รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1.ชื่อแผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. ชื่อโครงการวิจัย การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

3. ชื่อการทดลอง การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำโดยใช้ไลเปส

4.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง

มัทนา ศรีหัตถกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน

ภารณี สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

จีราพร แก่นทรัพย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

สามารถผลิตไลเปสในถังหมักโดยการใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 ^{0} ซ, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO_2 (ปริมาณออกซิเจน) 80 % ในระยะเวลา 6 ชม. ได้ไลเปสความเข้มข้น 30 มก/มล. ไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าวอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด ตกตะกอนน้อยมากเมื่อทิ้งไว้นานๆ และเมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ได้เป็นไบโอดีเซลทั้งหมด ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมา ได้ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 93.3, 86.7, 75.0 และ 68.5 ตามลำดับ สามารถปรับปรุงคุณภาพไบโอดีเซลให้มีจุดขุ่นที่ 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ ซึ่งดีกว่าเดิมที่มีค่าจุดไหลเทอยู่ที่ 11 ^{0}ซ และได้มาตรฐานไบโอดีเซลบี100 ตามมาตรฐานสากล มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้ ($p<0.01$) และค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ และ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ มากที่สุดคือ 1:2, 1:4และ 1:3, 1:4 ตามลำดับ ดีเซลเกรด1(ปตท. พรีเมียมเกรด) ตกตะกอนเล็กน้อย ประมาณ 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน ที่ 2- 4 ^{0}ซ แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 ^{0}ซ ดีเซลเกรด2 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. แต่ไม่แข็งตัว ที่ 2- 4 ^{0}ซ ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 ^{0}ซ ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ แข็งตัวที่ 2- 4 ^{0}ซ ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ใส ไม่แข็งตัวและไม่ตกตะกอนที่ 2- 4 ^{0}ซ ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ ผสมกับ ดีเซลเกรด1และ2 ทุกอัตรา แข็งตัวทันที ที่ -20^{0}ซ อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 50:50 ในระยะเวลา 5 วัน ถ้าเกินกว่าระยะเวลา 5 วัน ใช้ไม่ได้ในทุกอัตรา อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอ

ดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 50:50 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 80:20 ถึง 90:10 มีระยะการใช้งาน 30 วัน และตะกอนที่ตกลงมาในทุกการทดลอง ในทุกส่วนผสม เป็นตะกอนของดีเซล

