# เทคโนโลยีการเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตไบโอดีเซล

# Green catalytic technologies for biodiesel production

*ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ*[1]

**บทคัดย่อ**

ไบโอดีเซลนับว่าเป็นพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ วัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตไบโอดีเซลได้แก่ น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็กและผลิตภัณฑ์จากของเสีย โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลในภาคอุตสาหกรรมนิยมใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามพบว่าการเร่งปฏิกิริยาด้วยกระบวนการทางชีวภาพกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ ใช้พลังงานน้อยกว่า สามารถใช้กับวัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์สูง สามารถลดค่าใช้จ่ายของกระบวนการหลังการผลิต เพราะสามารถแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกง่าย อีกทั้งยังไม่มีค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย แม้ว่าจะมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในการใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน กลับพบว่าราคาของเอนไซม์ยังคงเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการที่จะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม จะเห็นได้ว่าความเข้าใจเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์มีความจำเป็นต่อกระบวนการผลิตไบโอดีเซลแบบยั่งยืน ทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม บทความนี้ได้สรุปเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน รวมถึงปัจจัยต่างๆ เช่น วัตถุดิบ ชนิดของตัวรับหมู่เอซิล อัตราส่วนโดยโมลของสารตั้งต้น ปริมาณน้ำที่ใช้ อุณหภูมิของปฏิกิริยาและรูปแบบการทำงาน ซึ่งมีผลสำคัญต่อความเป็นไปได้ในการนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อการผลิตไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์

**คำสำคัญ** :ไบโอดีเซล ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ไลเปส น้ำมันพืช

---

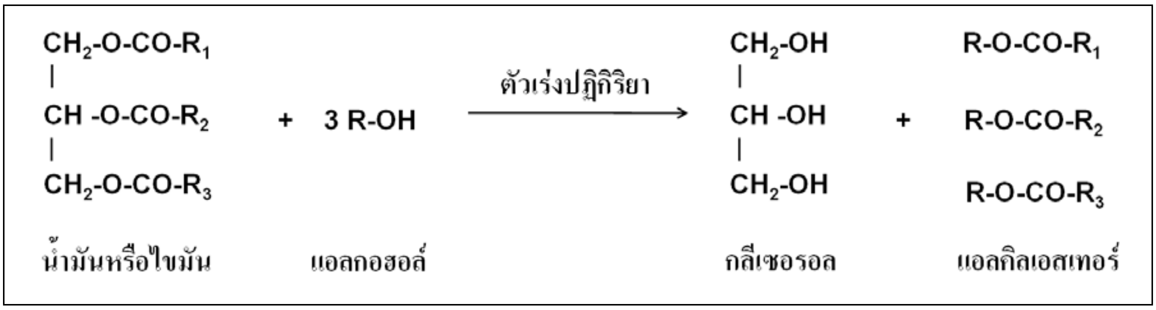
[1] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10310 ประเทศไทย โทรศัพท์ 02-218-5431

**บทนำ**

ปัจจุบันนี้ปริมาณของน้ำมันเชื้อเพลิงที่ลดลงและความตระหนักถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมได้นำมาสู่การค้นหาแหล่งพลังงานทางเลือกอื่นๆ เช่น พลังงานจากแสงอาทิตย์ ลมและน้ำ มีการพยายามค้นคว้าพัฒนาเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติและประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเชื้อเพลิงปิโตรเลียม ทั้งนี้พบว่าไบโอดีเซลมีคุณสมบัติที่สามารถใช้ทดแทนเชื้อเพลิงปิโตรเลียมได้ เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ประกอบกับไม่เป็นพิษ และสามารถย่อยสลายได้จึงเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม [1]

ในช่วงต้นคริสต์ศตวรรษที่ 19 รูดอล์ฟ ดีเซล ได้เสนอให้มีการนำเอาน้ำมันพืชมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ของรถยนต์ อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้น้ำมันพืชโดยตรงส่งผลเสียต่อเครื่องยนต์ดีเซลในระยะยาว เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูง ทำให้เกิดยางเหนียวที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนและการสะสมของคาร์บอน ดังนั้นจึงนำน้ำมันพืชมาผสมกับน้ำมันดีเซลปกติในสัดส่วนที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ อย่างไรก็ตามน้ำมันผสมเหล่านี้จะคงตัวอยู่ได้เฉพาะการใช้งานในระยะสั้นเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องนำน้ำมันพืชมาผ่านกระบวนการซึ่งทำให้มีคุณสมบัติคล้ายกับเชื้อเพลิงฟอสซิลก่อนจะนำไปใช้ เทคนิคหลักที่นำมาใช้ได้แก่ ไพโรไลซิส (pyrolysis) ไมโครอิมัลซิฟิเคชัน (microemulsification) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) [2] ไพโรไลซิส เป็นปฏิกิริยาการแตกด้วยความร้อนในที่อับอากาศ สามารถทำได้โดยให้ความร้อนแก่น้ำมันจนกระทั่งเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ได้สารประกอบที่มีความซับซ้อนน้อยลง จึงช่วยลดความหนืดและเพิ่มค่าซีเทนของน้ำมัน อย่างไรก็ตามข้อเสียคือกระบวนการนี้ใช้พลังงานสูงมาก ไมโครอิมัลซิฟิเคชัน เป็นกระบวนการที่นำเอาน้ำมันดีเซล น้ำมันพืช แอลกอฮอล์ สารลดแรงตึงผิว และ สารเพิ่มค่าซีเทนมาผสมกันในสัดส่วนที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยลดความหนืด เพิ่มค่าซีเทนและทำให้น้ำมันผสมที่ได้มีลักษณะการฉีดพ่นที่ดี อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ไปเป็นระยะเวลานานน้ำมันที่ผ่านกระบวนการนี้จะทำให้เครื่องยนต์มีปัญหา เช่น เข็มฉีดจ่ายน้ำมันอุดตัน มีการสะสมของคาร์บอน และเกิดการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ ในปัจจุบันกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนิยมนำมาใช้กับน้ำมันพืชเพื่อผลิตไบโอดีเซล กระบวนการนี้เกิดจากปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) ของไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ได้สารผสมของโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (mono-alkyl ester) และกลีเซอรอล (glycerol) สารผสมที่ได้นี้ก็คือไบโอดีเซลที่สามารถนำไปใช้แทนเชื้อเพลิงฟอสซิลได้

