

การผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแคลเซียมคาร์บอเนต
และห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต



น.ส. เนตรนภา สว่างปัญญา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4 9 7 0 3 9 8 2 2 1

ETHYL ESTER PRODUCTION USING AN IMMOBILIZED LIPASE ON CaCO_3
AND ENTRAPPED IN CALCIUM ALGINATE

Miss Netnapa Sawangpanya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University


Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522194

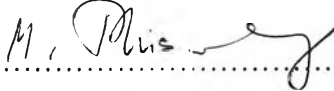
Thesis Title ETHYL ESTER PRODUCTION USING AN
IMMOBILIZED LIPASE ON CaCO₃ AND ENTRAPPED
IN CALCIUM ALGINATE.
By Miss Netnapa Sawangpanya
Field of Study Chemical Engineering
Thesis Advisor Associate Professor Muenduen Phisalaphong, Ph.D.

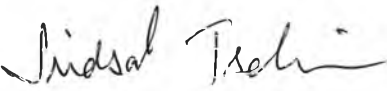
Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

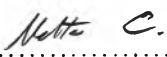
 Dean of the Faculty of Engineering
(Associate Professor Boonsom Lerdhirunwong, Dr.Ing.)

THESIS COMMITTEE

 Chairman
(Associate Professor Tharathon Mongkhonsi, Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Associate Professor Muenduen Phisalaphong, Ph.D.)

 Examiner
(Jirdsak Tscheikuna, Ph.D.)

 External Examiner
(Associate Professor Metta Chareonpanich, D.Eng.)

เนตรนภา สว่างปัญญา : การผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแคลเซียมคาร์บอเนตและห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (ETHYL ESTER PRODUCTION USING AN IMMOBILIZED LIPASE ON CaCO_3 AND ENTRAPPED IN CALCIUM ALGINATE) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ : รศ. ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์, 90 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และกรดไขมันจากปาล์มโดยมีเอนไซม์ไลเปสอิสระและตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ทำการศึกษาการตรึงไลเปส 3 วิธี ได้แก่ 1) ไลเปสตรึงรูปบนแคลเซียมคาร์บอเนต (CRLA) 2) ไลเปสตรึงรูปที่ถูกห่อหุ้มด้วยโครงข่ายแคลเซียมอัลจิเนต (CRLE) 3) ไลเปสตรึงรูปบนแคลเซียมคาร์บอเนตและห่อหุ้มด้วยโครงข่ายแคลเซียมอัลจิเนต (CRLAE) โดยกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเปสตรึงรูปจะถูกเปรียบเทียบกัไลเปสอิสระ ไลเปสตรึงรูปชนิด CRLAE เตรียมโดยใช้ไลเปสปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน สัดส่วนไลเปสต่อแคลเซียมคาร์บอเนต 1 ต่อ 2 โดยน้ำหนัก และใช้เวลาในการดูดซับ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในการทำเม็ดเจลให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 มิลลิเมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการเร่งของไลเปสคือ 50 องศาเซลเซียส โดยไลเปสตรึงรูปชนิด CRLE มีกิจกรรมการเร่งสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าไลเปสตรึงรูปชนิด CRLAE ที่มีบัฟเฟอร์มีกิจกรรมการเร่งสูงกว่าชนิดที่ไม่มีบัฟเฟอร์ประมาณ 10 เท่า สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลคืออัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลกับน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ที่ 9:1 หรือในกรณีเอทานอลกับกรดไขมันปาล์มคือ 3:1 ใช้ปริมาณไลเปส 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีผลได้เอทิลเอสเทอร์จากการใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และกรดไขมันจากปาล์ม 83 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อผสมกรดไขมันปาล์มร้อยละ 30 กับน้ำมันปาล์มร้อยละ 70 ณ ชั่วโมงที่ 24 (เวลาในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 48 ชั่วโมง) ได้ผลิตภัณฑ์เอทิลเอสเทอร์ประมาณ 81.2 - 84.1 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ไลเปสอิสระ โดยที่การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสตรึงรูปชนิด CRLE, CRLA และ CRLAE จะได้ผลิตภัณฑ์เอทิลเอสเทอร์ 74.2, 57.6 และ 42.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำในครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 3 แสดงให้เห็นถึงการลดลงของเอทิลเอสเทอร์อย่างมีนัยสำคัญ

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....

