

UTILIZATION OF USED PALM OIL FOR LIPASE-BASED BIODIESEL PRODUCTION

Miss Parnuch Hongswat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Management
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

การใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเพื่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเพส



นางสาวกานูช หงษ์สวัสดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

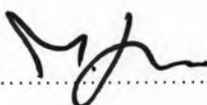
492116


Thesis Title UTILIZATION OF USED PALM OIL FOR LIPASE-BASED
BIODIESEL PRODUCTION
By Miss Parnuch Hongsawat
Field of Study Environmental Management (Inter-Department)
Thesis Advisor Assistant Professor Alisa Vangnai, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

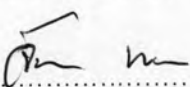

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor M.R.Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

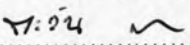
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Manaskorn Rachakornkij, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Alisa Vangnai, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)


..... Member
(Chantra Tongcumpou, Ph.D.)


..... Member
(Tawan Limpiyakorn, Ph.D.)

ภาษา หงษ์สวัสดิ์ : การใช้น้ำมันปาล์มใช้แล้วเพื่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปส (UTILIZATION OF USED PALM OIL FOR LIPASE – BASED BIODIESEL PRODUCTION)

อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. อติสารังโก, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล, 177 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการนำน้ำมันปาล์มทอดไก่ใช้แล้วกลับมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และศึกษาผลกระทบจากสารพอลิไซคลิกเอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนที่เกิดขึ้นในน้ำมันใช้แล้วต่อผลิตภัณฑ์ น้ำมันที่ผ่านการทอดไก่ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เป็นจำนวน 21 ครั้ง สีของน้ำมันจะมีสีเข้มขึ้น 56 เท่าจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ และมีความหนืดเพิ่มขึ้น 10% นอกจากนี้ในน้ำมันที่ใช้แล้วยังมีค่าองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงขึ้น 4% โดยที่จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำในน้ำมันที่ใช้แล้ว เมื่อทำการตรวจสอบจำพวกพอลิไซคลิกเอโรมาติกไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันใช้แล้ว ด้วยวิธีลิกนินโครมาโทกราฟี และวิธีแมสสเปคโตรโครมาโท- กราฟีพบว่าในน้ำมันทอดไก่ใช้แล้วครั้งที่ 21 มีแนฟทาลิน และเบนโซเอไพรีน 0.16 ppm และ 0.04 ppm ตามลำดับ เมื่อนำน้ำมันใช้แล้วมาทำไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่ามีการดูดซับแนฟทาลินบน ไลโพโซม และ โนโวไซม์เป็นปริมาณ 1.96 และ 1.93 ไมโครโมลต่อกรัมเอนไซม์ ตามลำดับ ซึ่งแนฟทาลิน และเบนโซเอไพรีน จะไปลดปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำ (hydrolytic activity) ในปฏิกิริยาที่ใช้ไลโพโซมจะมีค่าลดลง 77-80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปฏิกิริยาที่ใช้โนโวไซม์จะมีการลดลงของปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำ 54-82 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไบโอดีเซล คือ วิธีการใส่เมทานอลที่แตกต่างจะให้ผลของการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ต่างกัน โดยการใส่เมทานอลแบบครั้งเดียว, การใส่แบบสามขั้น และการใส่แบบต่อเนื่องพบว่าปริมาณการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์เมื่อใช้ไลโพโซม มีค่าเท่ากับ 20.19, 38.96 และ 39.89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่เมื่อใช้โนโวไซม์จะมีค่า 48.0, 52.0 และ 43.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการศึกษาปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องในการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ คือ ปริมาณน้ำ (0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร), ปริมาณของเอนไซม์ตรังรูปในปฏิกิริยา (5, 10, 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเอนไซม์ต่อปริมาตร), และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส) เมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยาพบว่า ปริมาณเมทานอลต่อน้ำมัน 4 ต่อ 1 โดยโมล ด้วยการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของไลโพโซมจะให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่สูงที่สุด คือ 52.1 เปอร์เซ็นต์ ในสถานะที่ใช้โนโวไซม์สถานะเหมาะสม คือ การใช้เมทานอลต่อน้ำมัน 3 ต่อ 1 โดยโมลด้วยการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องในสถานะที่ปราศจากน้ำที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ค่าการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่มีค่าสูงที่สุด คือ 40 เปอร์เซ็นต์

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....ภาษา.....หงษ์สวัสดิ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อน.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....อน.....

4889482420 : MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT (Inter-Department)

KEY WORD: WASTE UTILIZATION / USED FRYING PALM OIL / IMMOBILIZED LIPASE / BIODIESEL / PAHs

PARNUCH HONGSAWAT : UTILIZATION OF USED PALM OIL FOR LIPASE-BASED BIODIESEL PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. ALISA VANGNAI, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., 177 pp.

