกษาของ Iso และคณะ (2001) พบว่าการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาด่าง เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่ง และตัวเร่งปฏิกิริยาด่างมีอัตราการกัดกร่อนอุปกรณ์น้อยกว่า อย่างไรก็ตามการใช้ด่างนั้นก่อให้เกิดปัญหาการเกิดสบู่จากปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันอิสระในน้ำมัน และตัวเร่งปฏิกิริยาด่างที่ใช้ และจะไปขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาทำให้ผลผลิตไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้แยกกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นได้ยาก อีกทั้งยังเกิดปัญหาน้ำเน่าเสียจากการชะล้างผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วย ดังนั้นจึงมีการเริ่ม

ศึกษาการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพราะเป็นเทคโนโลยีที่สะอาด เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และที่สำคัญไม่ก่อให้เกิดสบู่ในปฏิกิริยาจึงทำให้ได้ผลผลิตไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์สูง (Fukuda และคณะ, 2001)

ในการผลิตไบโอดีเซล หากนำน้ำมันที่สามารถรับประทานได้มาเป็นสารตั้งต้น ก็อาจเป็นการแย่งอาหารของมนุษย์ และอาจส่งผลให้ราคาน้ำมันเหล่านั้นมีต้นทุนสูงขึ้นเกินกว่าที่จะเกิดความคุ้มค่าในการนำมาผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นการใช้น้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้ว หรือน้ำมันที่ไม่นิยมนำมารับประทาน จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจกว่า โดยสบู่ดำ (physic nut) นั้นเป็นพืชอเนกประสงค์ที่ได้รับการแนะนำเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่าย ให้ผลผลิตสูง ต้องการการดูแลต่ำ ให้ปริมาณกรดไขมันรวมสูงกว่าพืชให้น้ำมันชนิดอื่น สามารถใช้ปลูกเป็นพืชพลังงานหมุนเวียนในการรักษาหน้าดิน (Parawira, 2010) และที่สำคัญคือ ไม่ถูกนำไปใช้ในด้านโภชนาการหรือรับประทาน เพราะเมล็ดและใบของต้นสบู่ดำมีพิษ นอกจากนี้น้ำมันสบู่ดำสามารถผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้ในปริมาณมากอีกด้วย

ไลเพสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่ง พบได้ในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ สามารถนำมาใช้เพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ โดยเฉพาะไลเพสจากยีสต์ เนื่องจากยีสต์นั้นโตเร็ว ขยายปริมาณการผลิตง่าย และใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย จึงสามารถผลิตไลเพสได้ในปริมาณที่มาก ที่สำคัญไลเพสจากยีสต์สามารถคัดแยกได้โดยง่าย เนื่องจากมีความเสถียรสูงจึงสามารถถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามการที่ไลเพสต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์และกระบวนการต่างๆ ก่อนนำมาใช้ ทำให้ไลเพสมีต้นทุนที่สูง และไม่สามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างคุ้มค่า ถึงแม้ว่าจะมีการพัฒนานำไลเพสมาตรึงรูปบนตัวค้ำจุน (immobilized lipase) เพื่อให้สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง แต่ตัวค้ำจุนก็มีผลต่อกระบวนการผลิต ทำให้ต้นทุนในกระบวนการผลิตสูงเช่นกัน ดังนั้นจึงได้มีการค้นคว้า และพัฒนาเพื่อลดต้นทุนของตัวเร่งปฏิกิริยาไลเพสให้ถูกลง (Winayanuwattikun และคณะ, 2008) จากการศึกษาของ Fukuda และคณะ (2008) พบว่าการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเพสได้แบบทั้งเซลล์สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายด้านต้นทุนที่สูงลงได้ และยังให้ระดับกิจกรรมของไลเพสกับความเสถียรที่ดีขึ้นด้วย

ยีสต์ SRY 14-3 หรือ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* เป็นยีสต์ที่จัดอยู่ในอาณาจักร (kingdom) Fungi ไฟลัม (phylum) Ascomycota จัดจำแนกอยู่ในชั้น (class) Dothideomycetes อันดับ (order) Dothideales วงศ์ (family) Dothideaceae สกุล (genus) *Aureobasidium* สปีชีส์ (species) *Aureobasidium pullulans* (Yurlova และคณะ, 1999) และ

จากงานวิจัยของ ธนธร วิทิตศานต์ (2553) *A. pullulans* สามารถใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มได้สูงสุดถึง 88.92 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาวิธีการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการแยก การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ และการตรึงบนตัวค้ำจุน และหากสำเร็จก็จะสามารถช่วยลดต้นทุนที่สูงในการนำไลเพสมาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตน้ำมันไบโอดีเซลได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ ที่ไม่ผ่านกระบวนการแยก การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ และการตรึงบนตัวค้ำจุน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ขั้นตอนการวิจัย

1. รวบรวมเอกสาร และข้อมูลจากฐานข้อมูลต่างๆ พร้อมทั้งเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง
2. หาอัตราการเจริญเติบโต กิจกรรมของไลเพสและปริมาณโปรตีนของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* เมื่อใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นตัวชักนำ
3. หาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเซลล์ยีสต์แบบทั้งเซลล์
4. ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
5. วิเคราะห์ สรุปผลการวิจัย เขียนบทความเพื่อเผยแพร่ และเขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถช่วยลดขั้นตอนในการผลิตไบโอดีเซล ในส่วนของการตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุน และการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ที่แพงลงได้ เพื่อการผลิตไบโอดีเซล ที่ง่ายและต้นทุนต่ำกว่าเดิม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเริ่มมีบทบาทสำคัญมากขึ้นในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา ในการนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงซากดึกดำบรรพ์ ที่กำลังจะหมดไป ไบโอดีเซลนั้นเป็นเชื้อเพลิงที่ผลิตได้จากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนในชีวิตประจำวัน ไม่ว่าจะเป็น น้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ ทั้งที่ใช้แล้ว และยังไม่ได้ใช้ นำมาผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อปรับสภาพให้สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยวิธีการผลิตไบโอดีเซลที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในปัจจุบัน คือการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับแอลกอฮอล์ (alcohol) จนได้ผลผลิตออกมาเป็นเมทิลเอสเทอร์หรือน้ำมันไบโอดีเซลที่มีคุณสมบัติคล้ายน้ำมันดีเซล (ตารางที่ 2.1) ซึ่งสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ก่อนการนำไปใช้ และไม่สร้างความเสียหายให้กับเครื่องยนต์ (Branwal และ Sharma, 2005)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล (Bacha และคณะ, 2007)

คุณสมบัติ	ไบโอดีเซล	ดีเซล (ultra-low sulfur diesel, ULSD)
จุดวาบไฟ (flash point, °C)	130	60
ปริมาณซัลเฟอร์ (sulphur, ppm)	น้อยกว่า 15	15
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (relative Density, 15 °C)	0.88	0.85
ดัชนีซีเทน (cetane number)	55	44
ความหนืดเชิงจลน์ ที่ 40 องศาเซลเซียส (kinematic viscosity at 40 °C, mm^2/s)	6.00	2.60
ค่าความร้อน (heating value, net, Btu/gal (kJ/kg))	128,000 (40,600)	130,000 (42,700)

ทั้งนี้การนำไบโอดีเซลมาใช้งาน สามารถนำมาใช้ได้โดยตรงโดยไม่ต้องทำการผสม หรือผสมกับน้ำมันดีเซลทั่วไปก่อนการนำไปใช้ (Pinto และคณะ, 2005) ซึ่งไบโอดีเซลจะมีชื่อเรียกตามอัตราส่วนการผสมระหว่างไบโอดีเซลและน้ำมันดีเซลทั่วไป เช่น หากนำไบโอดีเซลไปใช้แทนน้ำมันดีเซลอย่างสมบูรณ์โดยไม่ทำการผสม จะเรียกว่า B100 หรือถ้านำไบโอดีเซลไปผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 โดยปริมาตร (ไบโอดีเซล 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันดีเซล 80 เปอร์เซ็นต์) จะเรียกว่า B20 เป็นต้น

ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ มีปริมาณไฮโดรคาร์บอนในไอเสียน้อยกว่าน้ำมันดีเซล มีการเผาไหม้สมบรูณ์กว่า มีการปล่อยแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์น้อยกว่าน้ำมันดีเซลทั่วไป (Ghaly และคณะ, 2010) รวมทั้งไบโอดีเซลไม่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบจึงไม่ก่อให้เกิดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งเป็นสาเหตุของฝนกรด จึงทำให้ไบโอดีเซลเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าน้ำมันดีเซลทั่วไป (Nie และคณะ, 2006)

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

ส่วนใหญ่วัตถุดิบ (feed stock) ที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลคือ น้ำมัน ไขมัน หรือไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ที่ได้มาจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ต่างๆ โดยในปัจจุบันส่วนใหญ่จะใช้น้ำมันพืชเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก (ตารางที่ 2.2) นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าน้ำมันพืชสามารถให้ผลผลิตไบโอดีเซลในปริมาณที่สูงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 ปริมาณน้ำมัน และไขมันที่ผลิตได้รวมจากทั่วโลก (Dias Ribeiro และคณะ, 2011)

ประเภทของน้ำมัน และไขมัน	ปริมาณผลผลิตโดยรวม (ล้านตัน)
ไขมันจากสัตว์ (animal fat)	24.40
น้ำมันจากพืช (vegetable and plant oil)	120.30

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างปริมาณผลผลิตสูงสุดที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จากวัตถุดิบประเภทน้ำมันพืชต่างๆ (Dias Ribeiro และคณะ, 2011; Gog และคณะ, 2012)

วัตถุดิบ	จุลินทรีย์/เอนไซม์	ปริมาณผลผลิต (yield, %)
น้ำมันเมล็ดเรฟซีด (rapeseed oil)	*Candida antarctica*	98
น้ำมันเมล็ดฝ้าย (cotton seed oil)	*Candida antarctica*	97
น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	*Mucor miehei*	97
น้ำมันปาล์ม (palm oil (used))	Lipase AY และ Lipase AK	91

อย่างไรก็ตามการนำน้ำมันพืชที่รับประทานได้มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลเป็นการแย่งทรัพยากรอาหารของมนุษย์ และอาจส่งผลให้เกิดการขาดแคลนหรือทำให้ราคาของน้ำมันพืชสูงขึ้นมากจนไม่ก่อให้เกิดความคุ้มค่าในการนำมาผลิตไบโอดีเซลได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาเพื่อหาแหล่งน้ำมันทดแทนที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล หรือก็คือน้ำมันพืชที่ไม่ได้ถูกนำมาใช้รับประทาน ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพมากในการนำมาเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

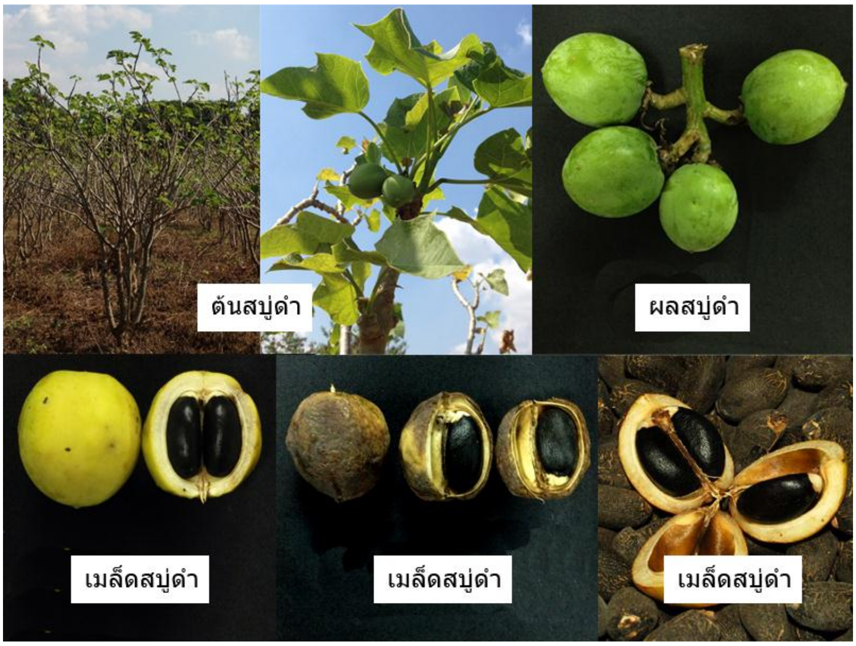
2.3 สบู่ดำ

สบู่ดำ (physic nut, barbados nut และ purging nut หรือ *Jatropha curcas* Linnaeus) เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง ที่มีประโยชน์มากมาย จนถูกเรียกว่าพืชอเนกประสงค์ จัดเป็นพืชที่อยู่ในอาณาจักร Plantae ส่วน (Division) Embryophyta จัดจำแนกอยู่ในชั้น Spermatopsida อันดับ Malpighiales วงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับมันสำปะหลัง ยางพารา สกุล *Jatropha* สปีชีส์ *Jatropha curcas* ลักษณะของสบู่ดำนั้นเป็นไม้ยืนต้น ส่วนใหญ่จะมีอายุมากกว่า 20 ปี รูปร่างมีลักษณะเป็นทรงพุ่มขนาดกลาง สูงประมาณ 2-7 เมตร ลักษณะของใบสบู่ดำจะคล้ายใบฝ้ายแต่หนากว่า ขอบใบมีหยักตื้นๆ ดอกมีขนาดเล็กสีเหลือง จากดอกจนกลายเป็นผลใช้เวลาประมาณ 60 วัน ผลอ่อนจะมีสีเขียว แต่ผลแก่จะมีสีเหลืองถึงดำ รูปทรงกลม เปลือกหนา และเมล็ดมีสีดำแต่เนื้อในมีสีขาว

สบู่ดำเป็นพืชอเนกประสงค์ที่ได้รับการแนะนำอย่างมากมาย เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่าย ต้องการการดูแลต่ำ ให้ผลผลิตน้ำมันต่อเมล็ดสูง น้ำมันทั้งเมล็ดคิดเป็นร้อยละ 34.96 และน้ำมัน

เนื้อในเมล็ดคิดเป็นร้อยละ 54.68 ให้ปริมาณกรดไขมันรวมสูงกว่าพืชให้น้ำมันชนิดอื่น ประกอบด้วย กรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 21.28 (กรดปาล์มิติก (palmitic (C 18:0)) ร้อยละ 16.70 กรดสเตียริก (stearic (C 18:0)) ร้อยละ 5.11) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวร้อยละ 78.72 (กรดโอเลอิก (oleic (C 18:1)) ร้อยละ 44.88 กรดลิโนเลอิก (linoleic (C 18:2)) ร้อยละ 33.83) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ปลูกเป็นพืชพลังงานหมุนเวียนในการรักษาหน้าดิน (Parawira, 2010) โดยที่มาของชื่อสบู่ดำนั้น มาจากผลสบู่ดำมีเปลือกและเมล็ดที่มีสีดำ ซึ่งสามารถใช้น้ำมันจากเมล็ดมาเป็นส่วนผสมนำไปใช้ทำสบู่ได้

สบู่ดำสามารถเพาะปลูกได้ง่ายทั้งสามารถเจริญได้ในพื้นที่เขตร้อน แห้งแล้ง และทนทานต่อโรคพืช จึงสามารถกระจายพันธุ์ได้ดีในหลายเขตภูมิอากาศทั้งในเขตร้อน เขตกึ่งร้อน เขตอบอุ่น และเขตที่มีปริมาณน้ำฝนต่ำหรือพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ เนื่องจากสบู่ดำมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมลักษณะต่างๆ ได้ดี ต้องการปริมาณน้ำฝนเพียง 300 ถึง 1,000 มิลลิเมตรต่อปี ให้ผลผลิตต่อต้นโดยรวมมากกว่า 2–4 กิโลกรัมต่อปี โดยปริมาณผลผลิตจะแปรผันตามสายพันธุ์ อายุ สภาพแวดล้อม และวิธีการปลูก สบู่ดำสามารถให้ผลผลิตได้ตั้งแต่ปีแรกของการปลูก และจะได้ผลผลิตสูงสุดในช่วงปีที่ 3–5 (Becker และ Francis, 2000)



ภาพที่ 2.1 ต้น ผล และเมล็ดสบู่ดำ

ลักษณะของสบู่ดำนั้นเป็นไม้พุ่มที่มีลักษณะแข็ง สามารถใช้ปลูกเพื่อเป็นรั้วทางธรรมชาติล้อมรอบพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจหลักๆเพื่อป้องกันสัตว์เลี้ยงเข้ามาในเขตไร่นาทำความเสียหายต่อพืชได้ ในอีกทางหนึ่งสารเคมีจากต้นสบู่ดำที่ปลดปล่อยออกมาสามารถขับไล่แมลงหรือสัตว์ที่เป็นศัตรูพืช เนื่องจากส่วนใบ ต้น และเมล็ดของสบู่ดำเป็นพิษต่อคนและสัตว์ และมีกรดไฮโดรไซยานิค (hydrocyanic) มีกลิ่นเหม็นเขียว มากไปกว่านั้นการปลูกสบู่ดำสามารถช่วยลดการกัดเซาะของหน้าดินจากลมและน้ำ รากของสบู่ดำช่วยยึดเกาะผิวดิน เปรียบเสมือนสมอเรือ และยังทำให้อัตราการไหลของน้ำลดลงอีกด้วย เมื่อเกิดภาวะน้ำท่วม อย่างไรก็ตามส่วนเมล็ดของสบู่ดำ หากนำไปปรับสภาพแล้ว ก็สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ และที่สำคัญที่สุดส่วนเมล็ดของสบู่ดำสามารถนำมาสกัดเอาน้ำมันสบู่ดำได้ สามารถใช้น้ำมันของสบู่ดำแทนน้ำมันดีเซลกับเครื่องยนต์ทางการเกษตร เนื่องจากสามารถนำน้ำมันสบู่ดำมาใช้ได้โดยไม่ต้องผสมกับน้ำมันดีเซล และมีราคาไม่แพง ต่างจากน้ำมันชีวภาพอื่นๆ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม จะต้องผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้ นอกจากนี้การใช้น้ำมันสบู่ดำยังให้ผลดีกว่าน้ำมันแก๊ส เพราะน้ำมันสบู่ดำมีค่าออกซิเจนสูงและมีสารหล่อลื่นให้เครื่องยนต์ทำงานได้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น การสกัดเอาน้ำมันสบู่ดำจากเมล็ดในปัจจุบันมี 3 วิธีหลักๆ คือ การสกัดน้ำมันสบู่ดำภายในห้องปฏิบัติการ การสกัดน้ำมันสบู่ดำด้วยระบบไฮดรอลิก และการสกัดน้ำมันสบู่ดำด้วยระบบอัดเกลียว ซึ่งน้ำมันสบู่ดำสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาพที่ 2.2 (บนซ้าย) เครื่องคั้นน้ำมันสบู่ดำ (บนขวา) น้ำมันสบู่ดำ (ล่าง) กากเมล็ดสบู่ดำ

น้ำมันสบู่ดำมีคุณสมบัติทางเชื้อเพลิงที่ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลหลายประการ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติน้ำมันสบู่ดำเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล (Rahman และคณะ, 2010; Singh และ Padhi, 2009)