เนื่องจากคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไบโอดีเซลนั้นคล้ายคลึงกับปิโตรเลียมดีเซล จึงสามารถนำเอาไบโอดีเซลหรือไบโอดีเซลที่ผสมกับน้ำมันดีเซลปกติมาใช้กับเครื่องยนต์ได้โดยไม่จำเป็นต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์ ไม่ว่าจะเป็นระบบเผาไหม้เชื้อเพลิงหรือหัวฉีดจ่ายน้ำมัน [3] ยิ่งไปกว่านั้นไบโอดีเซลยังมีจุดวาบไฟที่ค่อนข้างสูง น้ำมันชนิดนี้จึงไม่สร้างไอระเหยที่ทำให้เกิดการระเบิด ทำให้การขนส่งและการเก็บรักษาไบโอดีเซลปลอดภัยมากกว่าดีเซลทั่วไป [4] ไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารที่ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่เรียกว่ากรดไขมัน ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทิลและเอทิลแอลกอฮอล์เมื่อมีตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นไตรเอซิลกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนไปตามลำดับเป็น ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล และสุดท้ายจะได้กลีเซอรอล ดังแสดงใน **ภาพที่ 1** ซึ่งสามารถเร่งได้โดยใช้ด่าง กรด ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพหรือแอลกอฮอล์ที่อยู่ในภาวะวิกฤติยิ่งยวด (supercritical state) [5]




ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันและแอลกอฮอล์

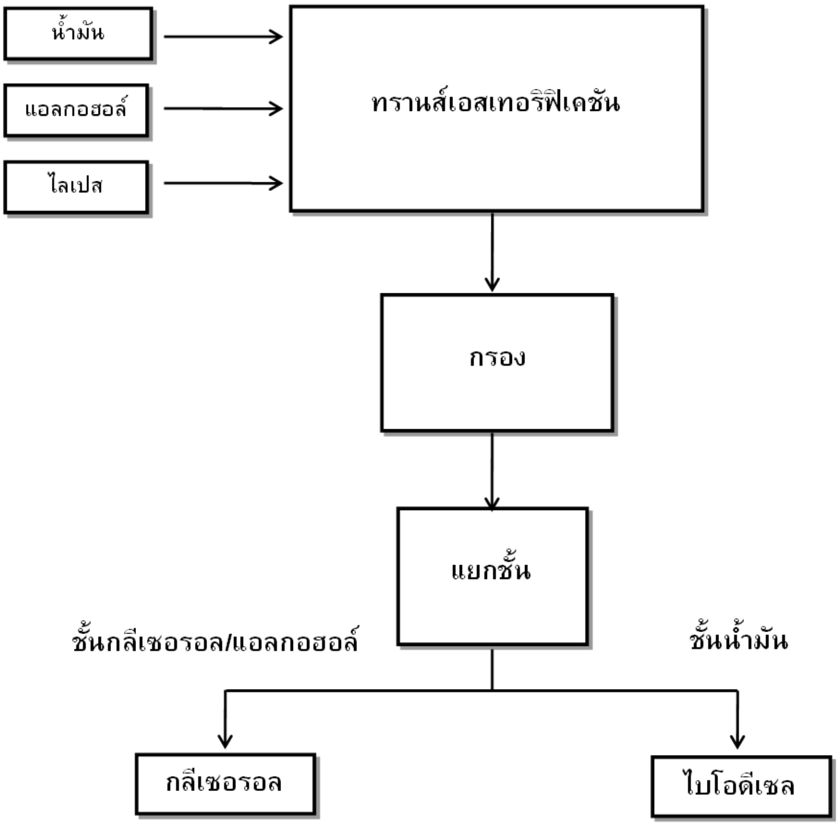
ในเชิงพาณิชย์นั้น นิยมใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ [6,7] กระบวนการนี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างน้อยเนื่องจากปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้ที่ความดันบรรยากาศและใช้อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส อัตราการเกิดและประสิทธิภาพของปฏิกิริยานั้นค่อนข้างสูงเมื่อมีแอลกอฮอล์อยู่มากเกินพอ อย่างไรก็ตามหากกระบวนการนี้มีปริมาณของกรดไขมันอิสระอยู่เป็นจำนวนมาก หรือมีน้ำซึ่งปะปนมากับตัวเร่งปฏิกิริยาหรือแอลกอฮอล์ จะทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสบู่ ส่งผลให้กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ยุ่งยากขึ้น [8] ยิ่งไปกว่านั้นยังมีปัญหาที่อาจเกิดขึ้นตามมา เช่น การแยกตัวเร่งปฏิกิริยาและเมทานอลที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกจากไบโอดีเซล การกำจัดตัวเร่งปฏิกิริยานั้นต้องมีหลายขั้นตอนมาเกี่ยวข้อง และไบโอดีเซลที่ได้ต้องผ่านการล้างซ้ำหลายรอบเพื่อให้ได้เชื้อเพลิงที่บริสุทธิ์ตามต้องการ ซึ่งเพิ่มค่าใช้จ่ายให้กับผลิตภัณฑ์สุดท้าย [9]

งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อใช้ผลิตไบโอดีเซลนั้นมีเพิ่มขึ้นอย่างแพร่หลาย เนื่องจากไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูง ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีได้ อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาของกระบวนการหลังการผลิตที่ซับซ้อน การเปรียบเทียบการใช้ไลเปสซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพแทนที่ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีทั่วๆไป เช่น กรดและด่างในการผลิตไบโอดีเซล ได้สรุปไว้ใน **ตารางที่ 1** โดยทั่วไปไลเปสสามารถทำงานได้ในสภาวะปกติจึงใช้พลังงานน้อยในการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับวัตถุดิบน้ำมันที่มีคุณภาพแตกต่างกันรวมไปถึงน้ำมันคุณภาพต่ำหรือน้ำมันเหลือใช้จากการปรุงอาหารซึ่งมีความเป็นกรดค่อนข้างสูง เนื่องจากไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งไตรเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายที่สูงของเอนไซม์ยังถือเป็นอุปสรรคสำคัญในการประยุกต์นำไลเปสมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นการหมุนเวียนเอาเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่โดยตรึงเอนไซม์ไว้บนวัสดุที่เป็นของแข็งจึงเป็นทางออกหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้การใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยายังช่วยลดกระบวนการหลังการผลิตในขั้นตอนการแยกตัวเร่งปฏิกิริยาดังแสดงไว้ใน **ภาพที่ 2** เอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้สามารถแยกออกมาจากส่วนผสมอื่นๆของปฏิกิริยาได้ง่ายโดยการกรอง นอกจากนี้การเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพไม่มีการใช้กรดหรือเบสในปฏิกิริยาจึงไม่ทำให้เกิดน้ำเสียจากการผลิต ทำให้กระบวนการผลิตไบโอดีเซลแบบนี้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าวิธีแบบดั้งเดิม ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส ความจำเพาะต่อส่วนที่เป็นกรดไขมันในน้ำมัน และความเสถียรของเอนไซม์เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ [10,11,12]

แม้ว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนั้นดูจะเป็นทางเลือกที่น่าสนใจแต่เทคโนโลยีนี้ยังไม่สามารถนำมาใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีข้อเสียที่สำคัญ คือ เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ในอัตราที่ค่อนข้างช้า เอนไซม์มีราคาค่อนข้างสูง กอปรกับเมทานอลและกลีเซอรอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงผลดีต่อสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติแล้วค่าใช้จ่ายเหล่านี้ก็ถือว่าคุ้มค่า

**ตารางที่ 1** การเปรียบเทียบการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ

| ประเด็นสำคัญ | ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นด่าง | ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด | ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ |
|---|---|---|---|
| กรดไขมันในวัตถุดิบ | ปฏิกิริยาการเกิดสบู่ | ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน หรือ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน | ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน |
| น้ำในวัตถุดิบ | เกิดสบู่มากขึ้น | ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา | ไม่มีผลกระทบ |
| ผลผลิตไบโอดีเซล | สูง โดยปกติมากกว่า 96% | สูง โดยปกติมากกว่า 96% | ธรรมดา โดยปกติมากกว่า 90% |
| การแยกผลิตภัณฑ์กลีเซอรอล | ซับซ้อน คุณภาพต่ำ | ซับซ้อน คุณภาพต่ำ | ง่าย คุณภาพสูง |
| การแยกและการนำตัวเร่งปฏิกิริยากลับมาใช้ใหม่ | ยุ่งยาก ไม่คุ้มทุน | ยุ่งยาก ไม่คุ้มทุน | ง่าย สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ |
| การใช้พลังงานและอุณหภูมิในปฏิกิริยา | ปกติ อยู่ในช่วง 50-60 °C | ค่อนข้างสูง อยู่ในช่วง 80-90 °C | ต่ำ อยู่ในช่วง 30-50 °C |
| ราคาของตัวเร่งปฏิกิริยา | ถูก | ถูก | สูง |
| กระบวนการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ | ยุ่งยาก กระบวนการหลังการผลิตซับซ้อน | ยุ่งยาก กระบวนการหลังการผลิตซับซ้อน | ง่าย ไม่มีกระบวนการหลังการผลิต |
| ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม | ต้องการกระบวนการบำบัดน้ำเสีย | ต้องการกระบวนการบำบัดน้ำเสีย มีฤทธิ์กัดกร่อน | ไม่ต้องการกระบวนการบำบัดน้ำเสีย |




ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

**การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์-ความเป็นไปได้และความท้าทายทางเทคนิค**

เมื่อคำนึงถึงความอยู่รอดทางเศรษฐกิจ ปัจจัยต่าง ๆที่สำคัญต่อกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ ได้แก่ วัตถุดิบที่เหมาะสม การผลิตเอนไซม์ การตรึงเอนไซม์ ภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิต เช่น อัตราส่วนโดยโมลของสารตั้งต้น ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ และ เวลาในการทำปฏิกิริยา รวมไปถึงการพัฒนาระบบการใช้ซ้ำของตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพล้วนต้องได้รับการพัฒนา ดังนั้นในบทความนี้จะเน้นเรื่องความเป็นไปได้ทั้งหมดและความท้าทายด้านเทคนิคเกี่ยวกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล

**ไลเปส: ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ**

ไลเปส (Lipase, Triacylglycerol hydrolase, EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่พบแพร่หลายในสิ่งมีชีวิตทั้งจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ โดยไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เหมาะแก่การนำไปใช้งานเชิงพาณิชย์เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก สามารถเลือกเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการได้ง่ายเช่น ความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้ไลเปสจากจุลินทรีย์จึงถูกใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งใช้ในการสังเคราะห์ไบโอดีเซล [13,14,15,16] อย่างไรก็ตามพบว่ามีไลเปสจากจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น *Burkholderia cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Mucor miehei* และ *Thermomyces lanuginose* [17,18,19]

การใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณมาก และสามารถออกแบบเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดีขึ้นในแง่ของการทนอุณหภูมิ ทนต่อแอลกอฮอล์ นอกจากนี้การตรึงเอนไซม์เป็นเทคนิคที่ทำให้

เอนไซม์มีความคงทนและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ทำให้สามารถลดต้นทุนการใช้เอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมได้ ซึ่งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์และความสามารถที่จะนำกลับมาใช้ใหม่ได้นั้นมีความสำคัญต่อการผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ในเชิงพาณิชย์