ลายมือชื่อนิสิต *นอธรรม สว่างปัญญา*

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ *Kobkei Laos*

ปีการศึกษา.....2552.....

4970398221 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD : BIODIESEL / IMMOBILIZED LIPASE / ETHYL ESTER

NETNAPA SAWANGPANYA : ETHYL ESTER PRODUCTION USING AN IMMOBILIZED LIPASE ON CaCO_3 AND ENTRAPPED IN CALCIUM ALGINATE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. MUENDUEN PHISALAPHONG, Ph.D., 90 pp.

This study investigated the biodiesel production from purified palm oil and palm fatty acids by using free and immobilized lipases as biocatalysts. Three methods of lipase immobilizations were studied: 1) adsorption of lipase onto CaCO_3 (CRLA), 2) entrapment of lipase in Ca-alginate matrix (CRLE) and 3) entrapment of CaCO_3 -lipase in Ca-alginate matrix (CRLAE). The hydrolytic activities were compared with those of the free lipase. The preparation of CRLAE was by using of 5% lipase based on oil weight, mass ratio of enzyme/ CaCO_3 at 1:2 and adsorption time of 90 min at 4°C. The condition for the bead formation was by using 1% (w/v) Na-alginate to form the bead with a diameter of 1.7 mm. The optimal temperature for lipase activity was 50°C. The immobilized enzyme in CRLE exhibited the highest activity. The immobilized lipase in CRLAE bead filled with the buffer showed approximately 10 time higher activity than that of the one without the buffer. For the biodiesel production, the optimal conditions were at the molar ratio of ethanol to purified palm oil of 9:1 or at the molar ratio of ethanol to palm fatty acid of 3:1, 5% wt (by oil) lipase, 50°C and 24 h of reaction time, with the yields of ethyl ester from purified palm oil and palm fatty acid at 83% and 16%, respectively. In addition, the substitute of palm fatty acid as a substrate in the ratio of 30% of palms fatty acid: 70% of palm oil at the addition time of 24 h (the total reaction time of 48 h) yielded approximately 81.2%-84.1% ethyl ester by the free lipase, whereas the biodiesel production by the immobilized lipase in CRLE, CRLA and CRLAE resulted in ethyl ester yields of about 74.2%, 57.6% and 42.7%, respectively. The results from the reuse of the immobilized enzymes revealed the significantly reduction of ethyl ester yield from the 1st run to the 3rd run.

Department:Chemical Engineering...

Student's signature:

Field of study:....Chemical Engineering...

Advisor's signature:

Academic year:.....2009.....

Netnapa Sawangpanya
M. Phisalaphong

ACKNOWLEDGEMENTS

The work presented in this thesis was meticulously conducted with the help and encouragements from many people who make such work possible. I would like to take this opportunity to thank the following people for their contributions to this work.

Firstly, I would like to express my earnest gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Muenduen Phisalaphong, Ph.D. for her encouragement, support, guidance, and unfailing faith all the way through my thesis work and study.

Thanks to all of my thesis committee, Assoc. Prof. Tharathon Mongkhonsi, Ph.D., Jirdsak Tscheikuna, Ph.D. and Assoc. Prof. Metta Chareonpanich, Ph.D. for their kind advices and recommendations which are invaluable for improving my work.

Special appreciation is addressed to Mr. Songchai Thamphimukwattana (Buraphamunkong Co., Ltd.) for his kind and most gratified support to this thesis work by providing the palm fatty acid. This work was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) under grant number MRG-WII 505E011 and THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

Many thanks are also addressed to Mrs. Sunee Pakprapan (Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University) for their kind assistance in commencing Gas Chromatography (GC).