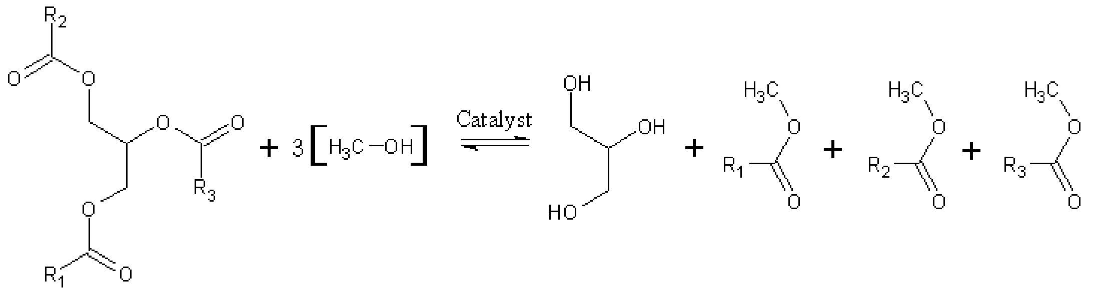
คุณสมบัติ	น้ำมันสบู่ดำ	น้ำมันดีเซล
คุณสมบัติในการจุดติดไฟ (cetane No.)	43	47
ความหนาแน่น (density at 15 ºC, kg/m^3)	918	850
ความหนืดเชิงจลน์ ที่ 30 องศาเซลเซียส (kinematic viscosity at 30 ºC, mm^2/s)	55	4
ค่าความร้อน (calorific Value, MJ/kg)	40	45
จุดวาบไฟ (flash point, ºC)	186	70
จุดแข็งตัว (solidifying point, ºC)	-10	-14
จุดเดือด (boiling point, ºC)	286	248

2.4 วิธีการผลิตและการนำไบโอดีเซลมาใช้

ในการผลิตและการนำไบโอดีเซลมาใช้งานนั้น สามารถทำได้มากมายหลากหลายวิธีด้วยกัน ตั้งแต่การนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรง (direct use and blending) โดยนำมาทำการผสมกับน้ำมันดีเซลปกติในอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งจะสามารถใช้ได้ดีในระยะสั้น แต่หากนำมาใช้ในระยะยาวจะส่งผลเสียต่อเครื่องยนต์ดีเซลได้ เนื่องจากความหนืดที่สูงของน้ำมันพืช และส่วนประกอบของกรดไขมันต่างๆ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) พอลิเมอไรเซชัน (polymerization) และการตกสะสมของคาร์บอน (carbon deposition) จนเกิดเป็นยางเหนียวขึ้นในเครื่องยนต์ได้ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาหาวิธีพัฒนาคุณสมบัติของน้ำมันพืช เพื่อที่จะได้นำมาใช้แทนดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันมี 3 วิธีหลักที่นิยมนำมาใช้ในการพัฒนาคุณภาพของน้ำมันพืช หรือเรียกได้ว่าเป็นวิธีผลิตไบโอดีเซล คือ การทำไมโครอิมัลชัน (microemulsion) การแยกด้วยความร้อน (pyrolysis) และการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification reaction) (Ma และ Hanna, 1999)

2.5 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันคือ ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนเคลื่อนย้ายหมู่แอลคิล (alkyl) ของเอสเทอร์ (ester) หรือไตรกลีเซอไรด์ กับแอลกอฮอล์ เกิดเป็นสารประกอบเอสเทอร์ตัวใหม่ หรือ โมโนแอลคิลเอสเทอร์ (mono-alkylester) ได้แก่สารจำพวกเมทิลเอสเทอร์ และเอทิลเอสเทอร์ ดังแสดงในภาพที่ 2.1



Triglyceride Methanol (3) Glycerol Methyl Esters

ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเกิดทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

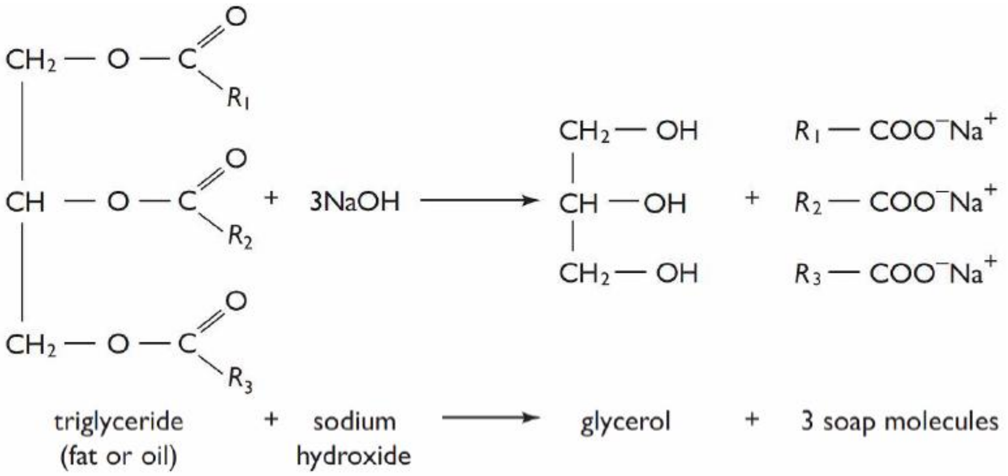
วิธีการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมที่สุด ในปัจจุบัน ซึ่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนั้นเป็นชื่อเรียกโดยทั่วไปของปฏิกิริยาอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ลดความหนืดของไตรกลีเซอไรด์ และเพิ่มคุณสมบัติทางเชื้อเพลิงให้มีลักษณะคล้ายกับน้ำมันดีเซล สามารถทำได้โดยการนำไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ ทั้งที่ใช้แล้วและยังไม่ได้ใช้ ไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับแอลกอฮอล์โซ่สั้น เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล แต่ทั้งนี้เมทานอลจะเป็นที่นิยมที่สุดเนื่องจากมีราคาถูกเมื่อเทียบกับแอลกอฮอล์ชนิดอื่น (Ghaly และคณะ, 2010) สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยานั้นสามารถใช้ได้หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี กรด ด่าง หรือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น ไลเพส และเมื่อทำปฏิกิริยาจนเสร็จสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกลีเซอรอล และเอสเทอร์ของกรดไขมัน หรือน้ำมันไบโอดีเซล (Schuchardt และคณะ, 1998; Fukuda และคณะ, 2001; Gupta และคณะ, 2007)

2.7 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบใช้สารเคมีเป็นตัวเร่ง

ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนั้น สามารถใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาได้หลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี หรือทางชีวภาพ ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาแต่ละประเภท จะมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกันไป สำหรับการใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สารเคมีที่นำมาใช้ ส่วนใหญ่มักจะเป็นสารเคมีประเภทกรด เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) หรือด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลในเชิงอุตสาหกรรมจะใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่สูง รวดเร็ว และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ เนื่องจากไม่ต้องการอุณหภูมิและความดันในการทำปฏิกิริยาที่สูงมากนัก (Ghaly และคณะ, 2010) นอกจากนี้การใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างมีข้อได้เปรียบที่เหนือกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาก ไม่ว่าจะเป็นการทำปฏิกิริยาสามารถให้ผลผลิตที่สูงกว่าภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง และใช้เวลาทำปฏิกิริยาที่สั้นกว่าภายใต้สภาวะเดียวกัน นอกจากนี้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นด่างยังมีสภาพกัดกร่อน (corrosiveness) ต่อเครื่องมือน้อยกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ยิ่งไปกว่านั้นการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ใช้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่น้อยกว่าการใช้กรดเร่งปฏิกิริยา จึงสามารถลดต้นทุนของแอลกอฮอล์ลงได้ด้วย (Schuchardt และคณะ, 1998; Gog และคณะ, 2012)

อย่างไรก็ตามการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่าง ก็มีข้อเสียเช่นเดียวกันคือ ถึงแม้การจะต้องการอุณหภูมิ และแอลกอฮอล์ในการทำปฏิกิริยาที่ต่ำกว่าการใช้กรดเร่งปฏิกิริยา แต่ก็ยังมีความต้องการพลังงานและแอลกอฮอล์ในระดับที่สูงกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือไลเพสอยู่พอสมควร จึงทำให้มีต้นทุนมากขึ้นตามไปด้วย (Pazouki และคณะ, 2011) นอกจากนี้การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นด่างนั้นจะมีความไวต่อลักษณะของน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้น โดยการใช้ด่างเร่งปฏิกิริยาจะเหมาะสมกับน้ำมันพืชที่มีระดับกรดไขมันอิสระ และมีส่วนประกอบของน้ำต่ำ (น้ำมันที่มีคุณภาพสูง) เท่านั้น ซึ่งน้ำมันประเภทนี้มักจะมีราคาสูงกว่าน้ำมันประเภทอื่น การใช้น้ำมันที่มีราคาถูก เช่น น้ำมันใช้แล้ว ซึ่งมีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง และมีน้ำเป็นส่วนประกอบอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสบู่ (saponification) (ภาพที่ 2.4) ระหว่างการผลิตไบโอดีเซล ที่จะส่งผลต่อปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้รับให้มีจำนวนที่ลดลง และยังทำให้ยากต่อการแยกกลีเซอรอลที่เป็นผลผลิตร่วมออกจากผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามปัญหานี้สามารถแก้ไขด้วยการนำน้ำมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ไปผ่านขั้นตอนการปรับสภาพ เพื่อลดปริมาณของกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ใน

น้ำมันลง เช่น การใช้กระบวนการเอสเทอริฟิเคชันด้วยตัวเร่งปฏิกิริยากรด เพื่อลดปริมาณของกรดไขมันอิสระในน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้นก่อนนำไปผลิตไบโอดีเซล ซึ่งส่งผลให้การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้สารเคมีด่างเป็นตัวเร่งนั้นจะมีค่าใช้จ่ายสูงขึ้นตามไปด้วย และที่สำคัญ การใช้สารเคมีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะก่อให้เกิดน้ำเสียจากการทำปฏิกิริยา ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการบำบัดที่สูงและไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Ma และ Hanna, 1999; El-Mashad และคณะ, 2008; Leung และคณะ, 2010; Ghaly และคณะ, 2010; Worapun และคณะ, 2010)



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาการเกิดสบู่

2.8 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

เนื่องจากความต้องการพัฒนา และแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดจากการผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวเร่งปฏิกิริยากรดและด่าง ทำให้มีการศึกษา และพัฒนาวิธีการใหม่ขึ้น นั้นก็คือการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ หรือไลเพส โดยการนำไลเพสมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยามีข้อดีมากกว่าการใช้สารเคมีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังที่แสดงเปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 2.5 หรืออาจกล่าวสรุปได้ว่าการใช้ไลเพสมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นทำให้ได้ผลผลิตสูงในปริมาณที่เท่าๆ กัน หรือมากกว่าสามารถทำการแยกกลีเซอรอลที่ขึ้นเกิดในปฏิกิริยาได้ง่ายกว่า และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์กว่า (Ranganathan และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาได้ถึงแม้น้ำมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบจะมีกรดไขมันอิสระสูง และไม่กัดกร่อนเครื่องมือในการผลิตด้วย

อย่างไรก็ตามการนำไลเพสมาใช้เร่งปฏิกิริยา ยังไม่สามารถนำไปประยุกต์หรือขยายขนาดเพื่อผลิตไบโอดีเซลในเชิงอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากยังมีข้อเสียเปรียบ หรืออุปสรรคบางประการ ได้แก่ การที่ไลเพสมีต้นทุนหรือราคาที่สูง ซึ่งไม่คุ้มค่าต่อการนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล จึงทำให้เกิดการศึกษาและพัฒนาวิธีการ เพื่อช่วยแก้ปัญหาทางด้านต้นทุนของไลเพส

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบการใช้ด่างและไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Fukada และคณะ, 2001, Ghaly และคณะ, 2010)

ปัจจัย	ตัวเร่งปฏิกิริยาด่าง	ตัวเร่งปฏิกิริยาไลเพส
ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	60-80 องศาเซลเซียส	20-60 องศาเซลเซียส
ความหลากหลายของน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้น	เหมาะสมกับน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระ และน้ำเป็นส่วนประกอบอยู่น้อย	มีข้อจำกัดต่ำ
กรดไขมันอิสระในวัตถุดิบ	เกิดเป็นสบู่	เป็นเมทิลเอสเทอร์
ปริมาณน้ำในสารตั้งต้น	มีผลลบต่อปริมาณผลผลิต	ไม่มีผล
ปริมาณของไบโอดีเซลที่ได้รับ	ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์	ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์
การแยกกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
น้ำเสียจากปฏิกิริยา	มีน้ำเสียที่ปนเปื้อนด่าง	ไม่มีน้ำเสีย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ล้างซ้ำ	สามารถแยกนำมาใช้ได้เลย
ราคาของตัวเร่งปฏิกิริยา	ถูก	แพง

ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพและเคมี

ประเภทตัวเร่งปฏิกิริยา	จุลินทรีย์/เอนไซม์	สารตั้งต้น	ปริมาณผลผลิต (yield, %)	เวลา (ชั่วโมง)	อ้างอิง
Commercial Lipase	*Chromobacterium viscosum*	น้ำมันสบู่ดำ	73	-	Gog และคณะ, 2012
	Pseudomonas cepacia	น้ำมันสบู่ดำ	70	-	
	Novozym 435	น้ำมันสบู่ดำ	75	90	Tamalampudi และคณะ, 2008
Immobilized Whole-cell	*Rhizopus oryzae*	น้ำมันสบู่ดำ	80	60	Tamalampudi และคณะ, 2008
	Rhizopus oryzae	น้ำมันทำอาหารที่ใช้แล้ว	98	72	Pazouki และคณะ, 2011
	Rhizopus oryzae	น้ำมันถั่วเหลือง	80-90	72	Fukuda และคณะ, 2008
Whole-cell	*Rhizopus oryzae*	น้ำมันคาโนลา	74	72	Jin และ Bierma, 2010
	Rhizopus oryzae	น้ำมันพืชใช้แล้ว	81	72	
	Saccharomyces cerevisiae	น้ำมันถั่วเหลือง	71	165	Fukuda และคณะ, 2008

ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพและเคมี (ต่อ)

ประเภทตัวเร่งปฏิกิริยา	ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี	สารตั้งต้น	ผลผลิตไบโอดีเซล (%)	อ้างอิง
ด่าง	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	น้ำมันสบู่ดำ	92	Shah และคณะ, 2003
กรด	ซัลฟิวริก (H_2SO_4)	น้ำมันพืช	99	Schuchardt และคณะ, 1998

2.9 **ไลเพส** (Lipase)

ไลเพสจัดเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่ง ที่มีความสามารถในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลสิส หรือการสลายพันธะเอสเทอร์ของไขมันให้กลายเป็น กรดไขมัน และกลีเซอรอล โดยไลเพสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอล เอสเทอร์ ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) มีรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) เป็น EC.3.1.1.3 (De Sousa และคณะ, 2010) โดยตัวอักษรและตัวเลขจะถูกแบ่งเป็นชุดๆ โดยเครื่องหมายจุด ตัวเลขชุดแรกบ่งบอกถึงพวก (class) ของเอนไซม์ ส่วนตัวเลขชุดที่สองและสามของรหัสเอนไซม์ จะบอกถึงชนิดของปฏิกิริยาที่ถูกเร่ง และตัวเลขชุดที่สี่จะทำหน้าที่ช่วยแยกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคล้ายๆ กันออกจากกัน โดยรหัสประจำตัวไลเพสมีความหมายแยกตามชุดดังนี้ (Gandhi, 1997)

E.C.3.-.-. - Hydrolases.

E.C.3.1.-. - Acting on ester bonds.

E.C.3.1.1. - Carboxylic ester hydrolases.

E.C.3.1.1.3 Triglycerol lipase

และมีความหมายโดยรวมว่า เป็นเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกับน้ำ (hydrolase) มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพื่อย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (triacyglycerol) โดยปฏิกิริยาจะเกิดที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของสารตั้งต้น (substrate) กับชั้นน้ำ (oil-water interface) (Treichel และคณะ, 2010) ได้ผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาออกมาเป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) รวมทั้งกลีเซอรอล (glycerol) นอกจากนี้ไลเพสยังสามารถใช้ในการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ (synthesis reaction) ได้แก่ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์จากหมู่คาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอลคิลของเอสเทอร์ กับแอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ตัวใหม่ ที่เรียกว่าโมโนแอลคิลเอสเทอร์ และ กลีเซอรอล

ความสามารถด้านการละลายของไลเพสนั้น โดยทั่วไปจะสามารถละลายในน้ำได้ดี แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Kwon และคณะ, 1995) ทางด้านความเหมาะสมของการทำงานของไลเพสในความเป็นกรดและด่างนั้น จะมีความแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของไลเพส อาทิเช่น ไลเพสที่ได้มาจากสัตว์ โดยส่วนใหญ่จะเหมาะสมต่อการทำงานในช่วงค่า pH 8-9 หรือสภาพความเป็นด่าง แต่ไลเพสที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์มักจะทำงานได้ดีในช่วง pH 5-9 หรือในสภาวะเป็นกลางระหว่างกรดและด่าง นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-55 องศาเซลเซียส ยกตัวอย่างดังตารางที่ 2.6

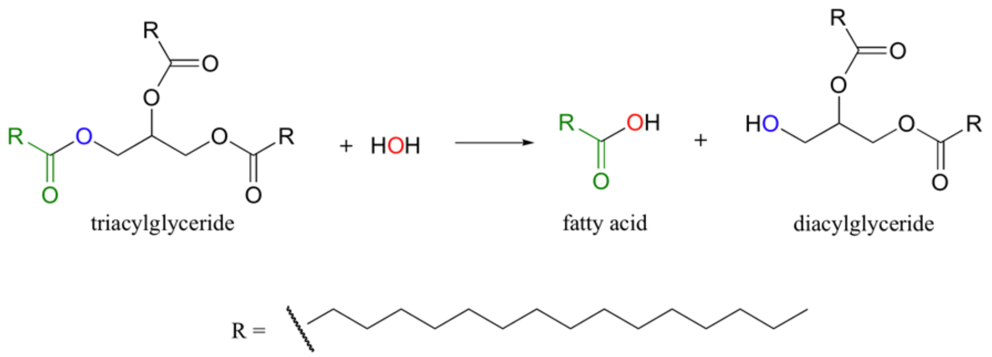
ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างที่มาของไลเพสและสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสชนิดนั้น (Dias Ribeiro และคณะ, 2011)

แหล่งที่มาของไลเพส	ค่า pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
Yeast; *Candida rugosa*	5-8	35-50
Yeast; *Yarrowia lipolytica*	4-7	30-45
Fungus; *Aspergillus niger*	6-8	40-55
Fungus; *Rhizopus niveus*	5-7	30-45
Bacteria; *Bacillus subtilis*	8-10	30-40
สารจากตับอ่อน; Porcine pancretin	6-9	40-55

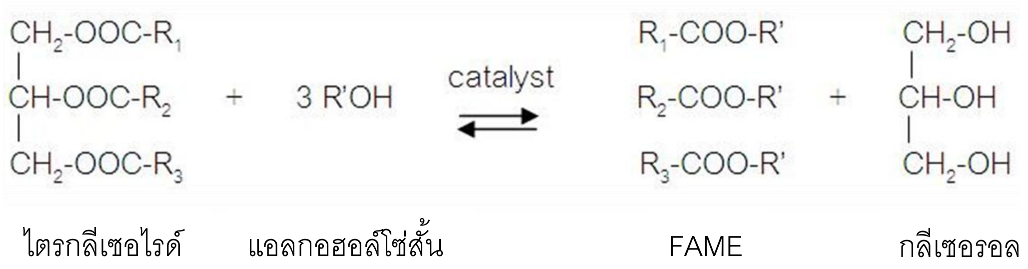
2.10 ประโยชน์ของไลเพส

ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์หลายประการด้วยกัน โดยไลเพสนั้นสามารถนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ได้หลากหลายปฏิกิริยา เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ดังนั้นไลเพสจึงถูกนำไปประยุกต์ในเชิงอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ดังตารางที่ 2.7 แต่โดยส่วนใหญ่แล้วนั้น มักจะเป็นอุตสาหกรรมที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับไขมันหรือน้ำมัน อาทิ อุตสาหกรรมสารชำระล้าง เช่น ผงซักฟอก เพื่อทำการขจัดคราบที่เกิดจากไขมันหรือน้ำมัน อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ อุตสาหกรรมน้ำหอม อุตสาหกรรมการบำบัด และฟื้นฟูทางชีวภาพ อุตสาหกรรมเคมี และอุตสาหกรรมพลังงาน เป็นต้น (Hasan และคณะ, 2006)