## การตรึงเอนไซม์ไลเปส

การตรึงเอนไซม์นับว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ในด้านต่างๆ เช่น เสถียรภาพ ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาและความจำเพาะต่อสารตั้งต้น [20] การที่เอนไซม์ถูกตรึงไว้นั้นมีผลดี คือ เอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้จะเปลี่ยนสารตั้งต้นได้ตามตำแหน่งและเวลาที่ต้องการ นอกจากนี้การตรึงยังช่วยให้สามารถแยกเอนไซม์ออกมาได้ง่าย จึงช่วยลดความซับซ้อนในการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์และการควบคุมปฏิกิริยา ทำให้ช่วยลดขั้นตอนในกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังช่วยให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาหมุนเวียนใช้ใหม่ได้ ทำให้กระบวนการดำเนินไปได้อย่างต่อเนื่อง สิ่งเหล่านี้ช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตลงซึ่งส่งผลดีในเชิงเศรษฐกิจ [21,22] แม้ว่าเทคนิคเฉพาะที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์นั้นอาจมีมากกว่า 100 แบบ แต่โดยรวมแล้วเทคนิคเหล่านี้สามารถแบ่งออกตามกลไกที่ใช้ทั่วๆ ไปได้เป็น 4 วิธี ได้แก่ วิธีดูดซับทางกายภาพ (adsorption) วิธีเชื่อมขวาง (cross-linking) วิธีห่อหุ้ม (entrapment) และ วิธีห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก (encapsulation) แต่ละเทคนิคเหล่านี้มีความซับซ้อนแตกต่างกัน และประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ก็แตกต่างกันด้วย การที่จะเลือกใช้เทคนิคใดขึ้นอยู่กับความจำเพาะของปฏิกิริยารวมไปถึงข้อจำกัดด้านค่าใช้จ่ายและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ภายหลังจากกระบวนการตรึง เทคนิคการตรึงเอนไซม์แบบต่างๆที่นำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อการผลิตไบโอดีเซลได้รวบรวมและแสดงไว้ใน **ตารางที่ 2** นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกเซลล์มาตรึงและใช้ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้

## วัตถุดิบ: น้ำมันพืชชนิดที่ใช้บริโภคและไม่ใช้บริโภค

น้ำมันพืชทั้งแบบที่ใช้บริโภคและไม่ใช้บริโภคจัดเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมีการหมุนเวียนในธรรมชาติ ประกอบกับสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม [23] อย่างไรก็ตาม พบว่ามากกว่าร้อยละ 95 ของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลนั้นเป็นน้ำมันพืชที่ใช้บริโภคซึ่งก่อให้เกิดปัญหาบางประการ เช่น เกิดการแข่งขันกับตลาดน้ำมันพืชที่ใช้บริโภคส่งผลให้น้ำมันและไบโอดีเซลมีราคาสูงขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น พบว่าในบางประเทศกลับทำให้เกิดปัญหาการตัดไม้ทำลายป่าเพื่อการเพาะปลูก ดังนั้นนักวิจัยจึงหันมาสนใจน้ำมันพืชที่ไม่ใช้บริโภคและน้ำมันที่ผ่านการปรุงอาหารแล้ว แม้ว่าโดยส่วนใหญ่แล้วน้ำมันเหล่านี้จะประกอบด้วยกรดไขมันอิสระจำนวนมาก แต่ขั้นตอนที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยตัวเร่งทางชีวภาพยังคงเหมือนเดิม ซึ่งเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้น้ำมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบนั้นไม่จำเป็นต้องสะอาดอย่างสมบูรณ์ จากการที่ราคาของน้ำมันวัตถุดิบคิดเป็นร้อยละ 70 ของต้นทุนการผลิต ดังนั้นน้ำมันพืชที่เหมาะจะนำมาทำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลเพื่อทดแทนน้ำมันดีเซลนั้น ควรเป็นพืชที่ให้ผลผลิตสูง ราคาถูกและมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาผลิตไบโอดีเซล [24,25]

**ตารางที่ 2** การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยเทคนิคต่างๆ [18,31-35,40-41]

| เทคนิคการตรึงรูป | ตัวค้ำจุน | ไลเปส | น้ำมัน | ตัวรับหมู่เอซิล | ตัวทำละลาย | อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อตัวรับหมู่เอซิล | อุณหภูมิ ($^{o}C$) | เวลา (ชม.) | ผลิตภัณฑ์ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| วิธีดูดซับทางกายภาพ | Celite | *B.cepacia* | สบู่ดำ | เอทานอล | - | 1:4 | 50 | 12 | 98 |
| | Polypropylene EP100 | *P.fluorescens* | ดอกทานตะวัน | เมทานอล | เฮกเซน | 1:4.5 | 40 | 48 | 91 |
| | Silica gel | *C.antarctica* | ถั่วเหลือง | เมทานอล | บิวทานอล | 1:3.9 | 40 | 25 | 94 |
| | Textile membrane | *C.rugosa* sp.99-125 | น้ำมันสลัด | เมทานอล | เฮกเซน | 1:3 | 40 | 30 | 96 |
| | Celite-545 | *C.viscosum* | สบู่ดำ | เอทานอล | - | 1:4 | 40 | 10 | 92 |
| | Anion resin | *P.pancreatic* | ดอกทานตะวัน | เอทานอล | - | 1:3 | 45 | 7 | 80 |
| | Hydrotalcite | *T.lanuginosus* | น้ำมันปรุงอาหาร | เมทานอล | - | 1:4 | 45 | 10 | 92.8 |
| วิธีเชื่อมขวาง | - | *B.cepacia* | มะซาง | เอทานอล | - | 1:4 | 40 | 2.5 | 92 |
| วิธีห่อหุ้ม | Phyllosilicate sol-gel | *B.cepacia* | ไขมันสัตว์ | เอทานอล | - | 1:4 | 50 | 20 | 94 |
| วิธีห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก | K-carrageenan | *B.cepacia* | ปาล์ม | เมทานอล | - | 1:7 | 30 | 72 | 99 |
| | Silica aerogel | *B.cepacia* | ดอกทานตะวัน | เมทานอล | ออกเทน | 1:3 | NA | 30 | 64 |