This study aimed to salvage used frying palm oil for lipase base-biodiesel production and to determine if polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) formed in used frying palm oil affected the production. Chicken breast was repeatedly fried at 170°C for 15 minutes for 21 cycles. The color of the used oil became 56 folds darker than that of the refined palm oil and with 10% higher viscosity. While water content remained similar, fatty acid composition was changed in that unsaturated fatty acid increased by 4% in used oil. By HPLC and GC-MS analysis, PAHs formed in used oil were detected and identified as naphthalene. The amount of naphthalene increased in each frying cycle and reached 0.16 ppm in the 21st frying cycle. When used frying palm oil was utilized for transesterification for biodiesel production catalyzed by immobilized lipase, Lipozyme RM IM and Novozym 435. PAHs accumulated in the oil exhibited adverse effect to the immobilized enzyme catalyst. It was found that naphthalene adsorbed onto Lipozyme RM IM and Novozym 435 upto 1.96 and 1.93 μ mole per gram immobilized lipase, respectively. Further investigation showed that in the presence of naphthalene and benzo[a]pyrene, hydrolytic activity of Lipozyme RM IM was decreased by 77-80%, while that of Novozym 435 was decreased by 54-82%, respectively. Besides catalytic efficiency of the enzyme, there are several factors involving biodiesel production. Different types of methanolysis clearly yielded different %FAME conversion. When one-step methanolysis, three-step methanolysis and continuous-flow methanolysis were used, %FAME conversion using Lipozyme RM IM was 20.19, 38.96, and 39.89, respectively, while it was 48.0%, 52.0%, and 43.3% when Novozym 435 was used. Water content (0, 5, 10, 15% v/v), dosage of immobilized lipase (5, 10, 20%w/v), and reaction temperature (40°C, 50°C and 60°C) affected %FAME conversion differently when the reaction was catalyzed by Lipozyme RM IM and Novozym 435. The optimum production condition using 20% (w/v) Lipozyme RM IM were as followed: 1:4 molar ratio of used frying palm oil to methanol, with continuous-flow methanolysis at 60°C without water. With 24 hour reaction time, the maximum yield of FAME conversion was 52.1%. On the other hand, the optimum production condition catalyzed by 20% (w/v). Novozym 435 were as followed: 1:3 molar ratio of used frying palm oil to methanol with continuous-flow methanolysis at 60°C without water. After 24 hour reaction time, the maximum yield of FAME conversion was 40.0%.

Field of study Environmental Management Student's signature..... *Parnuch Hongsaawat*

Academic year 2006

Advisor's signature..... *Alisa Vangnai*

Co-advisor's signature..... *Warawut Chulalaknanukul*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor Assist. Prof. Dr. Alisa Vangnai and for her kindness, suggestion and help me in every things and every time. In addition, my special thankfulness is for co-advisor Assoc. Prof. Dr. Warawut Chulalaksananukul for his kindness, invaluable guidance advice, support and take me a chance to do the new things.

I am also grateful to Dr. Manaskorn Rachakornkij, Dr. Chantra Tongcumpou and Dr. Tawan Limpiyakorn for serving as a chairman and members of thesis committee, respectively. All of whom have made valuable comments and have been helpful in the production of this work. Moreover, I would like to thank to NRC-EHWM Program for their support in this work.

I would like to express special thank to Dr. Pakorn Winayanuwattikun for his advice and help me in the laboratory. In addition, thanks are also extended to Assoc. Prof. Tikamporn Yongvanich for her advice and encourage me in every time.

I would like to extend my sincere thank to staff and friends of the Botany and Biochemistry Department, Biotechnology and NRC-EHWM Program for their help and warm relationship.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my family for unlimited love, understanding and encouragement.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xiv
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
1.1 Statement of purpose.....	1
1.2 Objectives.....	3
1.3 Scopes of the investigation.....	3
CHAPTER II: THEORY AND LITERATURE REVIEW.....	5
2.1 Used frying oil.....	5
2.1.1 Generation of used frying oil.....	5
2.1.2 Disposal and waste management of used frying oil.....	5
2.1.3 Physical and chemical property changes during frying oil.....	8
2.2 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).....	13
2.2.1 Sources of environmental PAHs contamination.....	13
2.2.2 Occurrence of PAHs in foods.....	14
2.2.3 Legal limits.....	16
2.2.4 Extraction of PAHs from oil.....	18