ภาพที่ 2.5 ตัวอย่างปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Diacyglyceride และกรดไขมัน



ภาพที่ 2.6 ตัวอย่างการเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส หรือทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทิลเอสเทอร์ และกลีเซอรอล

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างการนำไลเพสไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆ และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Sharma และคณะ, 2011)

อุตสาหกรรม	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	ผลผลิตหรือวิธีการนำไปประยุกต์
Detergents	Hydrolysis of fats	Removal of oil stains from fabrics
Dairy foods	Hydrolysis of milk fat, cheese ripening, modification of butter fat	Development of flavoring agents in milk, cheese, and butter
Bakery foods	Flavor improvement	Shelf-life prolongation
Beverages	Improved aroma	Beverages
Food dressings	Quality improvement	Mayonnaise, dressings, & whippings
Health foods	Transesterification	Health foods
Meat and fish	Flavor development	Meat & fish products; fat removal
Fats and oils	Transesterification; hydrolysis	Cocoa butter, margarine, fatty acids, glycerol, mono-diglycerides
Chemicals	Enantioselectivity, synthesis	Chiral building blocks, chemicals
Pharmaceutical	Transesterification, hydrolysis	Specialty lipids, digestive aids
Cosmetics	Synthesis	Emulsifiers, moisturizers
Leather	Hydrolysis	Leather products
Paper	Hydrolysis	Paper with improved quality
Cleaning	Hydrolysis	Removal of fats

2.11 แหล่งที่มาของไลเพส

ไลเพสนั้นสามารถพบได้ทั้งในพืช ยกตัวอย่างเช่น ข้าวสาลี ข้าดโอ๊ต ฝ้าย ถั่วเหลือง ละหุ่ง เป็นต้น และในสัตว์ โดยสำหรับในสัตว์นั้น จะสามารถพบไลเพสได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ กล้ามเนื้อ สมอง แต่ที่สำคัญที่สุดคือ ตับอ่อน (pancreatic lipase) โดยเฉพาะตับอ่อนของสุกรหรือหมู ที่จะมีความเข้มข้นสูงกว่าจากสัตว์ชนิดอื่นๆ และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ อย่างไรก็ตามแหล่งที่มาของไลเพสที่สำคัญนั้น ได้แก่จุลินทรีย์ ซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมักจะพบมากในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน หรือไขมัน โดยไลเพสที่ได้มาจากจุลินทรีย์จะมี

ข้อได้เปรียบไลเพสจากพืช และสัตว์ ทั้งทางด้านการผลิตเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และทำการเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่า สามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการผลิตไลเพสได้มากกว่าพืช และสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถดัดแปลงปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตให้มากขึ้นและรวดเร็วขึ้นได้

2.12 กระบวนการผลิตไลเพส

ไลเพสพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์นั้น มักจะพบว่ามีข้อได้เปรียบเอนไซม์ที่ได้จากพืชและสัตว์อยู่มาก ไม่ว่าจะเป็นทั้งทางด้านความหลากหลายของการใช้ในการเร่งปฏิกิริยา จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงกว่า สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการได้ง่ายใช้เวลาไม่มาก ความง่ายในการเพาะเลี้ยง และสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่แพง เป็นต้น (Hasan และคณะ, 2006)

การผลิตไลเพสจากเชื้อจุลินทรีย์นั้น สามารถผลิตได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (submerge culture) และบนอาหารแข็ง (solid state) โดยการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็งมีข้อดีที่เหนือกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวอยู่มากมายหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นการที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายกว่า ไลเพสที่ได้มีปริมาณและความเข้มข้นสูงกว่า รวมทั้งการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และการแยกก็สามารถทำได้ง่ายกว่าในอาหารเหลวเช่นกัน แต่โดยส่วนมากแล้วการผลิตไลเพสส่วนใหญ่ มักจะทำในอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทเหลว เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทเหลว สามารถควบคุมตัวแปรต่างๆ ได้ง่ายกว่า เช่น สภาพในการเลี้ยงเชื้อ สารอาหาร รวมทั้งการควบคุมปัจจัยตัวแปรต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเพสของจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ความเป็นกรดหรือด่าง อุณหภูมิ หรือแม้แต่ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิต (ณกัญภัทร จินดา และคณะ, 2549)

2.13 ไลเพสแบบภายนอกเซลล์ และไลเพสแบบภายในเซลล์

โดยปกติแล้วไลเพสสามารถแบ่งได้ 2 ลักษณะหลักๆ ตามแหล่งที่ไลเพสทำงาน ได้แก่ ไลเพสแบบภายนอกเซลล์ (extracellular lipase) คือไลเพสที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ แล้วจะถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์ ซึ่งในการจะนำไปใช้เร่งปฏิกิริยานั้นสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพสแบบภายนอกเซลล์ จากนั้นนำไปคัดแยกไลเพสออก

มาแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ก่อนการนำไปใช้ แต่เนื่องจากความซับซ้อน ยุ่งยาก และต้นทุนที่สูงในการคัดแยกและตรึงไลเพสลงบนตัวค้ำจุน เช่น ตรึงบนตัวค่ำจุน (biomass support particles, BSPs) ก่อนการนำไลเพสแบบภายนอกเซลล์มาใช้ จึงเกิดการศึกษาวิธีนำตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์ (whole cell catalyst) มาใช้ เพื่อลดขั้นตอนการคัดแยกและทำให้ไลเพสบริสุทธิ์ก่อนการนำมาใช้ ซึ่งมีต้นทุนในการทำที่สูง จากการศึกษาพบว่าการใช้ไลเพสแบบภายในเซลล์ (intracellular lipase) คือไลเพสที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ และทำงานภายในเซลล์ด้วยเช่นกัน สามารถช่วยลดขั้นตอนในการแยกและทำให้ไลเพสบริสุทธิ์ ซึ่งมีราคาแพงลงได้ โดยการจะนำไลเพสแบบภายในเซลล์มาใช้เร่งปฏิกิริยานั้น จะต้องนำเซลล์ทั้งเซลล์ (whole cell) ของจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพสแบบภายในเซลล์ มาทำการตรึงลงบนตัวค้ำจุนก่อนการนำไปใช้ อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเพสแบบภายในเซลล์นั้นมีจำนวนน้อย จึงทำให้วิธีการนี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยม และทำให้โดยส่วนมากไลเพสที่ถูกนำมาใช้ทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะไลเพสทางการค้ามักจะเป็นไลเพสประเภทที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์บางประเภทที่จะทำการสะสมไลเพสไว้ในเซลล์ก่อน จนเมื่อสภาวะแวดล้อมภายนอกถึงสภาวะที่เหมาะสม เชื้อจึงทำการปล่อยไลเพสออกมานอกเซลล์ เช่น เชื้อจุลินทรีย์ *Yarrowia lipolytica* และ *Candida lipolytica* ที่จะสะสม ไลเพสไว้จนความเข้มข้นของคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ภายนอกเซลล์สูงถึงระดับหนึ่งก่อน ถึงจะมีการปล่อยไลเพสออกมา (ณกัญภัทร จินดา และคณะ, 2549; ปุริมปรัชญ์ ศรีหมาน, 2552; Ghaly และคณะ; 2010, Gog และคณะ, 2012)

2.14 ไลเพสทางการค้า โนโวไซม์ 435 (Novozym 435)

โนโวไซม์ 435 เป็นไลเพสทางการค้าของบริษัทโนโวไซม์ (Novozymes) โดยมีรายละเอียดทางวิชาการต่างๆ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.9 คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ทางการค้าโนโวไซม์ 435 (Novozymes A/S a., online)

ประเภทของเอนไซม์	ไลเพส
แหล่งที่มา	โนโวไซม์ 435 เป็นไลเพสที่ผ่านการตรึงบนตัวค้ำจุน โดยไลเพสชนิดนี้ผลิตมาจากเชื้อ *Aspergillus niger* ที่ผ่านการหมัก และดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว
ลักษณะ	เป็นผง รูปทรงกลม
สี	ขาว ทั้งนี้ความขาวอาจแตกต่างไปตามแต่ละครั้งที่ผลิต ซึ่งสีไม่มีผลต่อคุณภาพของเอนไซม์
ขนาด (mm)	0.3 – 0.9
ความหนาแน่น (g/ml)	ประมาณ 0.4
ชนิดตัวค้ำจุน	Acrylic resin
ระดับกิจกรรม	10,000 PLU/g
ความจำเพาะต่อตำแหน่ง	1, 3 specific
การนำไปใช้	ใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกลีเซอรอล กรดไขมัน (fatty acid) และ กลีเซอไรด์บางส่วน (partial glyceride) รวมทั้งเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการสลายพันธะ เอสเทอร์ของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid esters)
ราคา	ประมาณ 29,260 THB / 1 kg (Toscano และคณะ, 2011)

2.15 **ไลเพสทางการค้า ไลโปไซม์ คาลบี แอล** (Lipozyme CALB L)

ไลโปไซม์ คาลบี แอล เป็นไลเพสทางการค้าของบริษัทโนโวไซม์โดยมีรายละเอียดทางวิชาการต่างๆ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2.10 คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ทางการค้าไลโปไซม์ คาลบี แอล
(Novozymes A/S b., online)

ประเภทของเอนไซม์	ไลเพส
แหล่งที่มา	ไลโปไซม์ คาลบี แอล เป็นไลเพสที่ผลิตมาจากเชื้อ *Aspergillus niger* ที่ผ่านการหมัก และดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว
ลักษณะ	เป็นของเหลว
สี	เหลือง ถึงน้ำตาลอ่อน
ความหนาแน่น (g/ml)	ประมาณ 1.2
ระดับกิจกรรม	50,000 LU/g
ราคา	ประมาณ 35,258 THB / 1 kg (source: http://www.chiralvision.com/product_info/IMMRML.htm)

ภาพที่ 2.7 (ซ้าย) เอนไซม์ทางการค้าโนโวไซม์ 435
(ขวา) เอนไซม์ทางการค้าไลโปไซม์ คาลบี แอล

2.16 **ยีสต์** (yeast)

ยีสต์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมากชนิดหนึ่ง ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าแต่สามารถมองเห็นผ่านการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรเห็ดรา (kingdom fungi) เช่นเดียวกับเชื้อรา โดยมีการจัดลำดับชั้นของยีสต์ไว้ดังนี้

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Subphylum: Saccharomycotina (true yeasts)
Class: Ascomycetes
Order: Saccharomycetales
Family: Saccharomycetaceae
Genus: *Saccharomyces*

ลักษณะของยีสต์จะเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) โดยปกติมีขนาดประมาณ 5 - 10 ไมครอน ยีสต์จะมีลักษณะรูปร่างแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด ไม่ว่าจะเป็นรูปร่างแบบกลม แบบรูปไข่ แบบรูปไข่ปลายแหลม แบบรูปคนโท แบบสามเหลี่ยม แบบทรงกระบอก และแบบรูปเลมอน โครงสร้างของเซลล์ยีสต์นั้น จะประกอบไปด้วยผนังเซลล์ (cell wall) ภายในเซลล์จะเป็นของเหลวเรียกว่า ไซโทพลาซึม (cytoplasm) และนิวเคลียส (nucleus) ที่มีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดใหญ่อยู่ประมาณกึ่งกลางเซลล์ นอกจากนี้ยังมีส่วนที่เป็นช่องว่าง (vacuole) ขนาดใหญ่อยู่ทางด้านท้ายของเซลล์ด้วยทางด้านการสืบพันธุ์ของยีสต์ ยีสต์จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (budding) เมื่อแตกหน่อ และเซลล์ต่อกันเป็นสาย จะมีชื่อเรียกว่า ซูโดมัยสิเลียม (psudomycelium) นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดยังสามารถสร้างเส้นใยที่แท้จริง (true mycelium) ได้เช่นเดียวกับเชื้อราอีกด้วย (กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์ และคณะ, 2550)

ยีสต์สามารถพบเจอได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นในน้ำ ในดิน หรือแม้แต่ในส่วนต่างๆ ของพืช และสัตว์ อย่างไรก็ตามเราสามารถพบยีสต์ได้บ่อยในแหล่งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เช่น ผลไม้ที่มีรสหวาน

2.17 **ยีสต์แบบทั้งเซลล์** (Whole cell yeast)

เนื่องจากไลเพสแบบภายนอกเซลล์ที่ต้องผ่านการคัดแยกไลเพส การทำให้ไลเพสบริสุทธิ์และการตรึงไลเพสลงบนตัวค้ำจุนก่อนการนำมาใช้มีราคาและต้นทุนที่สูง ทำให้ไม่คุ้มค่าต่อการนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์ จึงทำให้เกิดการศึกษาและพัฒนาวิธีการ เพื่อช่วยแก้ปัญหาทางด้านต้นทุนของไลเพส และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเพสได้แบบทั้งเซลล์มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือวิธีที่มีความน่าสนใจอย่างมาก

ในปัจจุบันการนำตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์มาใช้ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อรา แบคทีเรีย หรือยีสต์ จะเป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพสแบบภายในเซลล์ โดยมักจะมีการตรึง (immobilization) เซลล์ของจุลินทรีย์เหล่านั้นลงบนตัวค้ำจุนก่อนการนำไปใช้ ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพต่างๆ ในการทำปฏิกิริยา ทำให้สามารถใช้ซ้ำได้หลายครั้ง และช่วยลดต้นทุนของตัวเร่งปฏิกิริยาได้ (Dias Ribeiro, 2011) อย่างไรก็ตามกระบวนการตรึงเซลล์ลงบนตัวค้ำจุนนั้น จัดได้ว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยามีต้นทุนที่สูงขึ้นเช่นกัน ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการนำเซลล์ของจุลินทรีย์มาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาโดยตรง โดยไม่ต้องผ่านการตรึงลงบนตัวค้ำจุน ซึ่งทำให้สามารถประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการจัดเตรียมตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์ได้ (Jin และ Bierma, 2010) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพแบบทั้งเซลล์จะเป็นการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพสภายในเซลล์ ซึ่งจุลินทรีย์ประเภทนี้มีจำนวนน้อยจึงทำให้ไม่เป็นที่นิยม (Ghaly และคณะ, 2010)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์ เพื่อช่วยพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ผลผลิตสูง และมีค่าใช้จ่ายลดลง เนื่องจากยีสต์บางสายพันธุ์สามารถผลิตไลเพสแบบออกมานอกเซลล์ รวมทั้งยังสามารถเพาะเลี้ยงโดยใช้เพียงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่สูง แต่สามารถเก็บเกี่ยวเชื้อได้ในปริมาณที่สูง ยิ่งไปกว่านั้นการใช้ยีสต์แบบทั้งเซลล์ไม่ต้องผ่านการคัดแยก และไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมไลเพสลงอีกด้วย (Qin และคณะ, 2008) ดังนั้นไลเพสที่ได้จากยีสต์เหล่านี้จึงได้กลายมาเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่ถูกใช้ทางการค้าอย่างแพร่หลาย เนื่องมาจากการที่มันสามารถให้อัตราการเร่งปฏิกิริยา หรือกิจกรรมของเอนไซม์สูง ทั้งปฏิกิริยาการย่อยสลาย และปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (Purimprat Srimhan และคณะ, 2011) ทางผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำยีสต์แบบทั้งเซลล์ของยีสต์ที่ผลิตไลเพสแบบออกมานอกเซลล์ มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์ เนื่องจากการนำเชื้อแบบ

ทั้งเซลล์มาเร่งปฏิกิริยาโดยตรงโดยที่ไม่ต้องผ่านการคัดแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการตรึงจะสามารถช่วยลดต้นทุนของไลเพสลงได้ (Jin และ Bierma, 2010)

ตารางที่ 2.11 ผลเปรียบเทียบค่ากิจกรรมไลเพสจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ยีสต์	กิจกรรมไลเพส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของไลเพส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	อ้างอิง
Yarrowia lipolytica	0.023	0.030	วันภิเษก จุฑาภักดิ์ และคณะ, 2008
Candida thailandica	0.0026	0	
Rhodotorula mucilagenosa	1.20	-	Purimprat Srimhan และคณะ, 2011
Pseudozyma hubeiensis	5.30	-	Dias Ribeiro และคณะ, 2011
A. pullulans (HN2.3)	8.02	26.00	Liu และคณะ, 2008

2.18 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans จัดเป็นเชื้อราคล้ายยีสต์สายพันธุ์เมืองร้อนชนิดหนึ่ง พบได้มากในพื้นดินและในน้ำ มีลักษณะเป็นสีดำเข้ม จึงมีชื่อสามัญและเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปในชื่อว่ายีสต์สีดำ (black yeast) อันเนื่องมาจากการผลิตเม็ดสีด้วยตัวเอง โดย *A. pullulans* นั้น ดำรงชีวิตอยู่ในฐานะตัวกินซาก (saprobe) หรืออาจจะเรียกได้ว่าเป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) ตามธรรมชาติที่สำคัญในระบบนิเวศและห่วงโซ่อาหาร แบบเดียวกันกับจุลินทรีย์ทั่วๆ ไป

การสืบพันธุ์ของ *A. pullulans* นั้นเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการสร้างสปอร์ โดยที่สปอร์จะมีลักษณะสีเข้ม เหตุผลที่สปอร์และตัวยีสต์ *A. pullulans* มีลักษณะสีเข้มนั้นเนื่องมาจากที่บริเวณพื้นผิวมีการผลิตเม็ดสีเมลานินในระหว่างการเจริญเติบโต จึงทำให้ลักษณะของโคโลนีที่ได้มีสีดำเข้มนั้นเอง และสำหรับรูปร่างของ *A. pullulans* นั้น จะมีรูปร่างในลักษณะที่

เรียกว่ามีลักษณะที่หลากหลาย (polymorphic forms) เช่น เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเส้นใย ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมระหว่างการเจริญเติบโต โดย *A. pullulans* มีสามประเภท ได้แก่ *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum* และ *A. pullulans* var. *Aubasidani Yurlova* (Yurlova และ Hoog, 1997) นอกจากนี้ *A. pullulans* นั้นยังจัดเป็นยีสต์ที่สามารถผลิตไลเพสออกมานอกเซลล์ และสามารถพบได้ในประเทศไทยด้วย

2.19 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

โดยปกติแล้วการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่อุณหภูมิที่สูง จะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลผลิตที่สูงกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงจะไปช่วยลดความหนืดของน้ำมัน และทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย (Encinar และคณะ, 2010) แต่การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ หรือไลเพส อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ใช้จะต่ำกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพ และกิจกรรมของไลเพสในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งโดยปกติอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 30 ถึง 55 องศาเซลเซียส หรือไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ตามแต่ชนิด และแหล่งที่มาของไลเพสที่ใช้ในปฏิกิริยา เช่น จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการรายงานว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสทางการค้าโนโวไซม์ 435 จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงกว่านี้ ไลเพสจะมีค่ากิจกรรมที่ลดลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นที่แสดงว่าการเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส สามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไบโอดีเซลจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งปฏิกิริยาด้วย *Tidestromia lanuginosa* IM แต่การเพิ่มอุณหภูมิต่อไปจนเกิน 50 องศาเซลเซียสจะส่งผลกระทบในทางลบต่อการเกิดปฏิกิริยา (Gog และคณะ, 2012; Dias Ribeiro และคณะ, 2011)