**ตารางที่ 3** คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไบโอดีเซลที่ผลิตจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ [37-39]

| น้ำมัน | องค์ประกอบของกรดไขมัน (%) | ซีเทน | ไอโอดีน | ความหนืด (cst, at 40 °C) | ความหนาแน่น ($g \cdot cm^{3}$) | ค่าความร้อน (MJ/kg) | จุดวาบไฟ(°C) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ถั่วเหลือง | 16:0(10) 18:0(3) 18:1(24) 18:2(57) 18:3(5) | 42.2 | 138.7 | 4.1 | 0.91 | 40 | 69 |
| ปาล์ม | 16:0(39) 18:0(3) 18:1(45) 18:2(10) | 59.1 | 60.1 | 4,4 | 0.92 | 34 | 182 |
| เรพซีด | 16.0(4) 18:1(64) 18:2(22) | - | - | 4.3-5.8 | 0.88 | 45 | 170 |
| ดอกทานตะวัน | 16:0(7) 18:0(3) 18:1(22) 18:2(66) | 41.4 | 142.7 | 4.9 | 0.92 | 45 | - |
| คาโนล่า | 16:0(5) 18:1(66) 18:2(21) 18:3(5) | 53.0 | 103.8 | 3.5 | 0.91 | 45 | - |
| สบู่ดำ | 16:0(15) 18:0(4) 18:1(41) 18:2(39) | 48.9 | 108.4 | 4.8 | 0.92 | 60 | 135 |
| เมล็ดยาง | 16:0(10) 18:0(5) 18:1(22) 18.2(46) 18:3(16) | 40.3 | 146.9 | 3.2 | 0.87 | 37 | 130 |
| ละหุ่ง | 16:0(11) 18:0(10) 18:1(30) 18:2(41) 18:3(3) 20:0(4) | 48.3 | 111.9 | 3.5 | 0.96 | 40 | 260 |
| มะเดื่ออินเดีย | 16:0(4-8) 18:0(2-9) 18:1(54) 18:2(16) | - | - | 4.8 | 0.88 | 42 | 150 |
| สาหร่าย | 17:0(13) 18:0(1) 19:0(3) 19:1(61) 19:2(17) | - | - | 5.2 | 0.86 | 41 | 115 |
| น้ำมันดีเซล | - | 51 | - | 2.8 | 0.85 | 42 | 68 |

นอกเหนือจากราคาของวัตถุดิบแล้ว คุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ได้จากวัตถุดิบที่แตกต่างกันจัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องนำมาประกอบการพิจารณาในการเลือกวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ เช่น ค่าซีเทน ค่าไอโอดีน ความหนืด ค่าความร้อน ความหนาแน่น จุดวาบไฟ (Flash point) และจุดหมอก หรือจุดน้ำมันเป็นฝ้า (Cloud point) คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่สำคัญบางประการของไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันวัตถุดิบชนิดต่างๆ เมื่อเทียบกับปิโตรเลียมดีเซลแสดงไว้ใน **ตารางที่ 3** ตัวอย่าง เช่น ค่าซีเทน เป็นค่าที่ส่งผลสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาภายในเครื่องยนต์ ค่าไอโอดีน คือ ระดับความไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นค่าที่จำกัดการแข็งตัวของไบโอดีเซล ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สูงขึ้นจะลดค่าความหนืดลง รวมทั้งจุดหมอก และจุดไหลเท (Pour Point) เพิ่มขึ้น ซึ่งเหมาะแก่การใช้ไบโอดีเซลในสภาวะอากาศที่หนาวเย็น อย่างไรก็ตาม การมีระดับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สูงเกินไปจะส่งผลเสียต่อไบโอดีเซลในแง่ของการเก็บรักษา เนื่องจากกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศแล้วเปลี่ยนเป็นเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะสามารถเชื่อมต่อกับกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวอีกโมเลกุลหนึ่ง เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารพอลิเมอร์ซึ่งคล้ายพลาสติกทำให้เกิดเป็นยางเหนียวขึ้นภายในเครื่องยนต์

ปัจจุบันนี้มีน้ำมันพืชหลายชนิดที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตไบโอดีเซลที่มีเสถียรภาพสูงและมีคุณลักษณะที่ดีของเชื้อเพลิง ไม่ว่ากรณีใดตามกฎหมายที่มีอยู่ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา ไบโอดีเซลจะต้องได้มาตรฐานที่กำหนดไว้ ได้แก่ ไบโอดีเซลมาตรฐาน ASTM D6751 ในสหรัฐอเมริกาและมาตรฐาน 14214 ในสหภาพยุโรป

**ตัวรับหมู่เอซิล**

สารหลายชนิดสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิลในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป คือ แอลกอฮอล์สายสั้น ได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอลและบิวทานอล เมื่อเทียบกับแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆ เมทานอลและเอทานอลมีราคาถูกที่สุดและสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ดังนั้นจึงเป็นสารหลักที่ใช้เป็นตัวรับหมู่เอซิลในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างเมทานอลและเอทานอลพบว่าเมทานอลมีราคาถูกกว่าและสามารถทำปฏิกิริยากับไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ว่องไวกว่าเอทานอล อย่างไรก็ตาม เมทานอลและเมทอกไซด์เป็นสารที่อันตรายมาก ต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเนื่องจากเป็นสารที่มีจุดเดือดต่ำจึงเสี่ยงต่อการระเบิด นอกจากนี้เมทานอลส่วนใหญ่ผลิตมาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งไม่สามารถหมุนเวียนได้ ในทางตรงกันข้ามเอทานอลเป็นสารที่เป็นพิษน้อยกว่าและสามารถหมุนเวียนได้เพราะสามารถผลิตขึ้นจากกระบวนการหมักของสารที่สามารถหมุนเวียนได้ เอทานอลดิบที่ได้จากวัสดุลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีน้ำปนอยู่บางส่วนสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาน้ำจะต้องถูกแยกออกไปก่อน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นเชื้อเพลิงระหว่าง เอทิลเอสเทอร์ (FAEEs) ซึ่งใช้เอทานอลเป็นสารตั้งต้นนั้น จะมีค่าการระเหย มีจุดหมอกและจุดไหลเทต่ำกว่าเมทิลเอสเทอร์ (FAMEs) ซึ่งใช้เมทานอลเป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามสาร 2 ชนิดนี้ทำให้โปรตีนเสียสภาพซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จะเห็นได้ว่าผลผลิตโดยรวมของปฏิกิริยานี้จะขึ้นอยู่กับ ความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาและอัตราการเสียสภาพของเอนไซม์ โดยปริมาตรแอลกอฮอล์สูงสุดที่สามารถเติมลงไปในปฏิกิริยาได้ในแต่ละครั้งนั้นขึ้นอยู่กับความต้านทานของเอนไซม์ชนิดนั้นๆต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ การเติมเมทานอลทั้งหมดในครั้งเดียวจะเร่งการเสียสภาพของเอนไซม์เร็วขึ้น มีรายงานว่าระดับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แปรผกผันกับจำนวนอะตอมของคาร์บอนสายยาวในแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา [17,26] จากผลการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไขมันสัตว์โดยใช้แอลิฟาติกแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 1-4 อะตอมเป็นตัวรับหมู่เอซิล เร่งปฏิกิริยาด้วยไลเปสตรึงรูปจาก *Mucor miehei* IM60 พบว่าผลผลิตของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นตามจำนวนของคาร์บอนอะตอมในแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา นอกจากนี้ตัวรับหมู่เอซิลที่ใช้ยังมีผลต่อจำนวนครั้งในการนำเอาเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่อีกด้วย จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ 2-โพรพานอลเป็นตัวรับหมู่เอซิลจะสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 12 ครั้ง ในขณะที่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้เพียง 7 ครั้งเท่านั้น