6.คำนำ

ปัญหาน้ำมันดีเซลที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ สังคม สภาพแวดล้อมและความสุขของประชากรทั่วโลกเป็นอย่างมากในขณะนี้ ไม่ได้มีเพียงแค่ที่คาดว่าน้ำมันใกล้จะหมดลงในไม่ช้าและมีราคาแพงเท่านั้น แต่ยังมีที่สำคัญที่สุดคือ มลพิษที่เกิดจากการใช้น้ำมันดีเซลที่ส่งผลให้เกิดภาวะโลกร้อนอยู่ในขณะนี้ ทำให้ทุกประเทศต้องเร่งรัดค้นหาพลังงานทางเลือกอื่นๆ เช่น ไบโอดีเซล ก๊าซธรรมชาติ(LPG และ CNG) พลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรเจน และพลังงานไฟฟ้า เพื่อทดแทนการใช้น้ำมันดีเซลในกิจกรรมต่างๆ โดยเฉพาะในกิจกรรมที่มีการใช้น้ำมันมากที่ไปเร่งการทำให้เกิดมลพิษต่อภาวะโลกร้อน เช่น ภาคอุตสาหกรรม การคมนาคมและขนส่ง จากรายงานการศึกษา พบว่า ไบโอดีเซล มีการเผาไหม้ดีกว่าและสะอาดกว่า ไอเสียจึงมีคุณภาพดีกว่าน้ำมันดีเซล จึงสามารถลดคาร์บอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งเป็นตัวการสำคัญของการเกิดฝนกรดไฮโดรคาร์บอน และฝุ่นละอองจากรถยนต์ได้ร้อยละ 17 ถึง 53, 20 ถึง 99, 20 ถึง 40 และ 20 ถึง 40 ตามลำดับ และสามารถลดวงจรชีวิตของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ร้อยละ 78 ซึ่งเป็นผลให้ลดภาวะโลกร้อน(กัญจนา, 2544; ข้อดี-ข้อด้อยของไบโอดีเซลhttp://www.biodiesel.eng.psu.ac.th/webboard/ view.php?No-133) และจากรายงานผลการศึกษามลพิษในเครื่องยนต์ดีเซลที่ใช้น้ำมันไบโอดีเซล กับเครื่องยนต์ดีเซลรุ่น 1KZ-TE ที่สภาวะก่อนและหลังปรับแต่งองศาหัวฉีดน้ำมัน เพื่อหาแนวทางควบคุมและลดมลพิษที่เกิดขึ้นและคำนวณเปรียบเทียบค่าสิ้นเปลืองเชื้อเพลิง พบว่าไบโอดีเซลบี100สามารถลดค่าไฮโดรคาร์บอน ออกไซด์ของไนโตรเจนและควันดำจาก 8.10(ppm.Vol), 190(ppm.Vol) และ 8(%) ลงเหลือ 2.33, 100.3 และ 1 ตามลำดับ ส่วนน้ำมันดีเซลมีค่าออกไซด์ของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจาก133.67เป็น173.67 (ppm.Vol) ส่วนค่าอื่นๆไม่แตกต่างกันกับก่อนปรับแต่งหัวฉีด ส่วนอัตราการสิ้นเปลืองน้ำมันน้อยกว่าดีเซลเล็กน้อย (http://www.rsu.ac.th./engineer/ac/academic/.20percent/Pollution%20B100%_20Test.html) ก๊าซธรรมชาติสามารถลดคาร์บอนอกไซด์ ไฮโดรคาร์บอนและฝุ่นละอองจากรถยนต์ได้ ส่วนพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรเจนและพลังงานไฟฟ้า เป็นพลังงานสะอาดอย่างแท้จริง ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่ยังอยู่ในช่วงระยะเริ่มแรกของการเปลี่ยนผ่านทางเทคโนโลยี และยังอยู่ในขั้นตอนการวิจัย ระบบต่างยังไม่พร้อมสมบูรณ์ ดังนั้นไบโอดีเซลจึงเป็นพลังงานสะอาดที่หลายๆประเทศให้ความสำคัญ และส่งเสริมให้ใช้กันอย่างแพร่หลายอยู่ในขณะนี้ เพราะช่วยในการนำน้ำมันพืชที่ใช้แล้วซึ่งมีสารไดออกซินที่เป็นสารก่อมะเร็ง ไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ ให้กลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก ช่วยเหลือเกษตรกรผู้ปลูกพืชน้ำมันซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศ ช่วยลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศโดยเฉพาะน้ำมันดีเซลที่มีสัดส่วนการใช้น้ำมันสูงกว่าเบนซินถึงสองเท่า และเป็นการเสริมสร้างความมั่นคง และเสถียรภาพทางด้านพลังงานของประเทศ นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล ซึ่งสามารถใช้ทดแทนดีเซลได้เลยไม่ต้องปรับแต่งเครื่องยนต์หรือปรับแต่งเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งในปัจจุบันประเทศสหรัฐ อเมริกา(โดย the energy policy act of 2005)