2.20 ผลของแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนั้น จำเป็นต้องมีการใช้แอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้น โดยตามทฤษฎีแล้วนั้นปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะต้องการแอลกอฮอล์ 3 โมล ต่อน้ำมันหรือไตรกลีเซอไรด์ 1 โมล เพื่อเกิดเป็นไบโอดีเซล 3 โมลแต่การเพิ่มความเข้มข้น หรืออัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลเกิน 1:3 นั้น จะสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลได้ เนื่องมาจากเป็นการเพิ่มโอกาสในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันกับเมทานอล และยังเป็นการช่วยให้การเกิดปฏิกิริยาเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ไม่เกิดการขาดแอลกอฮอล์ระหว่างการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ยัง

ช่วยให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นไปอย่างรวดเร็วด้วย (Antczak และคณะ, 2009; Encinar และคณะ, 2010; Kumar และคณะ, 2011)

ส่วนใหญ่นั้นการผลิตไบโอดีเซลจะใช้เมทานอลหรือเอทานอลในการทำปฏิกิริยา เมทานอลมักจะได้รับความนิยมกว่ามาก เนื่องมาจากการที่เมทานอลมีราคาที่ถูกกว่าเอทานอล รวมทั้งการใช้เมทานอล จะได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ในจำนวนที่มากกว่าการใช้เอทานอลที่ได้ผลผลิตเป็นเอทิลเอสเทอร์ อย่างไรก็ตามการใช้เมทานอลหรือเอทานอลนั้นสามารถก่อให้เกิดผลเสียต่อการผลิตไบโอดีเซลได้เช่นกันในกรณีที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือไลเพส เนื่องจากเมทานอลหรือเอทานอลจะไปสะสมอยู่ตามโครงสร้างของไลเพส จนทำให้โปรตีนหรือไลเพสเสียสภาพ ซึ่งมีผลยับยั้งและลดประสิทธิภาพการทำงานของไลเพส โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ความเข้มข้น หรือมีอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลหรือเอทานอลสูงเกินไป ก็จะส่งผลทางลบต่อจุลินทรีย์หรือไลเพสเมื่อนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยา ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยา และผลผลิตมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาที่ผ่านมาในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่าที่อัตราส่วนน้ำมันต่อเอทานอล 1:6 สามารถเปลี่ยนน้ำมันถั่วเหลืองเป็นไบโอดีเซลได้ถึง 93 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนน้ำมันต่อเอทานอลไปที่ 1:9 และ 1:12 นั้นมีอัตราการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลเหลือเพียง 51 และ 55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีการศึกษา และหาวิธีแก้ไขปัญหานี้ โดยใช้วิธีการเติมเมทานอลหรือเอทานอลแบบเป็นขั้น หรือทำการแบ่งเติมเมทานอลหรือเอทานอลทีละน้อย ครั้งละเท่าๆกัน เพื่อไม่ให้เมทานอลหรือเอทานอลในปฏิกิริยามีความเข้มข้นสูงเกินไปนั่นเอง (Gog และคณะ, 2012; Dias Ribeiro และคณะ, 2011)

2.21 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ธนธร วิทิตศานต์ (2553) ได้ทำการศึกษาเรื่องการสังเคราะห์ซูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์ และเมทิลเอสเทอร์ด้วยไลเพสที่คัดแยกได้ในประเทศไทย พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ *A. pullulans* จากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณอู่ต่อเรือ เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ได้ และยีสต์ *A. pullulans* นี้ มีค่าแอคทิวิตีสูงที่สุดคือ 2.3±0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Pazouki และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันทำอาหารที่ผ่านการใช้งานแล้ว ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* แบบทั้งเซลล์ พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ถึง 98.4 เปอร์เซ็นต์ หลังชั่วโมงที่

72 โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 35 องศาเซลเซียส และใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่ 1:3 ด้วยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น

Jin และ Bierma (2010) ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* แบบทั้งเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้เกือบ 90 เปอร์เซ็นต์

Tamalampudi และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* แบบทั้งเซลล์ พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper)	(Whatman, England)
กระดาษกรอง PTFE	(National scientific, USA)
(membrane disc filter, dia. 47 mm, pore size 0.45 µm)	
การ์ดคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	(Alltech Associates. Inc., USA)
(model: inertsil ODS-3, length 7.5 mm, i.d. 4.6 mm)	
คอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	(Alltech Associates. Inc., USA)
(model: apollo silica 5U, length 250 mm, i.d. 4.6 mm)	
คอลัมน์แก๊สโครมาโทกราฟี	(Agilent Technologies, USA)
(model: DB-5HT,	
length 30 m x 0.32 mm x 0.1 µm film thickness)	
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirring hotplate)	(Thermolyne, USA)
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น AOC-20i	(Shimadzu, Japan)
(gas chromatography, GC)	
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)	(Witeg wisd, Germany)
เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	(Memmert, Germany)
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง รุ่น LC-20A	(Shimadzu, Japan)
(high performance liquid chromatography, HPLC)	
เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น HR-200	(Diethelm, Thailand)
(digital balance)	
เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น OHAUS	(Newyonghua, Thailand)
(digital balance)	
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	(Daihan Scientific, Korea)

เครื่องปั่น (blender) (Moulinex, France)

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) (Vision Scientific, Korea)

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerate centrifuge) (Hermle Labortechnik, Germany)

เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (P.Intertrade, Thailand)
(IQ scientific instruments pH meter)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (BioTek, USA)
(epoch microplate reader spectrophotometer)

ชุดกรองสารแบบสูญญากาศ (suction flask, buchner funnel) (Sartorius, Germany)

ปั๊มกรองสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ (vacuum pump) (GAST, USA)

ตัวกรองไนลอน (National scientific, USA)
(syringe filter nylon, dia. 13 mm, pore size 0.22 µm)

ตัวกรอง PTFE (National scientific, USA)
(syringe filter PTFE, dia. 13 mm, pore size 0.22 µm)

ดีเทคเตอร์อีแอลเอสดีสำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบ (Shimadzu, Japan)
สมรรถนะสูง (evaporative light scattering detector, ELSD)

ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (Schwabach, Germany)

ตู้ปลอดเชื้อ (Streamline Laboratory products, Singapore)
(vertical laminar flow cabinet)

ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) (Schwabach, Germany)

หลอดรังสีอัลตราไวโอเลต (UV lamp) (Sylvania, Japan)

สารเคมี

กรดซิตริก (citric acid) (Ajax Finechem, New Zealand)

กรดฟอร์มิก (formic acid) (Scharlau, Spain)

กรดปาล์มิติก (palmitic acid) (Sigma, USA)

กรดปาล์มิติกเมทิลเอสเทอร์ (palmitic acid methyl ester) (Sigma, USA)

กรดปาล์มิติกเอทิลเอสเทอร์ (palmitic acid ethyl ester) (Sigma, USA)

กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) (Sigma, USA.)

กรดลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ (linoleic acid methyl ester)	(Sigma, USA)
กรดลิโนเลอิกเอทิลเอสเทอร์ (linoleic acid ethyl ester)	(Sigma, USA)
กรดโอเลอิก (oleic acid)	(Sigma, USA)
กรดโอเลอิกเมทิลเอสเทอร์ (oleic acid methyl ester)	(Sigma, USA)
กรดโอเลอิกเอทิลเอสเทอร์ (oleic acid ethyl ester)	(Sigma, USA)
กรดไฮโครคลอริก (HCl)	(Labscan, Thailand)
คลอโรฟอร์ม (chloroform)	(Labscan, Thailand)
ไตรโซเดียมซิเตรท (trisodium citrate: $Na_3C_6H_5O_7{\cdot}2H_2O$)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Scharlau, Spain)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอตเฟต (K_2HPO_4)	(Ajax Finechem, Australia)
ไตรตอน เอกซ์-100 (triton X-100)	(Scharlau, Spain)
ไตรโอเลอิน (triolein: C18:1-CIS-9, TAG)	(Sigma, USA)
น้ำมันสบู่ดำ (physic nut oil)	(บริษัทรุ้งสวรรค์ จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำตาลกลูโคส (D-glucose)	(Ajax Finechem, Australia)
น้ำตาลซูโครส (sucrose)	(Ajax Finechem, Australia)
โนโวไซม์ 435 (Novozym® 435)	(Novozymes, Denmark)
โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)	(Merck, Germany)
เปปโตน (peptone)	(Scharlau, Spain)
พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol, *p*NP)	(Fluka, Switzerland)
พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเทต (*p*-nitrophenyl palmitate: C_{16}, *p*NPP)	(Sigma, USA)
พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรต (*p*-nitrophenyl laurate: C_{12}, *p*NPL)	(Sigma, USA)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Merck, Germany)
เมทานอล (methanol)	(Labscan, Thailand)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4{\cdot}7H_2O$)	(Merck, Germany)
โรดามีน บี (Rhodamine B)	(Ajax Finechem, Australia)
ไลโปไซม์ (Lipozyme® CALB L)	(Novozymes, Denmark)
สารแบรดฟอร์ด (Bradford’s reagent)	(Biorad,USA)

สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	(Himedia, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Himedia, India)
อะซิโตน (acetone)	(Labscan, Thailand)
อิโคเซน (eicosane)	(Aldrich, Germany)
เอทิลแอซีเทต (ethyl acetate)	(Labscan, Thailand)
เฮกเซน (*n*-hexane)	(Labscan, Thailand)
1-บิวทานอล (1-butanol)	(Merck, Germany)
1-โมโนโอเลออยล-แร็ก-กลีซอรอล (1-monooleoyl-rac-glycerol: C18:1-CIS-9, MAG)	(Sigma, USA)
1,2-ไดโอเลออยล-แร็ก-กลีซอรอล (1,2-dioleoyl-rac-glycerol: C18:1-CIS-9, 1,2-DAG)	(Sigma, U.S.A.)
1,3-ไดโอเลอิน-แร็ก-กลีซอรอล (1,3-diolein: C18:1-CIS-9, 1,3-DAG)	(Sigma, U.S.A.)
2-โพรพานอล (2-propanol,Isopropyl alcohol: $(CH_3)_2CHOH$)	(Labscan, Thailand)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การวัดอัตราการเจริญเติบโตและกิจกรรมของไลเพส และปริมาณโปรตีนของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* เมื่อใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นตัวชักนำ

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ ยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* ซึ่งได้มาจากงานวิจัยของ ธนธร วิทิตศานต์ (2553) ที่ได้ทำการคัดแยกยีสต์จากดินที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันบนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โดยยีสต์ชนิดนี้มีความสามารถผลิตไลเพสและทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูง

3.1.2 การทดสอบการผลิตไลเพสของยีสต์

นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (yeast malt agar; YMA) (ภาคผนวก ก) ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพสเชิงคุณภาพ โดยทำการเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง ที่ผสมโรดามีน บี 0.001 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

(w/v) และน้ำมันสบู่ดำ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง สังเกตการเติบโต และการผลิตไลเพสของยีสต์จากความสามารถในการเรืองแสงสีส้มภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

3.1.3 การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ

นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* จากอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง มาเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ (yeast malt broth; YMB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส ทำการบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บผลติดต่อกันตลอดระยะเวลา 120 ชั่วโมง ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อใช้วัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนับจำนวนเซลล์ยีสต์ต่อมิลลิลิตร ด้วยการดูดสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำเป็นสารละลายเจือจางลดความเข้มข้นลงตามลำดับด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ทำการเจือจางเป็น 10^{-1} ถึง 10^{-6} จากนั้นทำการดูดสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการเจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้เชื้อแพร่กระจายลงบนอาหารแข็งสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่อยู่บนจานเพาะเชื้อ โดยเลือกตัวอย่างในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนเซลล์ยีสต์ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี เพื่อนำมาสร้างกราฟการเจริญเติบโตที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์เริ่มต้น

3.1.4 การเตรียมหัวเชื้อ และการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลเพส

นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* จากอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง มาเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ (seed) ในการทดลองต่อไป จากนั้นถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส (lipase production medium; LPM)

ที่ปรับให้เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงยีสต์ *A. pullulans* (ธนธร, 2553) (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้สำหรับการผลิตไลเพสแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำมันสบู่ดำ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เพื่อชักนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ แล้วถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นให้เป็น 0.1-0.2 ที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 168 ชั่วโมง (Kamini และคณะ, 2000)

3.1.5 การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส

เตรียมเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.1.4 และเก็บตัวอย่างติดต่อกันตลอดระยะเวลา 168 ชั่วโมง ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้วัดการเจริญเติบโตด้วยวิธีวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนับจำนวนเซลล์ยีสต์ต่อมิลลิลิตร ด้วยการดูดสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ช่วงเวลาแตกต่างกัน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำเป็นสารละลายเจือจางลดความเข้มข้นลงตามลำดับด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ทำการเจือจางเป็น 10^{-1} ถึง 10^{-8} จากนั้นทำการดูดสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการเจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้เชื้อแพร่กระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่อยู่บนจานเพาะเชื้อ โดยเลือกตัวอย่างในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนเซลล์ยีสต์ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างที่ได้มาทำการแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสหรือเอนไซม์ที่ยีสต์ผลิตได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ด้วยการวัดกิจกรรมของไลเพสที่ยีสต์ผลิตได้ แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างการเจริญเติบโต และการผลิตไลเพสของยีสต์ที่เวลาต่างๆ

3.1.6 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากเชื้อในข้อ 3.1.5 มาวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford’s method) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง จากกราฟ

มาตรฐานซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานจากซีรัมของลูกวัว (bovine serum albumin, BSA) ที่มีปริมาณโปรตีน 0-25 ไมโครกรัม (Bradford, 1976) (ภาคผนวก ข)

3.1.7 วิเคราะห์กิจกรรมของไลเพส

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากเชื้อในข้อ 3.1.5 มาวัดค่ากิจกรรมของไลเพสทั้งหมดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตเมทรี แล้วเปรียบเทียบปริมาณพาราไนโตรฟีนอล (*p*-NP: *p*-nitrophenol) ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาเทียบจากกราฟมาตรฐานทีใช้สารละลายพาราไนโตรฟีนอลความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไลเพสจะเร่งปฏิกิรยา และมีการเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลลอเรต (*p*-NPL : *p*-nitrophenol laurate) ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ให้เป็นผลิตภัณฑ์ หรือพาราไนโตรฟีนอล และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร วิธีการวัดดัดแปลงมาจากวิธีของ Marini และคณะ (2012) เพื่อให้เหมาะสมต่อการวัดในปริมาณน้อย และลดความยุ่งยากในการเตรียม เนื่องจากวิธีการนี้ไม่จำเป็นต้องใช้สารลดแรงตึงผิวในปฏิกิริยา (ภาคผนวก ข)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (U : unit) มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลลอเรต เป็นพาราไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเซลล์ยีสต์แบบทั้งเซลล์ ด้วยการหาอัตราส่วนการเติมเมทานอล และอุณหภูมิในการผลิตไบโอดีเซล

การวิเคราะห์การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเซลล์ยีสต์แบบทั้งเซลล์ ด้วยการหาอัตราส่วนการเติมเมทานอล และอุณหภูมิที่เหมาะสม มีชุดการทดลองดังนี้

ในการทดลองนี้สนใจน้ำมันสบู่ดำเป็นสารตั้งต้น โดยกำหนดให้มีชุดทำปฏิกิริยาเป็นชุดที่ใช้ยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) 3 ชุด คือ ชุดที่ใช้เอนไซม์ทางการค้าโนโวไซม์ 435, ไลโปไซม์ คาลบี แอล และเอนไซม์หยาบจากยีสต์ *A. pullulans* และกำหนดให้ตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) คือชุดควบคุมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทุกการทดลองจะทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความคลาดเคลื่อน การเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บครั้งละ 700 ไมโครลิตร ที่เวลา 0, 4 ,18, 24, 48, และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ โดยไม่ให้ปริมาณตัวอย่าง

ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่เหลือน้อยกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณตัวอย่างเริ่มต้น ขั้นตอนการทดลองมีดังต่อไปนี้

3.2.1 การเตรียมตัวเร่งทางชีวภาพไลเพส โดยยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์

นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* จากอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งมาเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายยีสต์ *A. pullulans* จากอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพสที่ปรับให้เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงยีสต์ *A. pullulans* (ธนธร วิทิตศานต์, 2553) (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้สำหรับการผลิตไลเพส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำมันสบู่ดำ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อชักนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ แล้วทำการถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อ โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเริ่มต้นเป็น 0.1 - 0.2 จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งเป็นชั่วโมงที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด จากการทดลองในข้อ 3.1.7

3.2.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

นำยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ที่เตรียมพร้อมไว้แล้วสำหรับการนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในข้อ 3.2.1 มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังนี้ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส โดยเริ่มต้นที่การเติมน้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ (ใช้ปริมาณน้ำมันสบู่ดำ 30 กรัม) จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ทำปฏิกิริยานาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ที่เวลา 0, 4 ,18, 24, 48, และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที สารละลายตัวอย่างจะแบ่งเป็น 3 ชั้น นำส่วนใสชั้นบนสุดจากการปั่นเหวี่ยงไปทดสอบผลการเร่งปฏิกิริยา เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน (Shimada และคณะ, 2002) โดยตรวจสอบจากการเปลี่ยนแปลงของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์

โมโนกลีเซอไรด์ เมทิลเอสเทอร์ และกลีเซอรอล ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) จากนั้นเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นรองลงมา นำไปตรวจสอบวิเคราะห์หาปริมาณเมทานอลที่หมดไปด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) ทำการวัดกิจกรรมของไลเพสด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตเมทรี และการเจริญเติบโตของยีสต์โดยวิธีการเกลี่ยให้เชื้อกระจายบนจานเพาะเชื้อ (spread plate)

3.2.3 ศึกษาปริมาณอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

นำยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ที่เตรียมไว้ สำหรับใช้ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในข้อ 3.2.1 มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยาจากผลการทดลองในข้อ 3.2.2 และใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลแตกต่างกัน ดังนี้ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 โดยใช้วิธีการเติมเมทานอลแบ่งเป็นขั้น ทั้งสิ้นสามขั้น (three step feeding of methanol) เพื่อลดผลกระทบของเมทานอลต่อเซลล์ยีสต์ เช่น น้ำมัน 1 โมลาร์ต้องใช้เมทานอล 3 โมลาร์ ถ้าหากแบ่งเติมเมทานอล 3 ครั้ง จะต้องเติมเมทานอลครั้งละ 1 โมลาร์ เป็นต้น โดยครั้งแรกเติมเมทานอลในเวลาชั่วโมงที่ 0 หรือตอนเริ่มทำ ส่วนอีกสองครั้งเติมที่ชั่วโมงที่ 4 และ 18 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Hashemizadeh และคณะ, 2011) และควบคุมความเร็วในการกวนให้เข้ากันที่ 250 รอบต่อนาที ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ที่เวลา 0, 4 ,18, 24, 48, และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Shimada และคณะ, 2002) แล้วเก็บตัวอย่างส่วนใสชั้นบนสุดจากการปั่นเหวี่ยงไปทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ เมทิลเอสเทอร์ และกลีเซอรอล ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จากนั้นเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นรองลงมาเพื่อนำไปตรวจสอบวิเคราะห์หาปริมาณเมทานอลที่หมดไปด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ทำการวัดกิจกรรมของไลเพสด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตเมทรี และการเจริญเติบโตของยีสต์โดยวิธีการเกลี่ยให้เชื้อกระจายบนจานเพาะเชื้อ