Finally, I would like to express my highest gratitude to my parents for their affectionate support, blessings, inspiration, and love which guide me all the way throughout my life and study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
1.1 Motivation.....	1
1.2 Objectives.....	2
1.3 Working Scopes.....	3
1.4 Expected benefits.....	4
CHAPTER II: BACKGROUND & LITERATURE REVIEW.....	5
2.1 Biodiesel as engine fuel.....	5
2.2 The production of biodiesel.....	5
2.2.1 Direct use and blending.....	5
2.2.2 Microemulsion.....	6
2.2.3 Pyrolysis.....	6
2.2.4 Esterification.....	7
2.2.5 Transesterification.....	8
2.2.5.1 Non-Catalytic transesterification method (Supercritical Method).....	9
2.2.5.2 Catalytic transesterificatic method.....	10
<i>Alkali-catalyzed process</i>	10
<i>Acid-catalyzed process</i>	11
<i>Acid- and Alkali-catalysed (two-step transesterification)</i>	13

<i>Heterogeneous catalysts process</i>	13
<i>Enzymatic transesterification</i>	13
2.3 Variables affecting transesterification and esterification.....	15
2.3.1 Ratio of alcohol to oil or fatty acids.....	15
2.3.2 Reaction temperatures.....	16
2.3.3 Reaction time.....	16
2.3.4 Use of organic co-solvent.....	16
2.3.5 Purity of reactant.....	17
2.3.6 Catalyst type and concentration.....	17
2.3.7 Presence of water.....	17
2.4 Enzymatic Immobilization.....	18
2.5 Literature reviews.....	19
CHAPTER III: MATERIALS & METHODS.....	31
3.1 Materials and chemicals.....	31
3.2 Lipase immobilization.....	31
3.2.1 Immobilization of <i>C. rugosa</i> lipase on CaCO ₃	31
3.2.2 Entrapment of <i>C. rugosa</i> lipase immobilized on CaCO ₃ in calcium alginate bead.....	31
3.3 Enzymatic transesterification and esterification reaction.....	32
3.4 Enzyme activity assay.....	33
3.4.1 Enzyme activity assay.....	33
3.4.2 Protein assay.....	33
3.4.3 Ethyl ester analysis.....	33
CHAPTER IV: RESULTS & DISCUSSION.....	35
4.1 Prestudying of the controlled parameters of immobilized <i>Candida rugosa</i> lipase on hydrolysis activity.....	36
4.1.1 Effect of lipase quantity.....	36
4.1.2 Effect of adsorption time.....	38
4.1.3 Effect of enzyme/support ratio.....	39
4.1.4 Effect of bead diameter.....	40

4.1.5 Effect of alginate concentration.....	42
4.1.6 Effect of temperature.....	43
4.2 The study of operating condition of enzymatic ethyl ester production.....	45
4.2.1 Effect of shaking speed.....	45
4.2.2 Effect of molar ratio of ethanol to reactant.....	46
4.2.3 Effect of mass ratio of substrate mixture.....	48
4.2.4 Effect of addition time of palm fatty acid.....	50
4.2.5 Ethyl ester production by using immobilized <i>C. rugosa</i> lipase.....	51
4.2.6 Repeated use of the immobilized <i>C. rugosa</i> lipase.....	53
CHAPTER V: CONCLUSION & RECOMMENDATIONS.....	56
5.1 Conclusion.....	56
5.2 Recommendations.....	57
REFERENCES.....	58
APPENDICES.....	65
APPENDIX A Experimental data for analysis.....	66
APPENDIX B Calculation of lipase activity and percent Yield of ethyl ester.....	73
APPENDIX C The 22 nd Symposium of Malaysian Chemical Engineers (SOMChE) in conjunction with the 15 th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE) Innovations for Sustainable Conference.....	83
VITA.....	90

LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1 Comparison between alkali-catalysis and lipase-catalysis methods for biodiesel fuel production.....	14
Table 2.2 Review studies production of biodiesel by heterogeneous, acid or alkali catalyzed methods.....	22
Table 2.3 Review studies production of biodiesel by enzymatic catalyzed methods.....	25