เมื่อใช้เมทานอล [27] ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโครงสร้างและความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยามีผลกระทบต่อเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์

**สัดส่วนโดยโมลของสารตั้งต้น**

ตามหลักปริมาณสารสัมพันธ์แล้วต้องมีแอลกอฮอล์อย่างน้อย 3 โมลเมื่อเทียบกับน้ำมัน 1 โมลปฏิกิริยาจึงจะเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ตัวรับหมู่เอซิลที่มากกว่ากรดไขมันในไตรเอซิลกลีเซอรอลจะทำหน้าที่เพิ่มอัตราเร็วและผลผลิตของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน แต่การเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่อไปหลังจากที่ปฏิกิริยาดำเนินไปถึงจุดสูงสุดแล้วจะทำให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลดลงเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ไลเปสซึ่งมีผลมาจากแอลกอฮอล์ส่วนเกินที่ไม่ละลายในปฏิกิริยา เมื่อสัดส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันมากกว่า 1.5:1 เอนไซม์จะถูกยับยั้ง และไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ [28,29] ดังนั้นการปรับปรุงเอนไซม์ไลเปสให้มีความทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มแอลกอฮอล์สายสั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งสามารถทำได้โดยการค้นหาไลเปสชนิดใหม่ที่มีเสถียรภาพสูงประกอบกับการใช้เทคนิคทางวิศวกรรมโปรตีนตัวอย่างเช่น ไลเปสที่มาจาก *Burkholderia cepacia* มีความสามารถทนแอลกอฮอล์สูง เอนไซม์สามารถรักษาระดับการทำงานไว้ได้ถึงร้อยละ 98.3 เมื่อบ่มไว้ในสภาวะที่เมทานอลอยู่ร้อยละ 50 นาน 48 ชั่วโมง อีกทั้งยังสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการเปลี่ยนน้ำมันถั่วเหลืองไปเป็นไบโอดีเซลได้ถึงร้อยละ 87.8

ในทางกลับกันแทนที่จะปรับปรุงเอนไซม์ให้ทนทานต่อตัวทำละลาย การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงในปฏิกิริยาเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยทำให้สารตั้งต้นละลายได้ดีขึ้นทั้งน้ำมันที่ไม่ละลายในน้ำและแอลกอฮอล์ที่ละลายในน้ำ ทั้งนี้ค่า log P (ความมีขั้วของตัวทำละลาย) ของตัวทำละลายอินทรีย์จะเป็นตัวกำหนดว่าตัวทำละลายจะมีผลอย่างไรต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมจะช่วยให้สารตั้งต้นละลายได้ดีขึ้นและยังคงระดับการทำงานของเอนไซม์ไว้ ในบรรดาตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เพื่อการสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น พบว่ามักเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ เช่น เฮกเซน เฮปเทน ไอโซออกเทน หรือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ (มีค่า log P อยู่ระหว่าง 3.5 และ 4.7) [30,31] อย่างไรก็ตามการเติมตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อเสียจากการเพิ่มค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต เพราะต้องเพิ่มขั้นตอนเกี่ยวกับการกลั่นตัวทำละลายและการปรับความดันในกระบวนการผลิต นอกจากนี้การที่ตัวทำละลายส่วนใหญ่ระเหยง่าย ติดไฟและมีความเป็นพิษนั้นส่งผลกระทบต่อการขยายขนาดการผลิตไบโอดีเซล

การเติมแอลกอฮอล์แบบเป็นขั้น (stepwise addition) สามารถลดปัญหาการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ไลเปส ตัวอย่างของการเติมแอลกอฮอล์แบบเป็นขั้นเช่น การเติมแอลกอฮอล์ 3 ขั้นตอน (three-step process) โดยเติมเมทานอลลงไปในปฏิกิริยาหลังจากที่เมทานอลถูกใช้ไปในการสร้างเอสเทอร์แล้วมากกว่าร้อยละ 95 วิธีนี้ทำให้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antarctica* สามารถเปลี่ยนน้ำมันไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 98 ซึ่งพบว่าการเติมเมทานอลแบบเป็นขั้นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆด้วย เช่น *Candida* sp.99-125, *Psuedomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae* ฯลฯ ดังนั้นในปัจจุบันนี้การเติมเมทานอลแบบเป็นขั้นจึงเป็นทางเลือกอันดับแรกในการที่จะเพิ่มผลผลิตของปฏิกิริยา

**ปริมาณน้ำ**

คุณสมบัติที่โดดเด่นอย่างหนึ่งของไลเปสคือ เป็นเอนไซม์ที่ทำงานตรงบริเวณรอยเชื่อมระหว่างชั้นของน้ำกับสารอินทรีย์ น้ำมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ให้มีการปรับเปลี่ยนรูปร่างของบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ แม้ว่าน้ำจะไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกริยาการผลิตไบโอดีเซลของเอนไซม์ไลเปสโดยตรง แต่การควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยานั้นยังคงมีความสำคัญ เนื่องจากไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในตัวกลางที่เป็นน้ำ ดังนั้นหากมีน้ำในปริมาณมากเกินไป สมดุลของปฏิกิริยาจะดำเนินไปในทางที่เกิดไฮโดรไลซิส อีกทั้งน้ำยังสามารถจำกัดการแพร่ของสารตั้งต้นทำให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลดลงได้ [32] จะ