3.2.4 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.2.4.1 การเตรียมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Shimadzu LC-20 A series, Japan)

เตรียมสาร 2 ชนิด สำหรับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้แก่ สารเอ ประกอบด้วยเฮกเซน : กรดฟอร์มิค (100 : 0.5 v/v) สารบี ประกอบด้วย เฮกเซน : ไอโซโพรพานอล : เอสทิลอะซิเตต : กรดฟอร์มิค (85 : 10 : 10 : 0.1 v/v) สารในสายล้างเข็ม (injector) ประกอบด้วย เฮกเซน : ไอโซโพรพานอล (45 : 5 v/v) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ Apollo Silica Column 5U ความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร และ Inertsil ODS-3 ความยาว 7.5 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร โดยใช้ ELSD เป็นเครื่องตรวจวัด (detector) สำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีด โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

นำตัวอย่างที่เก็บจากการทำปฏิกิริยาในข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลให้ตกออกมา แล้วดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปละลายในคลอโรฟอร์ม 490 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เจือจาง และใส่อีโคเซน (eicosane) 10 ไมโครลิตร เป็นสารมาตรฐานภายใน จากนั้นฉีดตัวอย่างลงในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เพื่อวัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่เหลือ หรือปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ เมทิลเอสเทอร์ และกลีเซอรอล ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Chulalaksananukul และคณะ, 2002)

3.2.5 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จากผลการวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

3.2.5.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

นำตัวอย่างที่เก็บจากการทำปฏิกิริยาในข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลให้ตกออกมา แล้วดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 300 ไมโครลิตร ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (deionization Water) (HPLC grade) 300 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เจือจาง และใส่ 1-บิวทานอล (1-butanol) 100 ไมโครลิตร เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) จากนั้นฉีดตัวอย่างในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เพื่อวัดปริมาณเอทานอลที่เหลืออยู่

3.2.5.2 การเตรียมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Shimadzu AOC-20i, Japan)

ฉีดตัวอย่างด้วยคอลัมน์แก๊สโครมาโทกราฟี DB-5HT ที่อุณหภูมิคอลัมน์ หัวฉีด และตัวตรวจจับเท่ากับ 40, 250 และ 300 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวนำ (carrier gas) ผลผลิตมวลรวมของผลิตภัณฑ์ คำนวณออกมาเป็นกรัมต่อลิตร

3.3 ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

โดยนำยีสต์ทั้งเซลล์โดยที่ไม่ผ่านกระบวนการแยก และการทำให้บริสุทธิ์มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ในภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2 โดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการกำจัดกลีเซอรอลออกในชั่วโมงที่ 72 และทำปฏิกิริยาในภาวะเดิมต่ออีก จากนั้นเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ที่เวลาแตกต่างกัน นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปตรวจสอบหาปริมาณผลผลิตของไบโอดีเซลที่เกิดขึ้น ตรวจสอบผลผลิตที่ได้เชิงปริมาณด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง และทำการวัดกิจกรรมของไลเพสบนเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตต่อชั่วโมงต่อกรัมไลเพส

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 หาอัตราการเจริญเติบโตและกิจกรรมของไลเพสและปริมาณโปรตีนของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* เมื่อใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นตัวชักนำ

4.1.1 ผลการศึกษาการผลิตไลเพสเชิงคุณภาพของยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง

จากการศึกษาการผลิตไลเพสของยีสต์เชิงคุณภาพในเบื้องต้น โดยการนำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *A. pullulans* ที่ได้มาจากงานวิจัยของ ธนธร วิทิตศานต์ (2553) มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่ผสมโรดามีน บี กับน้ำมันสบู่ดำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ *A. pullulans* มีการเรืองแสงสีส้มเมื่อส่องดูภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ซึ่งแสดงว่ายีสต์มีการผลิตไลเพสจริง เนื่องจากการที่ยีสต์ *A. pullulans* ผลิตไลเพสออกมาย่อยน้ำมันในอาหารซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน จะทำให้เกิดเป็นกรดไขมันประเภทโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลโดยจะทำปฏิกิริยากับโรดามีน บี จนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่มีสมบัติในการเรืองแสงสีส้ม เมื่อส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต (Kouker และ Jaeger, 1987) ดังภาพที่ 4.1

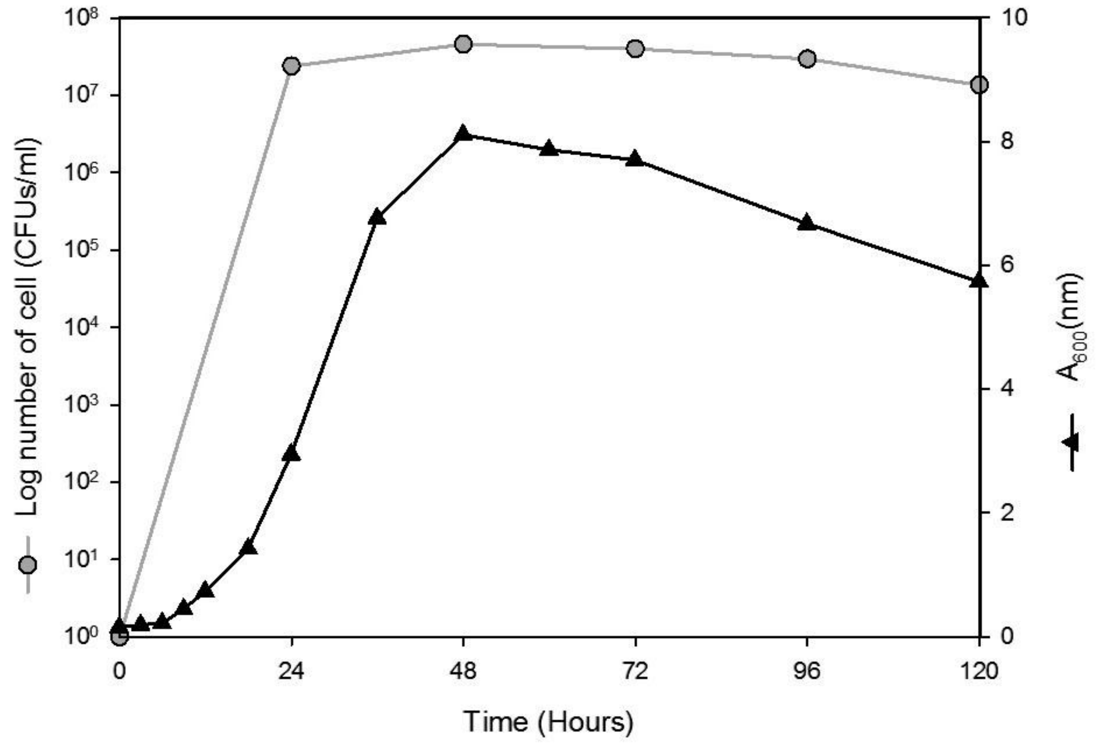
ภาพที่ 4.1 ภาพซ้ายแสดงลักษณะของยีสต์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง
ภาพกลางแสดงลักษณะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่เติมโรดามีน บี
ภาพขวาแสดงการผลิตไลเพสของยีสต์ จากการเกิดการเรืองแสงสีส้ม
เมื่อส่องดูภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต

4.1.2 การเจริญเติบโตของยีสต์ในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของยีสต์ ด้วยการนำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และทำการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยวิธีการเกลี่ยให้เชื้อแพร่กระจายบนจานเพาะเชื้อ แล้วทำการนับจำนวนเชื้อเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU (colony forming unit)/ml) จากนั้นทำการคำนวนผลที่ได้เป็นค่าล็อกจำนวนเซลล์ (log CFU/ml) เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในลักษณะการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบทวีคูณได้ โดยวิธีการนับจำนวนเชื้อเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่นิยมใช้ เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และเป็นวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากวิธีอื่นที่ไม่สามารถแยกแยะได้ว่าจำนวนเซลล์ที่ได้มาเป็นเซลล์ที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิต

จากการเปรียบเทียบผลระหว่างค่าความขุ่นหรืออัตราการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กับค่าล็อกจำนวนเซลล์ของยีสต์ *A. pullulans* ในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ พบว่ายีสต์ *A. pullulans* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ มีช่วงระยะเวลาปรับตัว (lag phase) หรือช่วงที่เชื้อมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเพื่อเตรียมตัวที่จะทำการแบ่งเซลล์ ที่ช่วงเวลา 8 ชั่วโมงแรก ต่อมาเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ช่วงการแบ่งเซลล์หรือเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (log phase หรือ exponential phase) ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 8-48 โดยในช่วงเวลาดังกล่าวเชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในลักษณะทวีคูณ และจะเริ่มเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ (stationary phase) เมื่อเชื้อไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ เนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตกับอัตราการตายของเชื้อมีปริมาณเท่ากัน จากนั้นยีสต์ *A. pullulans* จะเข้าสู่ระยะตาย (death phase) หรือระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตน้อยกว่าอัตราการตาย หลังชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป ซึ่งเมื่อทำการคำนวนหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) และระยะเวลาแบ่งเซลล์ (generation time) (ภาคผนวก ง) พบว่าช่วงเวลาที่ยีสต์ *A. pullulans* มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดคือระหว่างชั่วโมงที่ 0–24 ดังภาพที่ 4.2 โดยจะมีค่าการ

เจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดอยู่ที่ 0.71 ต่อชั่วโมง (h^{-1}) และมีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์อยู่ที่ 1 ชั่วโมงต่อการแบ่งเซลล์หนึ่งครั้ง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้เชื้อในชั่วโมงที่ 24 หรือกลางของช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ มาเป็นกล้าเชื้อในการศึกษาช่วงเวลาที่เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด



ภาพที่ 4.2 อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ *A. pullulans* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ ในช่วงระยะเวลาที่ 0–120 ชั่วโมง

4.1.3 การเจริญเติบโตของยีสต์ในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส

จากการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส ด้วยการนำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ ในชั่วโมงที่ 24 มาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปรับค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.2 เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าความขุ่นด้วยความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และทำการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยวิธีการเกลี่ยให้เชื้อกระจายบนจานเพาะเชื้อ

จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลระหว่างอัตราการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กับค่าล็อกจำนวนเซลล์ของยีสต์ *A. pullulans* ในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส พบว่ายีสต์ *A. pullulans* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพสนั้น จะไม่มีช่วงระยะเวลาปรับตัว ทั้งนี้ยีสต์ *A. pullulans* จะเข้าสู่ช่วงการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ โดยเริ่มตั้งแต่ช่วงเวลาชั่วโมงที่ 0-48 และเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ กับระยะตายต่อไปหลังชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเมื่อทำการคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และระยะเวลาการแบ่งเซลล์ พบว่าช่วงเวลาที่มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุดคือระหว่างชั่วโมงที่ 0–24 โดยมีค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.31 ต่อชั่วโมง และมีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์เท่ากับ 2.3 ชั่วโมง ต่อการแบ่งเซลล์หนึ่งครั้ง

4.1.4 การวัดปริมาณโปรตีนของยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส

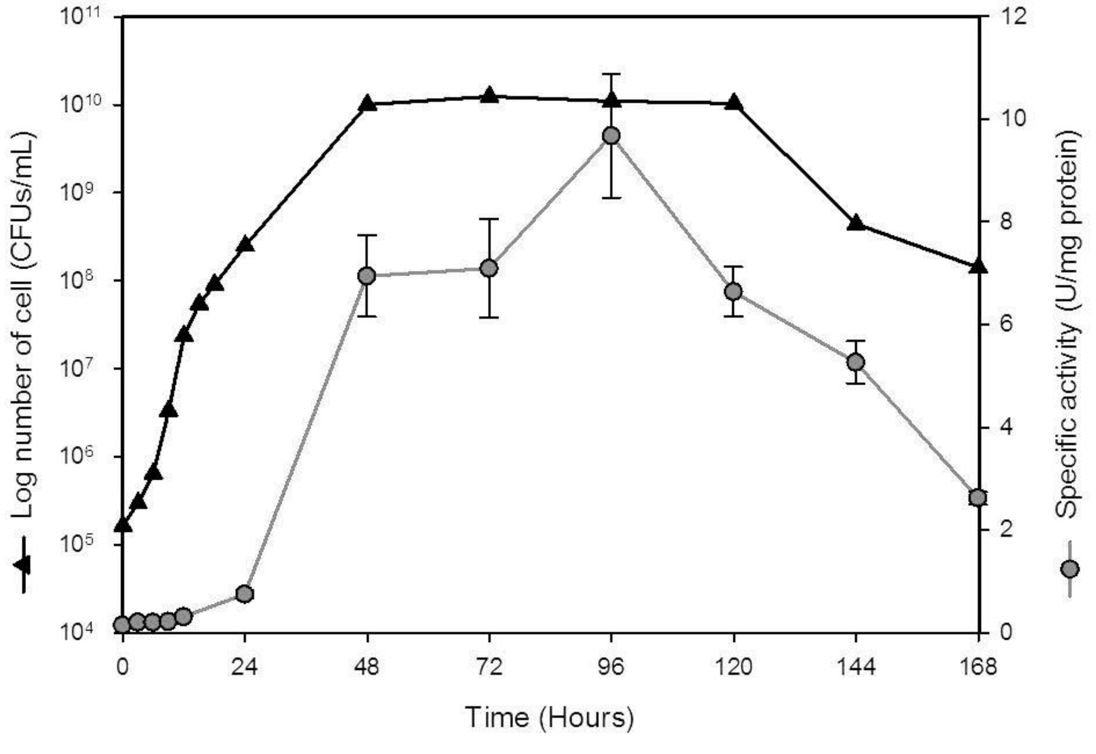
การวัดปริมาณโปรตีนในสารละลาย มีจุดประสงค์เพื่อการคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของไลเพส โดยค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเพสคือ ค่ากิจกรรมของไลเพสต่อปริมาณไลเพส หรือโปรตีน 1 มิลลิกรัม หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสปริมาณ 1 มิลลิกรัม มีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (U/mg protein) สามารถทำได้โดยการนำสารละลายตัวอย่างที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จากข้อ 4.1.3 มาทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของแบรดฟอร์ดที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร พบว่าชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณโปรตีนสูงสุดคือ 0.89±0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.1.5 การวัดค่ากิจกรรมของไลเพสจากยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส

จากการศึกษาค่ากิจกรรมของไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จากข้อ 4.1.3 มาศึกษาค่ากิจกรรมไลเพสด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี หรือความสามารถในการเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลลอเรตเป็นพาราไนโตฟีนอล ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร เพื่อวัดค่ากิจกรรมของไลเพส พบว่าค่ากิจกรรมของไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* ชั่วโมงที่ 96 มีค่ากิจกรรมของไลเพสสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 7.61±0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาค่ากิจกรรมไลเพสนอกจากการใช้พาราไนโตรฟีนิลลอเรตเป็นสารตั้งต้นแล้วเรายังสามารถใช้สารประเภทไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันเป็นสายคาร์บอนยาวชนิดอื่นได้ เช่นจากการศึกษาของ

ธนธร วิทิตศานต์ (2553) ได้ใช้พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทตเป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ใช้พาราไนโตรฟีนิลลอเรตเป็นสารตั้งต้น เนื่องจากมีขั้นตอนที่ง่ายกว่า และมีต้นทุนต่ำกว่าการใช้พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทตเป็นสารตั้งต้น

จากการนำข้อมูลข้างต้นมาคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเพส (ภาคผนวก ง) เทียบกับจำนวนล็อกจำนวนเซลล์ของยีสต์ *A. pullulans* พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเพสจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างชั่วโมงที่ 24-48 (ภาพที่ 4.2) ซึ่งจัดอยู่ในช่วงการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ และเมื่อยีสต์ *A. pullulans* เข้าสู่ระยะคงที่ในชั่วโมงที่ 48-96 ค่ากิจกรรมจำเพาะของยีสต์ *A. pullulans* ยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องแต่มีความเร็วที่ลดลง โดยพบว่ายีสต์ *A. pullulans* จะมีค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเพสสูงที่สุดเท่ากับ 9.67±1.21 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 96 หรือกลางช่วงระยะคงที่ และเริ่มลดลงเมื่อยีสต์ *A. pullulans* เริ่มเข้าสู่ระยะตาย



ภาพที่ 4.3 กิจกรรมจำเพาะของไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส ในช่วงระยะเวลาที่ 0–168 ชั่วโมง

โดยหากพิจารณาจากปริมาณของเซลล์ยีสต์ *A. pullulans* และค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเพสที่ได้จะพบว่าไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสูงที่สุด เมื่อยีสต์ *A. pullulans* อยู่ในช่วงที่แอคทีฟ มีอัตราการเจริญเติบโต และปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตสูง หรือในช่วงกลางของระยะคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาของ Liu และคณะ (2008)

นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมไลเพส และค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* กับยีสต์ชนิดอื่นจากงานศึกษาวิจัยที่ผ่านมา (ตารางที่ 2.10) พบว่ายีสต์ *A. pullulans* มีค่ากิจกรรมของไลเพส และค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเพสอยู่ในระดับที่สูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของไลเพส ไม่ว่าจะเป็นรูปแบบของสายพันธุ์ของยีสต์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ความบริสุทธิ์ของไลเพส วิธีการที่ใช้คัดแยกยีสต์ และวิธีการที่ใช้ในการวัดค่ากิจกรรมของไลเพส ยกตัวอย่าง เช่น จากงานวิจัยของ Liu และคณะ (2008) พบว่ายีสต์ *A. pullulans* HN2.3 มีค่ากิจกรรมของไลเพส และค่ากิจกรรมจำเพาะสูงถึง 8.00±0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 26 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี ในการวัดค่ากิจกรรมของไลเพส โดยใช้สารตั้งต้นเป็นพาราไนโตรฟีนิลลอเรต จากงานวิจัยระบุว่าการเติมน้ำมันมะกอกลงในอาหารระหว่างที่ยีสต์กำลังเจริญเติบโต จะส่งผลให้ค่ากิจกรรมของไลเพสมีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งการเติมน้ำมันมะกอกในเวลาชั่วโมงที่ 6 หลังจากการเริ่มเพาะเลี้ยงยีสต์ จะได้ปริมาณ ค่ากิจกรรมของไลเพสสูงถึง 8.00±0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่จะได้เพียง 3.40±0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หากเติมน้ำมันมะกอกตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง