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 The mechanism of pyrolysis of triglycerides.....	7
Figure 2.2 The esterification reaction.....	8
Figure 2.3 The transesterification reactions of triglycerides with alcohol.....	8
Figure 2.4 Three consecutive and reversible reactions. R ₁ , R ₂ , R ₃ and R' represent alkyl groups.....	9
Figure 2.5 The mechanism of alkali-catalyzed transesterification of triglycerides with alcohol.....	11
Figure 2.6 Mechanism of the acid-catalyzed transesterification of vegetable oils.....	12
Figure 2.7 The reactions catalyzed by lipase in aqueous and non-aqueous solutions.....	18
Figure 4.1 Effect of <i>C. rugosa</i> lipase quantity on hydrolysis activity, using the olive oil as the substrate, pH 7.0, 50 °C, reaction time 12 h.....	37
Figure 4.2 Effect of <i>C. rugosa</i> lipase quantity on ethyl ester yield, molar ratio of purified palm oil to ethanol 1:9, reaction temperature 50 °C and reaction time 24 h, 250 rpm.....	37
Figure 4.3 Effect of adsorption time of <i>C. rugosa</i> lipase onto calcium carbonate (CaCO ₃) on activity yield, using the olive oil as the substrate, pH 7.0, reaction time of 12 h, 50 °C.	39
Figure 4.4 Effect of enzyme/support ratio on specific activity, using the olive oil as the substrate, pH 7.0, 50 °C, reaction time 12 h.....	40
Figure 4.5 Effect of bead diameter on the hydrolytic activity of immobilized <i>C. rugosa</i> lipase by varied bead diameter at 1.7 mm, 2 mm and 4 mm. Using olive oil as the substrate, pH 7.0, 37 °C, 12 h, and 1% Na-alginate concentration.....	41

Figure 4.6 Effect of alginate concentration on the hydrolytic activity of immobilized <i>C. rugosa</i> lipase by varied Na-alginate concentration at 1%, 1.5% and 2%, using olive oil as the substrate, pH 7.0, 37 °C and 12 h, and 1.7 mm of bead diameter.....	43
Figure 4.7 Effect of temperature on the hydrolytic activity of immobilized <i>C. rugosa</i> lipase at the various temperature between 37 °C-60 °C, pH 7.0 and 12 h by using olive oil as the substrate.....	44
Figure 4.8 Effect of shaking speed on ethyl ester yield by using the free lipase (5% based on oil weight), molar ratio of purified palm oil to ethanol was 1:9, reaction temperature 50 °C, 24 h.....	46
Figure 4.9 Effect of molar ratio of ethanol to reactants on ethyl ester yield by using free lipase at 5% by wt of oil, reaction temperature 50°C and reaction time was 24 h.....	48
Figure 4.10 Effect of mass ratio of substrate mixture on ethyl ester yield by using free lipase, the mass ratio of mixed substrate was varied at 90:10, 80:20, 70:30 and 50:50; molar ratio of purified palm oil to ethanol was 1:9, molar ratio of palm fatty acid to ethanol was 1:3, 5% lipase (wt of oil), reaction temperature 50 °C, And 24 h of reaction time.....	49
Figure 4.11 Effect of addition time of palm fatty acid on ethyl ester yield by using free lipase, addition time was varied at 6 h, 12 h and 24 h , molar ratio of purified palm oil to ethanol was 1:9, 5% lipase (based on oil weight), reaction temperature of 50 °C, and total reaction time 48 h.....	51

- Figure 4.12 The ethyl ester yield by using the different techniques of immobilized lipase, molar ratio of purified palm oil to ethanol was 1:9, immobilized lipase 700 mg (5% free lipase based on oil weight), reaction temperature 50 °C, mixing time of palm fatty acid to the reaction after 24 hours and reaction time was 48 hours.....52
- Figure 4.13 The hydrolytic activity of reusability of various type of immobilized lipase on ethyl ester yield , molar ratio of purified palm oil to ethanol was 1:9, immobilized lipase 700 mg (5% free lipase based on oil weight), reaction temperature 50 °C, addition time of palm fatty acid to the reaction at 24 h and total reaction time 48 h.....54
- Figure 4.14 The reusability of various type of immobilized lipase on ethyl ester yield , molar ratio of purified palm oil to ethanol was 1:9, immobilized lipase 700 mg (5% free lipase based on oil weight), reaction temperature 50 °C, addition time of palm fatty acid to the reaction at 24 h and total reaction time 48 h.....55