เห็นได้ว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการที่จะทำให้ปฏิกิริยานั้นสังเคราะห์เอสเทอร์ได้มากที่สุดและในขณะเดียวกันต้องลดระดับกรดไขมันที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาให้น้อยที่สุด การควบคุมค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity) นั้นทำได้โดยการเติมน้ำในปฏิกิริยาซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ แหล่งที่มาของไลเปส เทคนิคการตรึงเอนไซม์ คุณภาพของตัวรับหมู่เอซิลและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ เช่น ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida* sp.99-125 ต้องการปริมาณน้ำประมาณร้อยละ 10-20 ในการที่จะเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ในขณะที่ไลเปสตรึงรูป Novozyme 435 นั้นสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีโดยต้องการน้ำเพิ่มเป็นพิเศษ [33] ดังนั้นปริมาณน้ำที่เหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็น โดยมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระบบที่ใช้

**อุณหภูมิของปฏิกิริยา**

อุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่สูงขึ้นช่วยเร่งให้ปฏิกิริยาเร็วขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ทำให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลดลงอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาพบว่าไลเปสจากแหล่งที่แตกต่างกันจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส [34] ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นถูกกำหนดโดยการรักษาสมดุลระหว่างเสถียรภาพของเอนไซม์และอัตราเร็วของปฏิกิริยา แต่หากมองในเชิงพาณิชย์แล้วกระบวนการที่ดีที่สุดในการผลิตต้องใช้อุณหภูมิต่ำที่สุดแต่สามารถทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดภายในเวลาสั้นที่สุด

**รูปแบบการทำงาน**

โดยทั่วไปแล้วการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้นมี 3 แบบใหญ่ด้วยกัน ได้แก่ แบบไม่ต่อเนื่อง (batch) แบบต่อเนื่อง (continuous) และ แบบเติมสารเข้าไปเป็นระยะ (fed batch) เครื่องปฏิกรณ์ที่นิยมใช้สำหรับการทำงานทั้ง 3 แบบที่กล่าวมาได้แก่ เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน (stirred tank reactor, STR) เครื่องปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed bed reactor, PBR) เครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิไดซ์เบด (fluidized bed reactor, FBR) และ เครื่องปฏิกรณ์แบบแผ่นเยื่อ (membrane reactor, MR) การเลือกเครื่องปฏิกรณ์ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไว้ แม้ว่าการศึกษาที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันส่วนใหญ่ใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน ซึ่งเอนไซม์จะกระจายตัวในส่วนผสมปฏิกิริยาได้ดี แต่การกวนสามารถทำให้เอนไซม์หลุดจากวัสดุที่ตรึงไว้ ซึ่งส่งผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์และการนำกลับมาใช้ใหม่ สำหรับเครื่องปฏิกรณ์แบบแพคเบดเป็นเครื่องปฏิกรณ์แบบดั้งเดิมที่ใช้สำหรับการผลิตในปริมาณมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ค่าใช้จ่ายต่ำและใช้งานง่าย โดยเครื่องปฏิกรณ์แบบนี้ยังสามารถใช้งานได้ในรูปแบบต่อเนื่องโดยไม่จำเป็นต้องแยกเอาตัวเร่งปฏิกิริยาออกจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบแพคเบดมีข้อจำกัดในการแพร่ของอนุภาค (interparticle diffusion) ทำให้ความดันในเครื่องปฏิกรณ์ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสะสมของกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาบนผิวของเอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการกำจัดกลีเซอรอลในระหว่างกระบวนการผลิต [35,36] สำหรับเครื่องปฏิกรณ์แบบแผ่นเยื่อ กลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจะถูกแยกออกไปอย่างต่อเนื่องระหว่างกระบวนการ แต่เครื่องปฏิกรณ์ชนิดนี้มีราคาค่อนข้างแพงเมื่อเทียบกับเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน และแบบแพคเบด

**ข้อสรุปและมุมมองในอนาคต**

การพัฒนาแหล่งพลังงานทางเลือกที่หมุนเวียนได้เพื่อทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งเป็นแหล่งพลังงานดั้งเดิมนั้นเป็นประเด็นที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เพราะโลกกำลังขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิง ประกอบกับความต้องการพลังงานที่เพิ่มขึ้นอย่างเกินขีดจำกัด รวมทั้งการตระหนักถึงปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเนื้อเดียวนั้นได้รับความนิยมมากขึ้น เมื่อเทียบกับวิธีปกติแล้วการใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาแทนที่ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีนั้นได้รับการยอมรับมากขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาใช้พลังงานน้อยลง ลดขั้นตอนการผลิตและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น อย่างไรก็ตามราคาของเอนไซม์ไลเปสยังคงเป็นอุปสรรคสำคัญในการที่จะนำเอา

เอนไซม์มาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์ จึงมีความพยายามในหลาย ๆด้านที่จะพัฒนาระบบนี้ให้คุ้มทุนมากขึ้น ต้นทุนสูงในการผลิตของไลเปสนั้นสามารถแก้ไขได้ด้วยการพัฒนาเอนไซม์ไลเปสชนิดใหม่รวมกับการใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม การปรับปรุงการหมักและปรับปรุงกระบวนการผลิต ยิ่งไปกว่านั้นสามารถปรับอายุการใช้งานของไลเปสให้เพิ่มขึ้นได้ โดยนำเอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการตรึงลงบนวัสดุที่เหมาะสมเพื่อนำกลับมาใช้ได้ใหม่ ปัจจุบันนี้มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆที่สำคัญในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เพื่อที่จะสร้างมาตรฐานให้กับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เช่น งานวิจัยเกี่ยวกับผลของเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งที่แตกต่างกัน กลยุทธ์ต่าง ๆที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ คุณภาพและชนิดของสารตั้งต้นที่นำมาใช้ และตัวรับหมู่เอซิลชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละวิธีซึ่งแตกต่างกัน จะเห็นได้ว่ามีข้อมูลมากมายที่ส่งเสริมให้มีการพัฒนากระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง ถึงแม้ว่าจะมีอุปสรรคสำคัญหลายอย่าง แต่การผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในเชิงอุตสาหกรรมมีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระบบการทำงาน ดังนั้นจึงมีความพยายามอย่างต่อเนื่องเพื่อหาปัจจัยที่สำคัญในแต่ละขั้นตอนซึ่งจะสามารถช่วยแก้ปัญหาของแต่ละระบบ นอกจากนี้แล้วการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการขยายขนาดและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตนั้น เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะลดข้อจำกัดของการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในเชิงพาณิชย์ในอนาคต