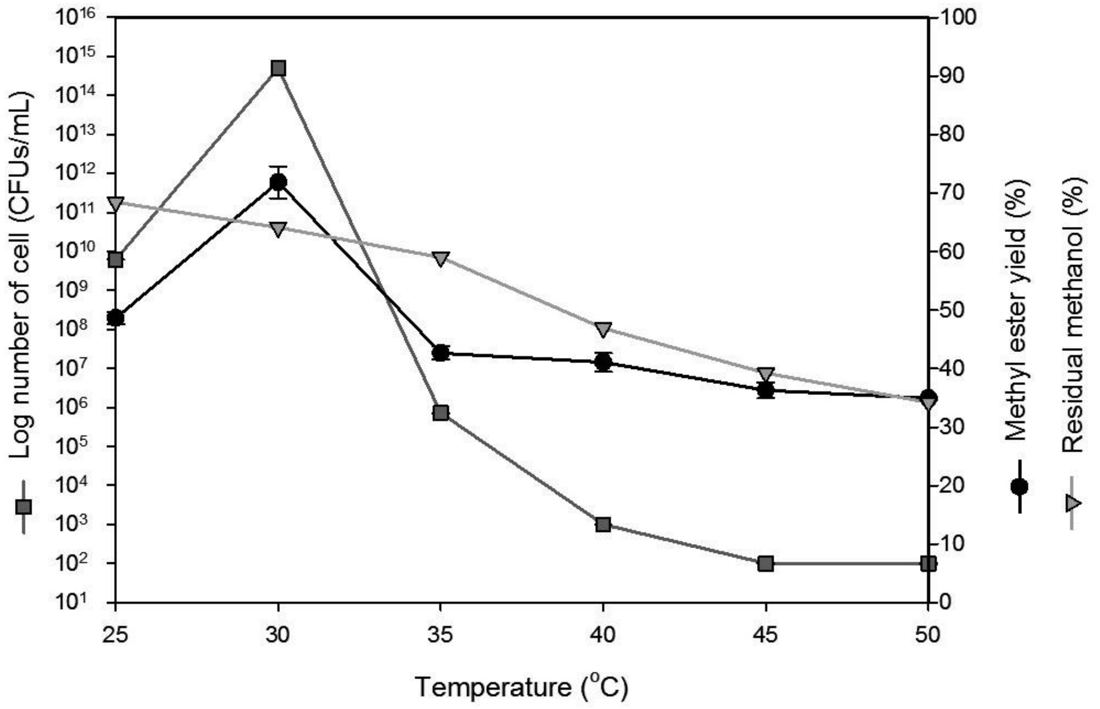
อย่างไรก็ตามยีสต์ *A. pullulans* เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ในประเทศไทย จึงมีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์เร่งปฏิกิริยาเพื่อผลิตไบโอดีเซลทางด้านต้นทุนในการผลิตไลเพส เมื่อเทียบกับความสามารถในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นในการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในขั้นตอนต่อไป จึงเลือกใช้ไลเพสจากยีสต์ *A. pullulans* ในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเพสสูงที่สุด หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นช่วงเวลาที่ไลเพสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาต่อหน่วยสูงที่สุด

4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเซลล์ยีสต์แบบทั้งเซลล์ ด้วยการหาอัตราส่วนการเติมเมทานอล และอุณหภูมิในการผลิตไบโอดีเซล

4.2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เพื่อผลิตไบโอดีเซล

อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่มีผลกระทบอย่างสูงต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ รวมทั้งมีผลต่อผลผลิตไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์ที่จะได้รับจากการทำปฏิกิริยา โดยปกติการเพิ่มอุณหภูมิปฏิกิริยาจะส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงและเร็วขึ้น แต่หากอุณหภูมิที่ใช้มี ค่าสูงเกินไปก็จะส่งผลให้ไลเพส ซึ่งเป็นโปรตีนเกิดการเสียสภาพสภาพได้ (Gog และคณะ, 2012; Dias Ribeiro และคณะ, 2011; Pazouki, 2011) ดังนั้นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จะแตกต่างกันไปตามลักษณะและแหล่งที่มาของตัวเร่งปฏิกิริยา จากการศึกษาของ Marchetti และคณะ (2007) พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าไลเพสที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกัน จะมีความคงทนต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น ไลเพสจากเชื้อ *Aspergillus nidulans* สามารถทำงานได้ดี เมื่อมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0-20 องศาเซลเซียส (Mayordomo และคณะ, 2000) แต่ไลเพสจาก *Staphylococcus warneri* จะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส (วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และอนันต์ บุญปาน , 2551) นอกจากนี้ชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ก็ส่งผลต่อช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเช่นกัน โดยอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาไม่ควรสูงกว่าจุดเดือดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้แอลกอฮอล์ซึ่งถือว่ามีความจำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยาสูญเสียไปจากการระเหย (Encinar และคณะ, 2010)



ภาพที่ 4.4 ค่าล็อกจำนวนเซลล์เปรียบเทียบกับค่าอัตราการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ ในช่วงอุณหภูมิที่ 25–50 องศาเซลเซียส ที่ชั่วโมงที่ 72

การศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้โดยตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ มาทำการศึกษาด้วยการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกัน ได้แก่ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันน้ำมันสบู่ดำ และทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ ที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่าที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 30 องศาเซลเซียส ให้ผลการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเท่ากับ 71.8±2.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์ลดต่ำลงเท่ากับ 48.6±1.0 เปอร์เซ็นต์ และผลจากการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์ลดต่ำลงเป็น 42.6±1.1, 41.1±1.6, 36.3±1.4 และ 34.9±0.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเสียสภาพของไลเพสอันเนื่องจากความร้อนในการทำ

ปฏิกิริยาที่สูงเกินไป ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จึงทำให้ปฏิกิริยาเกิดการชะลอตัว หรือดำเนินไปข้างหน้าได้ไม่เต็มที่ โดยจากผลการศึกษานี้ใกล้เคียงและสอดคล้องกับหลายงานวิจัย เช่น งานวิจัยด้านอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสของ Marchetti และคณะ (2007) ที่กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของไลเพสในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 30-40 องศาเซลเซียส ตามที่ได้กล่าวไปข้างต้น ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Jadhav และ Gawai (2012) ที่ระบุว่ายีสต์ *A. pullulans* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสด้วยเช่นกัน นอกจากนี้การทดลองของ Pazouki และคณะ (2011) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เร่งปฏิกิริยาโดยใช้ *Rhizopus oryzae* แบบทั้งเซลล์ ก็แสดงผลการศึกษาในทำนองเดียวกันคือ การเพิ่มอุณหภูมิเกินระดับที่เหมาะสมสำหรับ *R. oryzae* หรือ 35 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้อัตราผลผลิตไบโอดีเซลลดลง เนื่องจากไลเพสเกิดการเสียสภาพ และหากสังเกตปริมาณเซลล์ของยีสต์ที่อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส จะพบว่ามีปริมาณสูงที่สุด แต่การเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิจะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ของยีสต์มีจำนวนที่ลดลง ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 68.4, 64.1, 59.0, 46.9, 39.2 และ 34.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3) โดยปริมาณของเมทานอลจะมีลักษณะแปรผกผันต่ออุณหภูมิ แต่ผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้ไม่มีการเพิ่มขึ้นตามปริมาณเมทานอลที่ลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากเมทานอลมีจุดเดือดต่ำ ประมาณ 64.7 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิเข้าใกล้จุดเดือดจึงมีผลต่อการระเหยของเมทานอล จึงส่งผลให้เกิดการสูญเสียเมทานอลจากการระเหย และทำให้อัตราการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์ลดลง นอกจากนี้การใช้อุณหภูมิที่สูงยังเป็นการเพิ่มต้นทุนด้านพลังงานที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (Encinar และคณะ, 2010)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยามีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ การทำงานของไลเพส และการระเหยของเมทานอล ซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา และปริมาณผลผลิตไบโอดีเซล โดยในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันสบู่ดำ และเมทานอล ที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์

A. pullulans แบบทั้งเซลล์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งถือว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์เพื่อผลิตไบโอดีเซลในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากได้รับผลผลิตไบโอดีเซลสูงที่สุด มีระดับปริมาณเซลล์ยีสต์มากที่สุด และเป็นระดับอุณหภูมิที่ไม่สูงหรือต่ำเกินไป สามารถทำปฏิกิริยาได้ง่ายโดยไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานเพื่อปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยา ที่สำคัญทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลลงได้อีกทางหนึ่ง

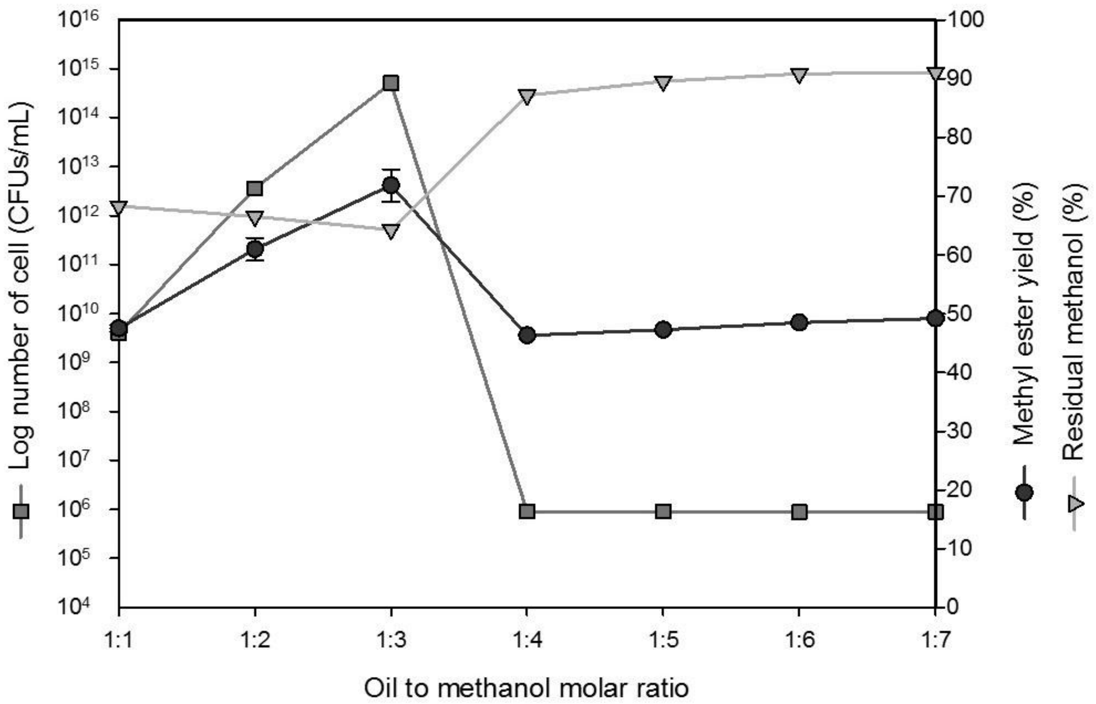
4.2.2 การศึกษาอัตราส่วนโดยโมลต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล

ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพนอกจากอุณหภูมิแล้ว อัตราส่วนโดยโมลระหว่างปริมาณน้ำมันที่เป็นสารตั้งต้นกับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณผลผลิต ในทางทฤษฎีการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ต้องใช้ปริมาณเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 โดยการเพิ่มอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลให้สูงขึ้น จะทำให้อัตราการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ หรือไบโอดีเซลมีค่าสูงและรวดเร็วขึ้น อย่างไรก็ตามหากอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลมีค่าสูงเกินจุดที่เหมาะสม อัตราการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ หรือไบโอดีเซลจะไม่เพิ่มขึ้น แต่จะเป็นการเพิ่มต้นทุนในการใช้เมทานอล (Encinar และคณะ, 2010) ในทางกลับกันในกรณีที่ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือไลเพส ปริมาณเมทานอลที่สูงเกินไปจะยับยั้งการทำงานของไลเพส โดยไปสะสมอยู่ตามโครงสร้างของไลเพส รวมทั้งบริเวณแอคทีฟไซต์ (active site) และหากมีการสะสมมากๆ จะทำให้โปรตีน หรือไลเพสนั้นเสื่อมสภาพไปจนไม่สามารถทำการเร่งปฏิกิริยาได้ และส่งผลทำให้อัตราการเปลี่ยนเป็น เมทิลเอสเทอร์ หรือไบโอดีเซลลดลง (Pazouki และคณะ, 2011)

การศึกษาอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้อัตราส่วนน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลแตกต่างกัน ได้แก่ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 โดยควบคุมปัจจัยอื่นๆ ให้เท่ากัน และใช้วิธีการเติมเมทานอลแบบสามขั้น ครั้งแรกเติมเมทานอลในชั่วโมงที่ 0 ส่วนอีกสองครั้งเติมที่ชั่วโมงที่ 4 และ 18 ตามลำดับ

ทดสอบเปรียบเทียบผลการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันสบู่ดำ ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลที่ 1:3 ให้ผลการเปลี่ยนเป็นน้ำมันสบู่ดำ หรือเมทิลเอสเทอร์สูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 71.8±2.8 เปอร์เซ็นต์ และจากการเพิ่มอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลเป็น 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์ลดต่ำลงเป็น 46.3±0.1, 47.3±0.2, 48.5±0.1 และ 49.2±0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้จะพบว่าปริมาณเซลล์ของยีสต์ *A. pullulans* มีการลดจำนวนลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อทำการเพิ่มอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลเป็น 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการเสื่อมสภาพของไลเพสเนื่องจากความเข้มข้นของเมทานอลในการทำปฏิกิริยาที่สูงเกินไป จึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์ โดยผลจากการศึกษานี้สอดคล้องกับหลายงานวิจัย เช่น ผลการศึกษาของ Pazouki และคณะ (2011) ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากเชื้อ *R. oryzae* แบบทั้งเซลล์ พบว่าที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่แตกต่างกัน โดยผลผลิตไบโอดีเซลมีการลดลงอย่างมากจาก 98.4 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 เป็น 50.7 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วนน้ำมันต่อเมทานอลที่ 1:9

จากการวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้อัตราส่วนน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 โดยควบคุมปัจจัยอื่นๆ ให้เท่ากัน จากนั้นทำการวัดปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่ด้วยการใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าปฏิกิริยาที่ใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่ 1:3 มีปริมาณเมทานอลเหลืออยู่น้อยที่สุดเท่ากับ 64.3 เปอร์เซ็นต์ แต่การเพิ่มอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลเป็น 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 พบว่าปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่จะมีปริมาณที่มากขึ้น เท่ากับ 87.2, 89.6, 90.8 และ 91.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.4 จึงสามารถสรุปได้ว่าปฏิกิริยาที่ใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่ 1:3 มีการนำเมทานอลไปใช้ในปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนน้ำมันสบู่ดำเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์มากกว่าที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลอื่น



ภาพที่ 4.5 ค่าล็อกจำนวนเซลล์เปรียบเทียบกับค่าอัตราการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ ในช่วงอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 ชั่วโมงที่ 72

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลจะส่งผลต่อการทำงานของไลเพส ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ อัตราการเกิดปฏิกิริยา และปริมาณผลผลิตไบโอดีเซล โดยอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลที่1:3 เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันสบู่ดำ ที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ โดยจะให้อัตราการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 71.8±2.8 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 72 ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 ในการนำไปประยุกต์เพื่อผลิตไบโอดีเซลในขั้นตอนต่อไป

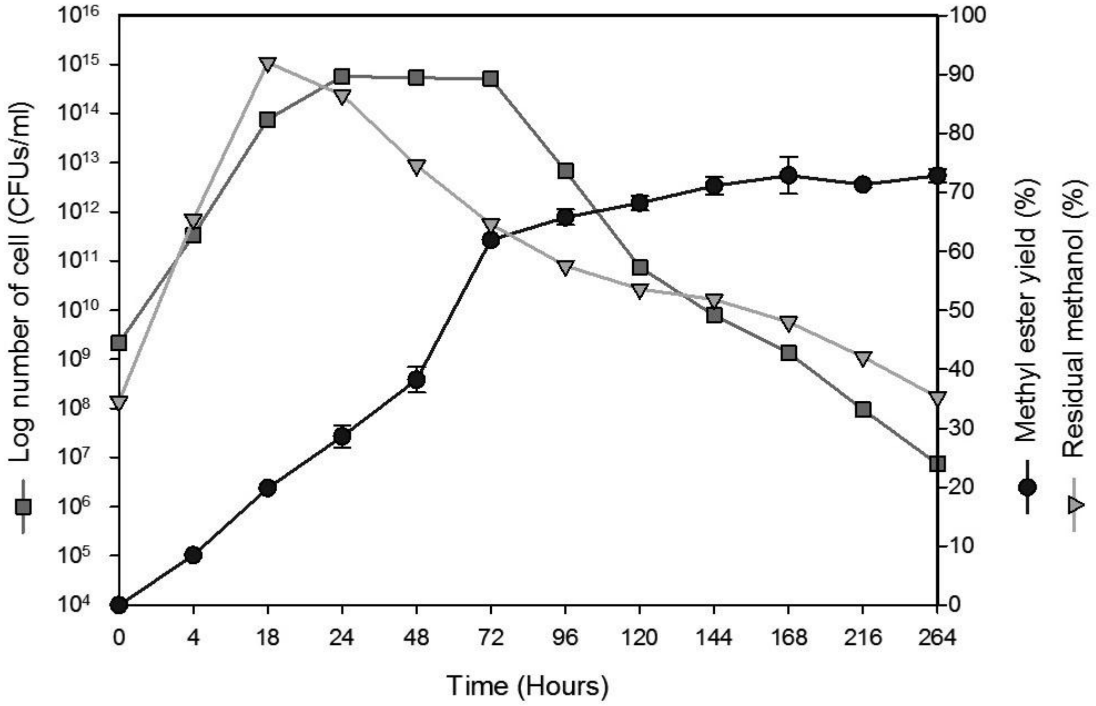
4.3 ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

การศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ ในการผลิตไบโอดีเซล โดยการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใช้อุณหภูมิ และอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลที่ระดับที่เหมาะสม เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 1:3 ตามลำดับ เพื่อศึกษาว่าระดับอุณหภูมิ และอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลที่เหมาะสม จะมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่เมื่อทำการขยายขนาดของปฏิกิริยา จากการศึกษาพบว่าที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 168 ชั่วโมง ให้ผลการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซล หรือ เมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเท่ากับ 72.9±3.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.5) นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ยีสต์ และปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยา พบว่าปริมาณของเซลล์ยีสต์มีจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรใกล้เคียงกับการทดลองที่ผ่านมา รวมทั้งมีปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาใกล้เคียงกับการทดลองที่ผ่านมา หรือเท่ากับ 64.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 72 อย่างไรก็ตามการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 168 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ผลผลิต 72.9±3.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการทำปฏิกิริยาที่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ใช้เวลา 72 ชั่วโมง และได้ผลิตภัณฑ์ 71.8±2.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าขนาดของการทำปฏิกิริยานั้น ไม่ได้เป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อระดับอุณหภูมิ และอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลที่เหมาะสม รวมทั้งไม่กระทบต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา รวมถึงอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ แต่จะกระทบต่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ทำให้ใช้เวลามากขึ้นในการทำปฏิกิริยา และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ ที่ผ่านมา ก็พบว่าวิธีการนี้ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่มากกว่า เมื่อทำปฏิกิริยาที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

จากการเปรียบเทียบอัตราการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ระหว่างผลที่ได้จากการศึกษานี้กับผลการศึกษาจากหลายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าการผลิตไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันสบู่ดำกับเมทานอล โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์แบบทั้งเซลล์จากยีสต์ *A. pullulans* นั้นเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ หรือไบโอดีเซลสูงกว่า หรือใกล้เคียงกับการใช้ไลเพสทางการค้า หรือไลเพสที่ต้องผ่านการตรึงก่อนนำมาใช้ เช่น จากการรายงานผลการวิจัยของ Gog และคณะ (2012) พบว่าผลผลิตไบโอดีเซลจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ไลเพสทางการค้า *Chromobacterium viscosum* และ

Pseudomonas cepacia ได้ผลผลิตไบโอดีเซลเท่ากับ 73 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หรือจากผลงานวิจัยของ Tamalampudi และคณะ (2008) ที่ได้ผลผลิตไบโอดีเซลจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ไลเพสทางการค้า โนโวไซม์ 435 และ *R. Oryzae* แบบทั้งเซลล์ที่ผ่านการตรึง โดยได้ผลผลิตไบโอดีเซลเท่ากับ 75.1 และ 80.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ผ่านการตรึงนั้น จะให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย รวมทั้งยังมีค่าใช้จ่ายในการผลิตที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน

เชื้อยีสต์ *A. pullulans* สามารถพบได้ในประเทศไทย ในการนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์นั้นไม่จำเป็นต้องนำไปผ่านกระบวนการตรึง และทำให้บริสุทธิ์ก่อนการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงทำให้มีขั้นตอนในการเตรียมง่ายขึ้นและมีต้นทุนในการเตรียมที่ต่ำกว่าการใช้ไลเพสทางการค้า และตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์ที่ต้องผ่านการตรึง (Fukuda และคณะ, 2001; Fukuda และคณะ, 2008; Jin และ Bierma, 2010) ยีสต์ *A. pullulans* สามารถใช้เร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิไม่สูง (30 องศาเซลเซียส) หรือใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง จึงทำให้ไม่สิ้นเปลืองพลังงานหรือเชื้อเพลิงในการทำปฏิกิริยา (Qin และคณะ, 2008) โดยความแตกต่างระหว่างการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ กับตัวเร่งปฏิกิริยาไลเพสที่ผ่านการตรึง ได้แสดงในตารางที่ 4.1 นอกจากนี้หากพิจารณาถึงสารตั้งต้น น้ำมันสบู่ดำเป็นน้ำมันที่ไม่สามารถนำมารับประทานได้ซึ่งแตกต่างจากน้ำมันชนิดอื่น เช่น น้ำมันปาล์ม จึงไม่ส่งผลกระทบต่อการแย่งทรัพยากรทางอาหารของมนุษย์ (Akbar และคณะ, 2009) จนอาจเป็นเหตุให้เกิดปัญหาขาดแคลนน้ำมันปาล์มเพื่อการบริโภค เช่นเดียวกับปี พ.ศ. 2554 ที่ผ่านมา และน้ำมันสบู่ดำมีราคาต้นทุนอยู่ที่ 12-16 บาทต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าราคาน้ำมันปาล์มดิบที่มีราคาประมาณ 14-22 บาทต่อลิตร ซึ่งส่งผลให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลลงได้ (บุญรอด วงษ์สวาท, ออนไลน์)



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ เปรียบเทียบกับปริมาณเมทานอลที่เหลืออยู่กับปริมาณเซลล์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

นอกจากนี้หากเปรียบเทียบกับการผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันที่นิยมใช้สารเคมีด่างที่มีราคาถูกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและให้ปริมาณผลผลิตสูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ (Shah และคณะ, 2003) เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันสบู่ดำเช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ พบว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ ถึงแม้จะได้ผลผลิตที่น้อยกว่า แต่ก็ยังมีข้อได้เปรียบกว่า เนื่องจากเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ไม่ก่อให้เกิดปัญหาน้ำเสียและสูญเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย รวมทั้งไม่มีโอกาสเกิดสบู่ในปฏิกิริยาแบบเดียวกับการใช้ด่าง จึงทำให้การทำปฏิกิริยามีความซับซ้อนน้อยกว่า เพราะสามารถแยกกลีเซอรอลออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่า (Parawira, 2010)

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบผลของการใช้ยีสต์แบบทั้งเซลล์ และไลเพสที่ผ่านการตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (วันภิเษก จุฑาภักดิ์, 2551)

ปัจจัย	ยีสต์แบบทั้งเซลล์	ไลเพสที่ผ่านการตรึง
การเตรียมไลเพส	เลี้ยงเชื้อ	เลี้ยงเชื้อและกรองเอนไซม์
การทำให้เข้มข้น	ไม่ต้องทำให้เข้มข้น ใช้ยีสต์แบบทั้งเซลล์ได้ทันที	ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการใช้ผงดูดซับน้ำร่วมกับถุงเยื่อเลือกผ่าน และทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเย็น
การเตรียมตัวค้ำจุน	ไม่มี	กรองตัวค้ำจุนด้วยวิธีการกรองแบบสูญญากาศ และทำให้แห้งด้วยเก็บในโถดูดความชื้น
การตรึงไลเพส	ไม่มี	ใช้ไลเพสแห้งผสมเข้ากับตัวค้ำจุนเติมเฮปเทนเพื่อเป็นสารตัวกลางในการตรึงผสมสาร
การแยกไลเพสหลังตรึงรูป	ไม่มี	ใช้วิธีการกรองแบบสูญญากาศ ล้างไลเพสตรึงรูปที่ได้ด้วยเฮปเทน จากนั้นทำแห้งโดยเก็บในโถดูดความชื้น
ขั้นตอนการเตรียมตัวเร่งปฏิกิริยา	ง่าย ใช้เวลาน้อย	ยุ่งยาก ใช้เวลานาน
อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา	30 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
ผลผลิต	เมทิลเอสเทอร์	เมทิลเอสเทอร์
น้ำในวัตถุดิบ	ไม่รบกวนต่อปฏิกิริยา	ไม่รบกวนต่อปฏิกิริยา
การแยกกลีเซอรอล	ง่าย	ง่าย
การทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ไม่มี	ไม่มี
ต้นทุนการผลิต	ถูก	ค่อนข้างแพง
การนำไลเพสไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซ้ำ	ใช้ได้ครั้งเดียว	แยกไลเพสนำมาใช้ซ้ำได้แต่ผลผลิตจะลดลงประมาณ 30เปอร์เซนต์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันน้ำมันสบู่ดำ เร่งปฏิกิริยาด้วยยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ เพื่อการผลิตไบโอดีเซล พบว่ายีสต์ *A. pullulans* เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส และเมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส ยีสต์ *A. pullulans* จะมีค่ากิจกรรมของไลเพส และค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 7.61±0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 9.67±1.21 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 96 หรือช่วงกลางของระยะคงที่ ซึ่งเป็นช่วงที่ยีสต์แอคทีฟ และมีการปริมาณเซลล์สูงที่สุด ดังนั้นชั่วโมงที่ 96 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส จึงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการนำยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อผลิตไบโอดีเซล

เมื่อทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เร่งปฏิกิริยาด้วยยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ พบว่าได้ผลผลิตไบโอดีเซลสูงสุดเท่ากับ 71.8±2.8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจึงเป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยหากอุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตที่ลดลง ทำให้ได้ผลผลิตไบโอดีเซลที่ลดลง ส่วนอุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตที่ลดลง และทำให้ได้ผลผลิตลดลงเช่นเดียวกัน

สำหรับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เร่งปฏิกิริยาด้วยยีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ และใช้วิธีการแบ่งเติมเมทานอลแบบสามครั้ง มีค่าเท่ากับ 1:3 ซึ่งการเพิ่มอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลไปที่ 1:4, 1:5, 1:6 และ 1:7 ปริมาณเมทานอลที่มากเกินไปจะมีผลทางลบต่อยีสต์ และเกิดการยับยั้งอัตราการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งส่งผลให้ปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลลดลง

การผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันน้ำมันสบู่ดำ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรสารละลาย 200 มิลลิลิตร โดยใช้อุณหภูมิ และอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลที่เหมาะสม พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้สูงที่สุดเท่ากับ 72.9±3.1 เปอร์เซ็นต์ ภายในชั่วโมงการทำปฏิกิริยาที่ 168

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์, อรัญญา คงถาวร, กฤษณา ตระการไทย และกัญญลักษณ์ ชัยคำภา. 2550. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา สำหรับใช้ในการเรียนการสอนทางห้องปฏิบัติการ. ศรีนครินทร์ เวชสาร 22, 4 (ตุลาคม–ธันวาคม 2550): 394-400.

ณกัญภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. 2549. เอนไซม์ไลเปส : การผลิต และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 26, 2 (พฤษภาคม–สิงหาคม 2549): 114-131.

ธนธร วิทิตศานต์. 2553. การสังเคราะห์ชูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์ด้วยไลเพสจากยีสต์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บุญรอด วงษ์สวาท. วัตถุดิบที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/biodisiel_material.htm [6 เมษายน 2556]

ปุริมปรัชญ์ ศรีหมาน. 2552. การผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นที่มียีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และ อนันต์ บุญปาน (2551). การทำเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์. ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46, หน้า 352-360. 29 มกราคม-1 กุมภาพันธ์ 2551 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

วันภิเษก จุฑาภักดิ์. 2551. การตรึงรูปไลเพสจากยีสต์ *Candida rugosa* เพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akbar, E., Yaakob, Z., Kamarudin, S.K., Ismail, M., and Salimon, J. 2009. Characteristic and Composition of Jatropha Curcas Oil Seed from Malaysia and its Potential as Biodiesel Feedstock Feedstock. European Journal of Scientific Research. 29,3 : 396-403.

Antczak, M.S., Kubiak, A., Antczak, T., and Bielecki, S. 2009. Enzymatic biodiesel synthesis-Key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy. 34 : 1185–1194.

Bacha, J., and others. 2007. Diesel Fuels Technical Review. CA: Chevron Corporation.

Becker, K., and Francis, G. 2000. Bio-diesel from Jatropha plantations on degraded land. Department of Aquaculture Systems and Animal Nutrition, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analysis Biochemistry. 72 : 248–254.

Branwal, B.K., and Sharma, M.P. 2005. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 9 : 363-378.

Chulalaksananukul, S., Chulalaksananukul, W., Lozano, P., and Combes, D. 2002. Long-term continuous synthesis of geranyl acetate in a column reactor with and immobilized lipase. Thai Journal Agriculture Science. 1 : 9-16.

De Sousa, J.S., D'Avila Cavalcanti-Oliveira, E., Gomes Aranda, D.A., and Guimarães Freire, D.M. 2010. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 65,1-4 : 133-137.

Dias Ribeiro, B., De Castro, A.M., Zarur Coelho, M.A., and Guimaraes Freire, D.M. 2011. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research.

El-Mashad, H.M., Zhang, R., and Avena-Bustillos, R.J. 2008. A two-step process for biodiesel production from salmon oil. Biosystems Engineering. 99 : 220-227.

Encinar, J.M., Gonzalez, J.F., Pardal, A., and Martinez, G. 2010. Transesterification of rapeseed oil with methanol in the presence of various co-solvents. Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste Venice, Italy.

Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S., and Noda, H. 2008. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production : A review. Trends in Biotechnology. 26,12 : 668-673.

Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal Bioscience Bioengineering. 92 : 405-416.

Gandhi N.N. 1997. Applications of lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society. 74 : 621–634.

Ghaly, D.D., Brooks, M.S., and Budge, S. 2010. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. Renewable Energy. 39 : 10–16.

Gog, A., Roman, M., Tosa, M., Paizs, C., and Florin, D.I. 2012. Biodiesel production using enzymatic transesterification e Current state and perspectives. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 6,2 : 54–76.

Gupta, N., Shai, V., and Gupta, R. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. Process Biochemistry. 42,2 : 518–526.

Hasan, F., Shah, A.A., and Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology. 39,2 : 235–251.

Hashemizadeh, S.N., Tavakoli, O., Tabandeh, F., Karkhane, A.A., and Forghanipour, Z. 2011. A Comparative Study of Immobilized-Whole Cell and Commercial Lipase as a Biocatalyst for Biodiesel Production from Soybean Oil. World Renewable Energy Congress. In Bahram Moshfegh (ed.), World Renewable Energy Congress - Sweden : 311-318, Sweden.

Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S. 2001. Production of biodesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 16 : 53-58.

Jadhav, D., and Gawai, D. 2012. Effect Of pH And Temperature on Growth of Phylloplane Yeast *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud. Plant Sciences Feed. 2,11 : 159-162.

Jin, G., and Bierma, J.T. 2010. Whole-cell Biocatalysts for Producing Biodiesel from Waste Greases. ISTC Reports; Illinois Sustainable Technology Center, USA.

Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., and Iefuji, H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. Process Biochemistry. 36 : 317-324.

Kouker, G., and Jaeger, K. E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology. 53 : 211-213.

Kumar, G., Kumar, D., Poonam, Johari, R., and Singh, C.P. 2011. Enzymatic transesterification of Jatropha curcas oil assisted by ultrasonication. Ultrasonics Sonochemistry. 18 : 923–927.

Kwon, S.J., Han J.J., and Rhee J.S. 1995. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane. Enzyme and Microbial Technology. 17,8 : 700-704.

Leung, D.Y.C., Wu, X., and Leung, M.K.H. 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. Applied Energy. 87 : 1083–1095.

Liu, Z., Chi, Z., Wang, L. and Li., J. 2008. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. Biochemical Engineering Journal. 40 : 445-451.

Ma, F., and Hanna, M.A.1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology. 70 : 1-15.

Marchetti, J.M., Miguel, V.U. and Errazu, A.F. 2007. Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 11 : 1300-1311.

Marini, A., Imelio, N., Marini, S., Romaninin, D., and Farruggia, B. 2012. Extraction of lipase from *Aspergillus niger* by insoluble complex formation with anionic and cationic polyelectrolytes. Process Biochemistry. 47 : 2234–2239.

Mayordomo, I., Randez-Gil, F., and Prieto J.A. 2000. Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from Aspergillus nidulans. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48 : 105-109.

Nie, K., Xie, F., Wang, F., and Tan, T. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodesel: Optimization of the biodesel production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 43 : 142-148.

Novozymes A/S a. Novozym® 435. Novozymes Product Data Sheet [Online]. Available from: http://www.brenntagspecialties.com/en/downloads/Products/Food/Novozym-es/Novozym_435_PDS.pdf [1 December 2012]

Novozymes A/S b. Lipozyme® CALB L. Novozymes Product Data Sheet [Online]. Available from: http://www.brenntagspecialties.com/en/downloads/Products/Food-/Novozymes/Lipozyme_CALB_L_PDS.pdf [1 December 2012]

Parawira, W. 2010. Biodiesel production from Jatropha curcas: A review. Scientific Research and Essays. 5,14 : 1796-1808.

Pazouki, M., Zamani, F., Zamzamian, S.A.H., and Najafpour, G. 2011. Study on Reaction Conditions in Whole Cell Biocatalyst Methanolysis of Pretreated Used Cooking Oil. World Renewable Energy Congress, Sweden.

Pinto, A.C., and others. 2005. Biodiesel: An overview. Journal of the Brazilian Chemical Society. 16,6B : 1313-1330.

Qin, H., Yan, X., and Dong, W. 2008. Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from Rhizopus chinensis. Chinese Journal of Catalysis. 29,1 : 41-46.

Rahman, M.K., Mashud, M., Roknuzzaman, Md., and Galib, A.A. 2010. Biodiesel from jatropha oil as an alternative fuel for diesel engine. International Journal of Mechanical & Mechatronics. 10,3 : 1-6.

Ranganathan, V.S., Narasimhan, L.S., and Muthukumar, K. 2007. An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource Technology. 99 : 3975-3981.

Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., and Schmid, R. D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from Bacillus

thermocatenulatus. Biochimica et Biophysica Acta, L. Lipids and lipid metabolism. 1214 : 43-53.

Schuchardt, U., Sercheli, R., and Vargas, R.M. 1998. Transesterification of Vegetable Oils: A Review. Journal of the Brazilian Chemical Society. 9,1 : 199-210.

Shah, S., Sharma, S., and Gupta, M.N. 2003. Enzymatic transesterification for biodiesel production. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 40 (December 2003): 392-399.

Sharma, D., Sharma, B., and Shukla, A.K. 2011. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. Biotechnology. 10 : 23-40.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel reduction and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17 : 133-142.

Singh, K.R., and Padhi, K.S. 2009. Characterization of jatropha oil for the preparation of biodiesel. Natural Product Radiance. 8,2 : 127-132.

Srimhan, P., Kongnum, K., Taweerodjanakarn, S., and Hongpattarakere, T. 2011. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. Enzyme and Microbial Technology. 48,3 : 293–298.

Tamalampudi, S., Talukder, M.R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A. and Fukuda, H. 2008. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. Biochemical Engineering Journal. 39 : 185-189.

Toscano, L., Gochev, V., Montero, G. and Stoytcheva, M. 2011. Enhanced Production of Extracellular Lipase by Novel Mutant Strain of *Aspergillus Niger*. Biotechnol. & Biotechnol. EQ. 25 : 2243-2247.

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M., and Oliveira, J.V. 2010. A Review on Microbial Lipases Production. Food and Bioprocess Technology. 3,2 : 182-196.

Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyakananon, K., Tantong, S., Thakernkarnkit, W., Chulalaksananukul W., and Yongvanich, T. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. Biomass and Bioenergy. 32 : 1279-1286.

Worapun, I., Pianthong, K., and Thaiyasuit, P. 2010. Synthesis of biodiesel by two-step transesterification from crude *jatropha curcus* L. oil using ultrasonic irradiation assisted. KKU Engineering Journal. 37,3 (July-September 2010) : 169-179.

Yurlova, NA., and de Hoog, GS. 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. Antonie van Leeuwenhoek. 72 : 141–147.

Yurlova, N.A., de Hoog, G.S., and Gerrits van den Ende, A.H.G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. Studies in Mycology. 43 : 63-69.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (yeast malt agar)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	5	กรัม
เปปโตน (oeptone)	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (d-glucose)	10	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงก่อนการเลี้ยงเชื้อ (yeast malt broth)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (d-glucose)	10	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. YMA + Rhodamine B

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
เดกโตรส (dextrose)	10	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร
วุ้นผง (agar powder)	20	กรัม
โรดามีน บี (rhodamine B)	0.001% (น้ำหนักโดยปริมาตร)	
น้ำมันสบู่ดำ (physic nut oil)	1% (น้ำหนักโดยปริมาตร)	

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส (lipase production medium)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	11.7	กรัม
น้ำตาลซูโครส	14	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1	กรัม
น้ำมันสบู่ดำ (physic nut oil)	1.44 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v)	

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 5.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายตรวจวัดค่าแอคทิวิตีของไลเพส

1.1 Substrate

พาราไนโตรฟีนิลลอเรต (*p*-nitrophenyl laurate, *p*NPL)	80.4	มิลลิกรัม
เอทานอล (absolute ethanol)	10	มิลลิลิตร

1.2 0.05 M Citrate buffer, pH 6.0

กรดซิตริก ($C_6H_8O_7$)	1.33	กรัม
โซเดียมซิเตรต ($Na_3(C_6H_5O_7)$)	12.85	กรัม

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายพาราไนโตรฟีนอลสำหรับกราฟมาตรฐาน

พาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitropheno, *p*NP)	0.2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	มิลลิลิตร

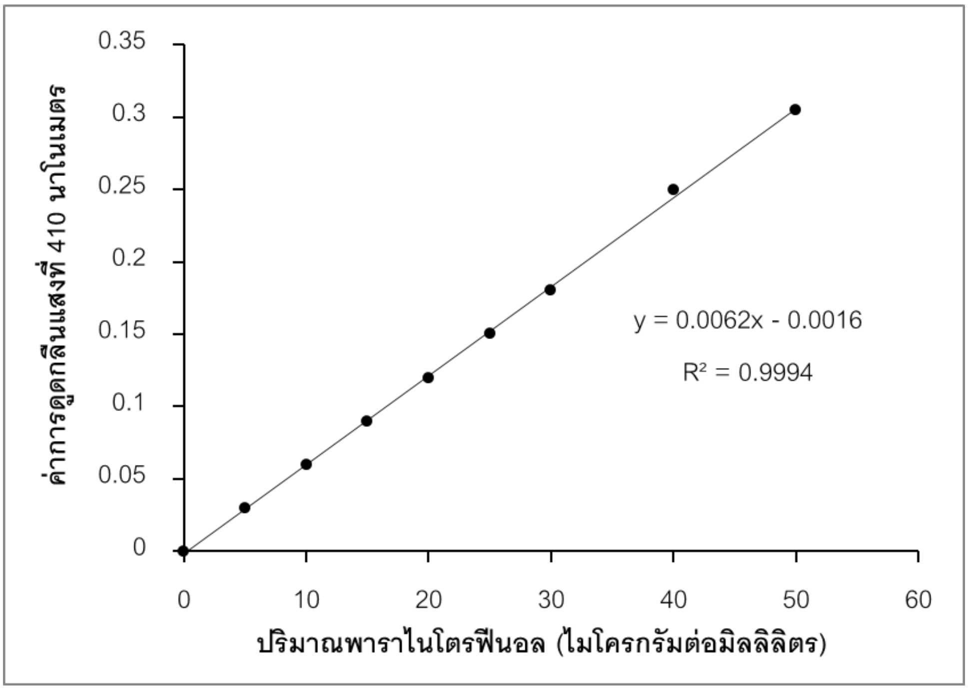
3. สารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินตรวจวัดปริมาณโปรตีนสำหรับกราฟมาตรฐานของโปรตีน

โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)	2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของไนโตรฟีนอลสำหรับนำไปใช้คำนวณแอคทิวิตีของไลเพส



ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ปริมาณ 0-50 ไมโครกรัม

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟีนอล

1. เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟีนอล 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

2. ปิเปตสารละลายพาราไนโตรฟีนอล จากข้อ 1 น้ำกลั่น และ 50 มิลลิโมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.0 ลงใน well microplate ตามตารางด้านล่าง

ตารางที่ ค-1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล 0-20 ไมโครกรัม

พาราไนโตรฟีนอล (ไมโครกรัม)	สารละลาย พาราไนโตรฟีนอล (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 (ไมโครลิตร)
0	0	350	650
5	25	325	650
10	50	300	650
15	75	275	650
20	100	250	650
25	150	225	650
30	125	200	650
40	200	150	650
50	250	100	650

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

4. นำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร และปริมาณพาราไนโตรฟีนอล (ไมโครกรัม)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของไลเพสที่สามารถเปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลลอเรตเป็นพาราไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที

วิธีการตรวจสอบค่าแอคทิวิตีของไลเพสในสารละลายตัวอย่าง

1. สารละลายตรวจวัดค่าแอคทิวิตีของไลเพส

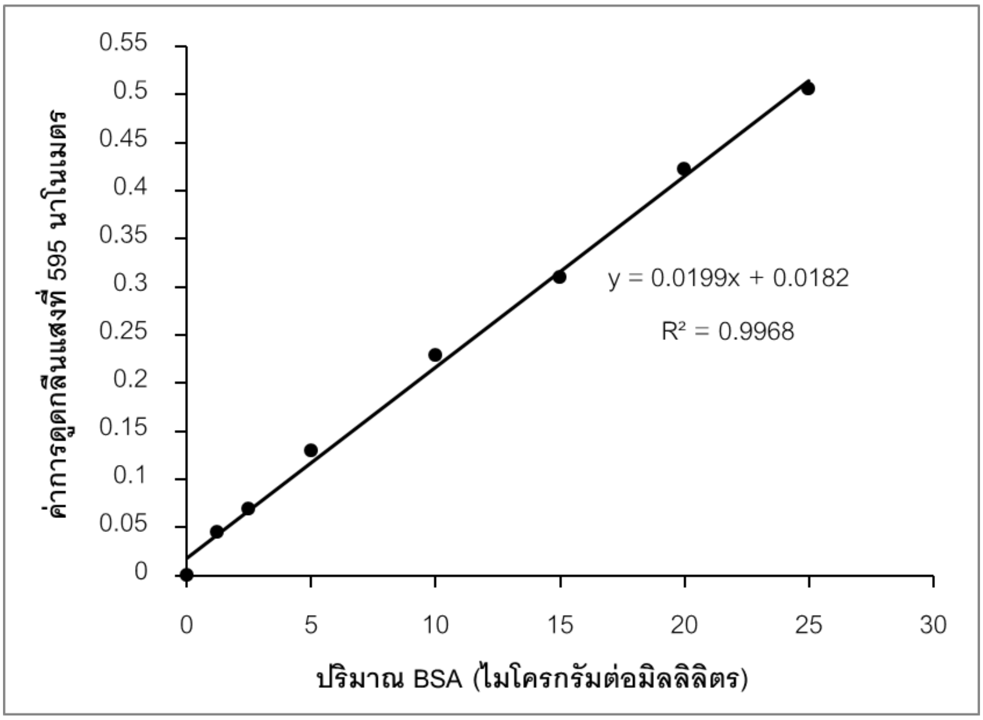
สารละลายเอนไซม์	250	ไมโครลิตร
0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0	650	ไมโครลิตร
25 มิลลิโมลาร์ พาราไนโตรฟีนิลลอเรต	100	ไมโครลิตร

กรณีหลอดควบคุมจะไม่ใส่สารละลายเอนไซม์แต่ใส่ซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 แทน จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2. บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอลต่อไป

2. กราฟมาตรฐานของ BSA สำหรับนำไปใช้คำนวณปริมาณโปรตีน



ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของ BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-25 ไมโครกรัม

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนสารละลาย BSA

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน BSA ลงใน Tube ตามตารางด้านล่าง

ตารางที่ ค-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของBSA 0-25 ไมโครกรัม

ปริมาณ BSA (ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของ สารละลาย BSA	สารละลาย BSA (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
25	2 mg/ml	10	790
20	2 mg/ml	10	990
15	2 mg/ml	6	794
10	20µg/ml	500	500
5	10 µg/ml	500	500
2.5	5 µg/ml	500	500
0	-	-	1000

3. สารละลายมาตรฐาน BSA ลงใน microplate well ละ 150 ไมโครลิตร

4. เติมสารละลาย Bradford reagent 150 ไมโครลิตร

5. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

7. นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)

ภาคผนวก ง

การคำนวณ

1. การคำนวณหาแอคทิวิตีทั้งหมด (total activity)

ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรของตัวอย่างมาใช้ในการคำนวณ โดยแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ดังนี้

$Y = 0.0061X$

- ทำการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรในค่า Y จะได้ค่า X ซึ่งเป็นปริมาณของไนโตรฟีนอลในหน่วยไมโครกรัม จากนั้นเปลี่ยนไมโครกรัมให้เป็นไมโครโมลโดยหารด้วยมวลโมเลกุลของพาราไนโตรฟีนอล ซึ่งเท่ากับ 139.11
- หาความเข้มข้นของไนโตรฟีนอลโดยปรับหน่วยให้เป็นต่อมิลลิลิตรโดยหารด้วยปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาและคูณด้วยปริมาณสารในปฏิกิริยาทั้งหมด จะได้หน่วยไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
- หาปริมาณไนโตรฟีนอลที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที โดยหารด้วยเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาทั้งหมดจะได้หน่วยสุดท้ายเป็นไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที หรือ ยูนิตต่อมิลลิลิตร

1 ยูนิตของไลเพส เท่ากับ 1 ไมโครโมลของของพาราไนโตรฟีนิลลอเรตที่ถูกไฮโดรไลซ์ภายในเวลา 1 นาที หรือ 139.11 มิลลิกรัมของพาราไนโตรฟีนอลที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายในเวลา 1 นาที

2. การคำนวณหาปริมาณโปรตีน (total protein)

ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรของตัวอย่างมาใช้ในการคำนวณ

Y = 0.0156X

ทำการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในค่า Y จะได้ค่า X ซึ่งแทนปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครกรัมเป็นมิลลิกรัม โดยหารด้วย 1000 จะได้หน่วยสุดท้ายเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การคำนวณหาแอคทิวิตีจำเพาะ (specific activity)

ใช้ค่าแอคทิวิตีที่คำนวณได้ในข้อ 1. หารด้วยปริมาณโปรตีนทั้งหมดในข้อ 2. ดังนี้

$$\text{Specific activity (unit/mg protein)} = \frac{\text{Total activity (unit/ml)}}{\text{Total protein (mg/ml)}}$$

จะได้หน่วยสุดท้ายเป็น ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

4. การคำนวณหาอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ)

ทำได้โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

Specific growth rate (μ) = $(Ln_{x2} – Ln_{x1}) / t_2 - t_1$

โดยกำหนดให้

x_2 = จำนวนเซลล์ของเชื้อ เวลาที่เก็บตัวอย่างเชื้อ

x_1 = จำนวนเซลล์ของเชื้อ เวลาที่เริ่มเพาะเชื้อ

t_2 = เวลาที่เก็บตัวอย่างเชื้อ

t_1 = เวลาที่เริ่มเพาะเชื้อ

5. การคำนวณหาระยะเวลาที่เชื้อใช้แบ่งตัวเป็นทวีคูณ (generation time, G)

ทำได้โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

Generation time (G) = $t / 3.3 (\log N/N_0)$

โดยกำหนดให้

t = เวลา (นาที หรือชั่วโมง)

N_0 = จำนวนเซลล์ของเชื้อ เวลาที่เก็บตัวอย่างเชื้อ

N = จำนวนเซลล์ของเชื้อ เวลาที่เริ่มเพาะเชื้อ

6. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ทำได้โดยแทนค่าที่ได้จากฉีดตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงในสมการ

$$\%conversion = \frac{[FAME] \times 100}{3[TAG] + 2[1, 3\ DAG] + 2[1, 2\ DAG] + [MAG] + [FFA] + [FAME]}$$

เมื่อ %conversion คือ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

[FAME] คือ ความเข้มข้นของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากโครมาโทแกรม

[TAG] คือ ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[1,3 DAG] คือ ความเข้มข้นของ 1,3 ไดกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[1,2 DAG] คือ ความเข้มข้นของ 1,2 ไดกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[MAG] คือ ความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระจากโครมาโทแกรม

7. การคำนวณอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์ต่อเมทานอล

หาน้ำหนักของเมทานอลจากสูตร $Y = \frac{(A)(B)(MW_{MeOH})}{MW_{PO}}$

โดยที่ Y คือน้ำหนักของเมทานอล

A คือ น้ำหนักของน้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์จากการชั่ง

B คือ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล

MWPO คือน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์ เท่ากับ 870 กรัม

MWMeOH คือ น้ำหนักโมเลกุลของเมทานอล เท่ากับ 32.04 กรัม

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u> กำหนดให้อัตราส่วนของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 จากนั้นชั่งน้ำมันสบู่ดำ 3 กรัม คิดเป็นปริมาตรประมาณ 2.68 มิลลิลิตร

ดังนั้น $Y = \frac{(30)(3)(32.04)}{870} = 3.314$ กรัม

ดังนั้นคิดเป็นปริมาตร จากสูตร $Z = \frac{Y}{D}$

เมื่อ Z คือ ปริมาตรของเมทานอล

Y คือ น้ำหนักเมทานอล

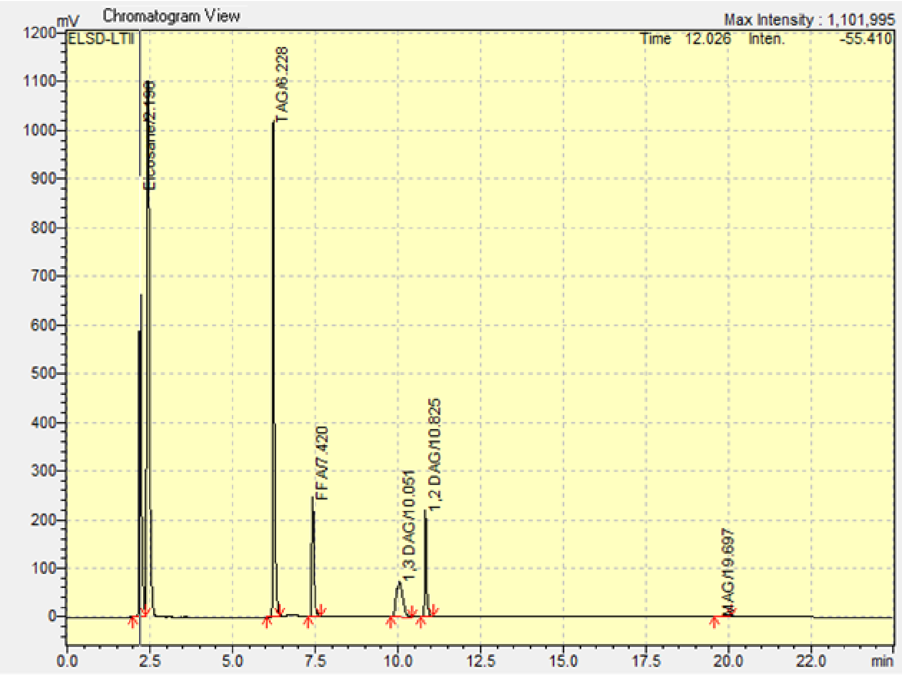
D คือ ค่าความหนาแน่นของเมทานอลเท่ากับ 791 กรัมต่อลิตร

จะได้ $Z = \frac{(3.314)(1000)}{791} = 4.19$ มิลลิลิตร

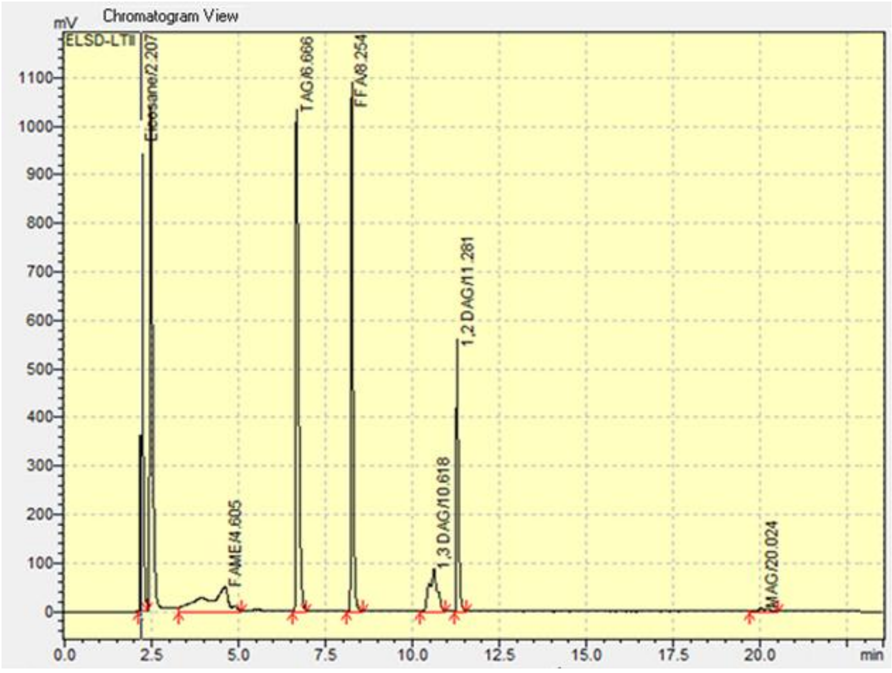
ภาคผนวก จ

ข้อมูล

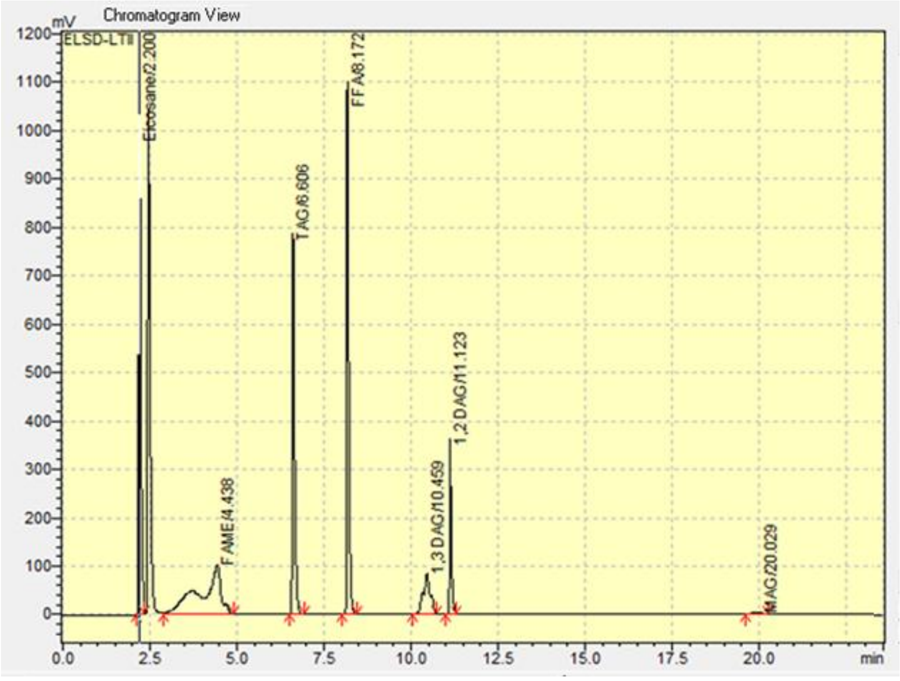
การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เวลาต่างๆ โดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบจากตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนน้ำมันต่อเมทานอลที่ 1:3



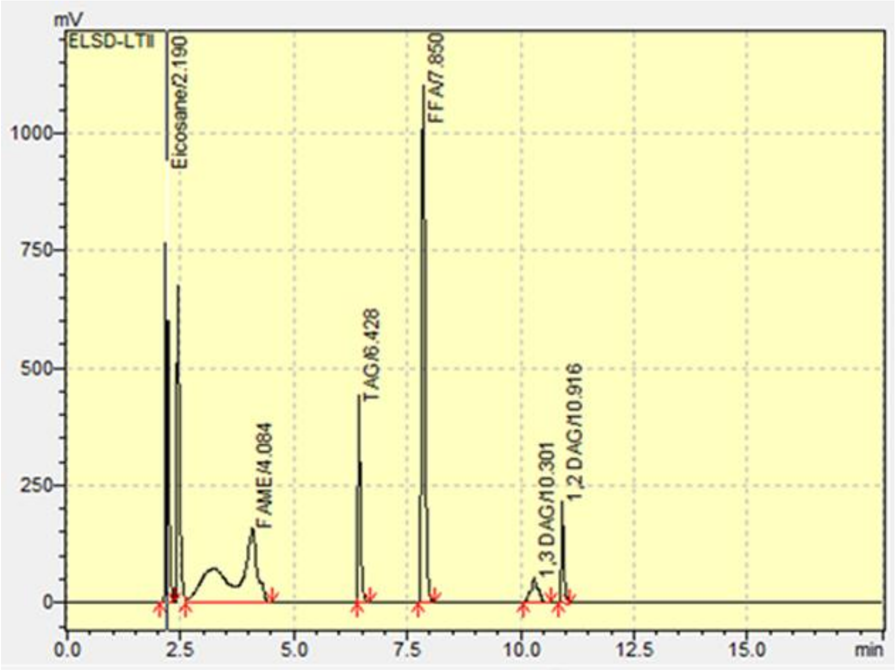
ภาพที่ จ-1 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เวลา 0 ชั่วโมง



ภาพที่ จ-2 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ จ-3 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ จ-4 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่เวลา 72 ชั่วโมง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว วรรณิศา ลีลารุจิ เกิดวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2529 ที่นครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จากคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2550 จากนั้นเข้าศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2555 ได้เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในการประชุมวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพระดับชาติ ในงาน The 16th Biological Sciences Graduate Congress “Biochemistry, Physiology and Biotechnology” (BSGC 2011) ที่ Department of Biological Sciences, National University of Sinfapore ประเทศสิงคโปร์ ระหว่างวันที่ 12-13 ธันวาคม พ.ศ. 2554 ในหัวข้อเรื่อง Lipase production from lipolytic yeast induced by *Jatropha curcas* oil และในการประชุมวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพระดับชาติ ในงาน The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care” (TSB 2012) ที่โรงแรมสุนีย์แกรนด์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี ระหว่างวันที่ 29-30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ในหัวข้อเรื่อง The optimal conditions for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil catalyzed by whole cell catalyst of *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* รวมทั้งได้ทำการเขียนบทความนำเสนอผลงานเพื่อตีพิมพ์ลงใน African Journal of Biotechnology วันที่ 25 เมษายน 2556 ในหัวข้อเรื่อง Biodiesel production from *Jatropha curcas* oil catalyzed by whole-cell catalyst of *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*