2.2.5 Properties of PAHs	20
2.2.6 Toxicity of PAHs	21
2.3 Utilization of used frying oil for biodiesel production	22
2.3.1 Production processes for biodiesel production	22
2.4 Transesterification	24
2.4.1 Definition of transesterification	24
2.4.2 Catalysts for homogeneous process	25
2.4.3 Enzyme kinetics	29
2.4.4 Reaction parameter for biodiesel	32
2.5 Biodiesel quality	37
CHAPTER III: EXPERIMENTAL METHOD	39
3.1 Materials	39
3.2 Chemicals	39
3.3 Equipment	42
3.4 Procedure	45
3.4.1 Preparation of frying palm oil	47
3.4.2 Determination of characteristics of palm oil	48
3.4.3 Determination of PAHs in oil	50
3.4.4 Transesterification of used frying palm oil	53
3.4.5 Enzymatic transesterification.....	54
3.4.6 Determination of biodiesel physics properties	58
CHAPTER IV: RESULTS.....	60
4.1 Properties of used frying oil	60

4.1.1 Color of refined and used frying palm oil	61
4.1.2 Viscosities of refined and used frying palm oil	62
4.1.3 Water content of refined and used frying palm oil	63
4.1.4 Fatty acid composition of used frying palm oil	63
4.2 Identification of PAHs in oil	65
4.2.1 Extraction of PAHs from oil	66
4.2.2 Type and concentration of PAHs in used frying oil	67
4.2.3 Adsorption of PAHs on immobilized lipase	69
4.2.4 Effect of PAHs on hydrolytic activities of enzyme	70
4.3 Utilization of used frying oil for enzymatic biodiesel production...	72
4.3.1 Methanolysis type of used frying oil	72
4.3.2 Effect of water content on methanolysis	76
4.3.3 Effect of immobilized lipase dosage on methanolysis.....	78
4.3.4 Effect of substrate molar ratio on methanolysis	79
4.3.5 Effect of temperature on the initial velocity in reaction ...	80
4.3.6 Stabilities of immobilized lipase	82
CHAPTER V: DISCUSSIONS.....	83
5.1 Properties of used frying oil	84
5.2 Identification of PAHs in oil	88
5.3 Utilization of used frying oil for enzymatic biodiesel production ...	92
CHAPTER VI: CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS	102
REFERENCES	104
APPENDICES	111

APPENDIX A	112
APPENDIX B	121
APPENDIX C	130
APPENDIX D.....	139
BIOGRAPHY	162

LIST OF TABLES

TABLES	PAGE
Table 2.1 Harmful compound in oil	11
Table 2.2 Average values and ranges of PAHs in different food groups.....	15
Table 2.3 Food groups most contributing to PAHs intake.....	16
Table 2.4 Maximum limits for PAHs set in EU.....	16
Table 2.5 Review of the type of methanolysis.....	33
Table 2.6 Review of dosage of immobilized lipase	35
Table 2.7 Review of the stability of immobilized lipase.....	36
Table 2.8 ASTM D6751-02 Biodiesel Specifications.....	38
Table 4.1 Water content of refined and used frying oil.....	63
Table 4.2 Percentage of naphthalene and benzo[a]pyrene recovery	66
Table 4.3 Adsorption of PAHs in the immobilized lipase	70
Table B1-1 Frying chicken condition with safety.....	121
Table B1-2 The color intensity of oil.....	122
Table B3-1 Viscosities of oil	123
Table B4-1 Retention factor of the FAME, triglyceride and sample	125
Table B4-2 Peak height and peak area of FAME: Fatty acid composition	128
Tabel B4-3 Fatty acid composition of refined palm oil and the used frying oil	129
Table C1-1 Preparation of 100 mM PAHs stock solution	131
Table C1-2 Peak area of naphthalene standard.....	133
Table C1-3 Peak area of benzo[a]pyrene standard	133
Table C2-1 Naphthalene concentration in refined and used frying oil	134
Table C3-1 The adsorption of naphthalene on the immobilized lipase	135

TABLES**PAGE**

Table C3-2 The adsorption of benzo[a]pyrene on the immobilized lipase.....	135
Table C4-1 Effect of naphthalene on hydrolytic activity of lipase	137
Table C4-2 Effect of benzo[a]pyrene on hydrolytic activity of lipase	138
Table D1-1 Preparation of 12 mM FAME stock solution	140
Table D1-2 Preparation of FAME calibration solution	141
Table D3-1 FAME production in one-step methanolysis: Lipozyme RM IM..	144
Table D3-2 FAME production in one-step methanolysis: Novozym 435	145
Table D3-3 FAME production in three-step methanolysis: Lipozyme RM IM	147
Table D3-4 FAME production in three-step methanolysis: Novozym 435	149
Table D3-5 FAME production in continuous-flow methanolysis:	
Lipozyme RM IM	150
Table D3-6 FAME production in continuous-flow methanolysis:	
Novozyme 435	152
Table D3-7 FAME production in continuous-flow methanolysis	
by 5, 10, 20, 30 and 40% Lipozyme RM IM as the catalyst.....	154
Table D3-8 FAME production in continuous-flow methanolysis	
by 5, 10, 20, 30 and 40% Novozym 435 as the catalyst.....	155
Table D3-9 Velocity and FAME production in continuous-flow	
methanolysis using 20%Lipozyme RM IM as the catalyst	
at 40°C.....	157
Table D3-10 Velocity and FAME production in continuous-flow methanolysis	
using 20%Lipozyme RM IM as the catalyst at 50°C.....	157