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความช่วยเหลือจากหน่วยวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพโดยตัวเร่งชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

[1] Pahl G. 2008. Biodiesel: growing a new energy economy. 2nd ed. White River Junction, Vermont: Chelsea Green Publishing Company.

[2] Ma F, Hanna MA. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology 70: 1-15.

[3] Walter K. 2006. Strategies for future heavy duty diesel engines for commercial vehicles. International Journal of Vehicle Design 41: 67-82.

[4] Al-Zuhair S. 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. Biofuels Bioproducts and Biorefining 1: 57-66.

[5] Marchetti JM, Miguel VU, Errazu AF. 2007. Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews 11: 1300-11.

[6] Dias JM, Alvim-Ferraz ACM, Almeida MF. 2008. Comparison of the performance of different homogeneous alkali catalysts during transesterification of waste and virgin oils and evaluation of biodiesel quality. Fuel 87: 3572-8.

[7] Rashid U, Anwar F. 2008. Production of biodiesel through optimized alkaline-catalyzed transesterification of rapeseed oil. Fuel 87(3): 265-73.

[8] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering 2001; 92(5): 405-16.

[9] Demirbas A. 2003. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. Energy Conversion and Management 44(13): 2093-109.

[10] Akoh CC, Lee GC, Shaw JF. 2004. Protein engineering and application of *Candida rugosa* lipase isoform. Lipids 39: 513-26.

[11] Akoh CC, Chang S, Lee GC, Shaw JF. 2007. Enzymatic approach to biodiesel production. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 8995-9005.

[12] Yang J, Guo D, Yan Y. 2007. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 45: 91-6.

[13] Jaeger KE, Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, Reetz MT. 1996. Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols. Applied Microbiology and Biotechnology 46: 99-105.

[14] Cardenas F, de Castro MS, Sanchez-Montero JM, Sinisterra JV, Valmaseda M, Elson SW, Alvarez E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. Enzyme and Microbial Technology 28: 145-54.

[15] Kim HK, Park SY, Lee JK, Oh TK. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 62(1): 66-71.

[16] Yan J, Yang J, Xu L, Yan Y. 2007. Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermostable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 49: 28-35.

[17] Nelson LA, Foglia TA, Marmer WN. 1996. Lipase catalyzed production of biodiesel. Journal of American Oil Chemist's Society 73: 1191-5.

[18] Noureddini H, Gao X, Philkana RS. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresource Technology 2005; 96: 769-77.

[19] Soumanou MM, Bornscheuer UT. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. Enzyme and Microbial Technology 33: 97-103.

[20] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and Microbial Technology 40: 1451-63.

[21] Cao L. 2005. Immobilised enzymes: science or art? Current Opinion in Chemical Biology 9(217): 226.

[22] Katchalski-Katzir E. 1993. Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. Trends in Biotechnology 11(11): 471-8.

[23] Patil PD, Deng S. 2009. Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils. Fuel 88: 1302-6.

[24] Behzadi S, Farid MM. 2007. Review: examining the use of different feedstock for the production of biodiesel. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering 2: 480-9.

[25] Gui MM, Lee KT, Bhatia S. 2008. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. Energy 33: 1646-53.

[26] Xu Y, Du W, Liu DH, Zeng J. 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. Biotechnology Letters 25: 1239-41.

[27] Modi MK, Reddy JRC, Rao BVSK, Prasad RBN. 2006. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. Biotechnology Letters 28: 637-40.

[28] Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 17(3-5): 133-42.

[29] Xu Y, Du W, Zeng J, Liu D. 2004. Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL IM in a Solvent-free Medium. Biocatalysis and biotransformation 22(1): 45-8.

[30] Talukder MR, Puah SM, Wu JC, Won CJ, Chow Y. 2010. Lipase-catalyzed methanolysis of palm oil in presence and absence of organic solvent for production of biodiesel. Biocatalysis and biotransformation 24(4): 257-62.

[31] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. Bioresource Technology 98: 648-53.

[32] Lu J, Chen Y, Wang F, Tan T. 2009. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99-125 in organic solvent system. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 56: 122-5.

[33] Tan T, Nie K, Wang F. 2006. Production of biodiesel by immobilized *Candida sp.* lipase at high water content. Applied Biochemistry and Biotechnology 128: 109-16.

[34] Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 43: 142-7.

[35] Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y. 2001. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. Journal of the American Oil Chemists' Society 78: 703-7.

[36] Shaw JF, Chang SW, Lin SC, Wu TT, Ju HY, Akoh CC. 2008. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. Energy & Fuels 22: 840-4.

[37] Winayanuwattikun P, Kaewpiboon C, Piriyakananon K, Tantong S, Thakernkarnkit W, Chulalaksananukul W, Yongvanich T. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. Biomass & Bioenergy 32: 1279-86

[38] Xu H, Miao X, Wu Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotropic growth in fermenters. Journal of Biotechnology 126: 499-507.

[39] Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2006. Particulate emission characterization of a biodiesel vs diesel-fuelled compression ignition transport engine: A comparative study. Atmospheric Environment 40: 5586-95.

[40] Talukder MMR, Beatrice KLM, Song OP, Wu JC, Won CJ, Chow Y. 2008. Improved method for efficient production of biodiesel from palm oil. Energy & Fuels 22: 141-4.

[41] Jegannathan KR, Jun-Yee L, Chan ES, Ravindra P. 2009. Design an immobilized lipase enzyme for biodiesel production. Journal of Renewable and Sustainable Energy 1.