TABLES**PAGE**

Table D3-11 Velocity and FAME production in continuous-flow methanolysis using 20% Lipozyme RM IM as the catalyst at 60°C.....	158
Table D3-12 Velocity and FAME production in continuous-flow methanolysis using 20% Novozym 435 as the catalyst at 40°C.....	158
Table D3-13 Velocity and FAME production in continuous-flow methanolysis using 20% Novozym 435 as the catalyst at 50°C..	159
Table D3-14 Velocity and FAME production in continuous-flow methanolysis using 20% Novozym 435 as the catalyst at 60°C..	159
Table D3-15 Kinetic parameter in the reaction of Lipozyme RM IM.....	160
Table D3-16 Kinetic parameter in the reaction of Novozym 435.....	160
Table D3-17 FAME conversion and residual activity of Lipozyme RM IM....	161
Table D3-18 FAME conversion and residual activity of Novozym 435.....	161

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
Fig. 2.1 Structures of the 16 US-EPA PAHs.....	21
Fig. 2.2 Transesterification reaction of triglyceride.....	25
Fig. 2.3 Methanolysis of triglycerides.....	25
Fig. 2.4 Schematic representation of the elements of an enzyme catalyzed reaction.....	30
Fig. 2.5 Michaelis-Menten plot for enzyme-catalyze reaction.....	30
Fig. 2.6 Lineweaver-Burk plot for an enzyme-catalyzed reaction.....	32
Fig. 3.1 Overview of the experimental design	46
Fig. 3.2 One-chicken breast frying cycle	47
Fig. 3.3 Gel documentation..	48
Fig.3.4 Viscometer D2170.....	48
Fig. 3.5 Karl-Fischer titration.....	49
Fig. 3.6 Thin layer chromatography.....	54
Fig. 4.1 Color change of refined and used frying palm oil.....	61
Fig. 4.2 Viscosities change of refined and used frying palm oil.....	62
Fig. 4.3 Fatty acid composition.....	64
Fig. 4.4 Change in the fatty acid profile of used frying oil	65
Fig. 4.5 Chromatogram of PAHs analyzed by GC-MS	67
Fig. 4.6 Increase of PAHs in oil during each frying cycle.....	68
Fig. 4.7 Chromatogram of PAHs in the 21 st cycle frying oil.....	68
Fig. 4.8 Chromatogram of the adsorption of PAHs onto Lipozyme RM IM.....	69

FIGURE	PAGE
Fig. 4.9 Effect of naphthalene and benzo[a]pyrene on hydrolytic activity of immobilized lipase.....	71
Fig. 4.10 Effect of flow rate in continuous-flow methanolysis.....	74
Fig. 4.11 FAME production in each methanolysis type.....	75
Fig. 4.12 Effect of water to FAME production.....	77
Fig. 4.13 Effect of the dosage of the immobilized lipase in methanolysis.....	78
Fig. 4.14 Effect of substrate molar ratio in methanolysis.....	79
Fig. 4.15 Effect of temperature in methanolysis using Lipozyme RM IM	80
Fig. 4.16 Effect of temperature in methanolysis using Lipozyme RM IM.....	81
Fig. 4.17 The stability of immobilized lipase.....	82
Fig. B4-1 Analysis of the intermediate products by TLC.....	125
Fig. B4-2 Chromatogram of methyl ester from chemical transesterification...	127
Fig. C1-1 Chromatogram of naphthalene and benzo[a]pyrene.....	130
Fig. C1-2 Calibration curve of PAHs.....	132
Fig. C4-1 Calibration curve of <i>p</i> - nitrophenol	136
Fig. D2-1 Calibration curve of FAME.....	142
Fig. D2-2 Chromatogram of FAME standard.....	143

LIST OF ABBREVIATIONS

ASTM	The American Society for Testing and Materials
°C	Degree Celsius
cyc	Cycle Frying
cSt	Centi Stokes
DAG	Diglyceride
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
FFA	Free Fatty Acid
g	gram
GC	Gas Chromatography
l	Lite
MAG	Monoglyceride
MeOH	Methanol
M.W.	Molecular Weight
mM	milli molar
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
ppb	Parts Per Billion
ppm	Parts Per Million
RT	Retention Time
TAG	Triglyceride
μM	micro molar