อังกฤษ(the renewable transport fuel obligation) และประเทศแถบประเทศยุโรป และทั่วโลก ได้มีการบังคับใช้ใช้ไบโอดีเซลมากยิ่งขึ้น ไบโอดีเซลสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันปิโตรเลียมดีเซลทุกชนิด เช่น รถยนต์ รถบรรทุก รถไฟ เครื่องบิน เครื่องกำเนิดไฟฟ้า เครื่องทำความร้อน และในภาคการเกษตร เป็นต้น(http://en.wikipedia.org/wiki/ Biodiesel; http://www.habmigern2003.Info/biogas/Biodiesel.html) การผลิตไบโอดีเซลเกรดสูงๆเทียบเท่าปิโตรเลียมดีเซล หรือไบโอดีเซลบริสุทธิ์(pure biodiesel fuel(100 % esters of fatty acids, B100) น้ำมันที่ใช้ควรบริสุทธิ์ และควรมี fatty acid methyl ester ที่ต้องการในปริมาณที่เหมาะสม (Choo Yuen *et al*., 2009; http://www.scielo.br/scielo.php?scipt=sci_arttext&pid=S0103-50532005000800003) และในบรรดาน้ำมันพืชทั้งหมดที่นำมาผลิตไบโอดีเซล น้ำมันปาล์มมีศักยภาพมากที่สุดเพราะว่า ปาล์มน้ำมันผลิตน้ำมันได้มาก น้ำมันปาล์มมีราคาต่ำ มีคุณสมบัติทนความร้อนสูง (www.toryod.com; http://en.Wikipedia.org/wiki/Palm_Oil)) และมีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมดีเซลได้อย่างดี การใช้น้ำมันปาล์มที่ไม่บริสุทธิ์ จะไปเพิ่มต้นทุน ในการกำจัดสิ่งเจือปนอื่นๆในน้ำมันปาล์มในปฏิกิริยา hydrolysis ด้วยกรด และในการกลั่นให้เป็นไบโอดีเซล ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาการใช้ไลเปส ในการผลิตไบโอดีเซล เพื่อให้ได้ไบโอดีเซลคุณภาพดี ต้นทุนต่ำ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม(http:/cuir.car.chula.ac.th/handle/ 123456789/6672; Royon *et al*., 2007; http://www.spingerlink.com/content/nq764815q8287w12/) ไลเปส(triacylglycerol acylhydrolasesEC3.1. 1.3) มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ(hydrolyze) ของ ester bond ตรงพันธะระหว่าง fatty acids กับ glycerol ในโมเลกุล triglyceride ในสภาพ oil-water interface และบน substrate ที่เป็นของแข็งทั้งอย่างเฉพาะเจาะจง หรือไม่เจาะจงอย่างสมบูรณ์ (Macrae, 1983; Jensen, 1983;http://www.sciencedirect.com/science_ob=articleURL&_udi=B6TGN-45DFFGC-1&_user=...) ได้เป็น glycerol, fatty acids ต่างๆ และ partial glyceride ทำให้โมเลกุลไขมันขนาดใหญ่ ถูกย่อยเป็นโมเลกุลขนาดเล็กลงอย่างเฉพาะเจาะจง ในระยะเวลาสั้นที่อุณหภูมิต่ำ 20-60 องศาเซลเซียส ไลเปสยังมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา esterification, และ transesterification ในตัวทำละลายที่ไม่ใช่น้ำ(Nagao *et al*., 2002; Hasan *et al*., 2006) จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และในสกัดน้ำมันแทนกรรมวิธีการสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ใช้อุณหภูมิและความดันสูง การใช้ไลเปสจะไปลดต้นทุนพลังงาน โรงงาน และอุปกรณ์ราคาแพงต่างๆลงได้ นอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ได้เองปริมาณมากจากจุลินทรีย์ ในระยะเวลาอันสั้น และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากประเทศไทยสามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้ปริมาณมากถึง 0.6-0.8 ตัน/ไร่/ปี ถ้าสามารถส่งเสริมให้ผลิตและใช้ไบโอดีเซลกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในภาคการเกษตร จะช่วยให้เศรษฐกิจของครัวเรือนในชุมชน และท้ายสุดของประเทศดีขึ้น

ข้อควรระวังที่สำคัญในการใช้ไบโอดีเซลบี100 คือ ไบโอดีเซลบี100จะแข็งตัวที่อุณหภูมิสูงกว่าน้ำมันดีเซล(โดยส่วนใหญ่ไบโอดีเซลบี100 จะมีจุดขุ่นอยู่ที่ 1.7-15.6 ส่วนน้ำมันดีเซลเกรด2มีจุดขุ่นที่ -15 ถึง 5 ^{0}ซ และจุดไหลเทที่ -35 ถึง -15 ^{0}ซ(มงคล, 2557)) ซึ่งจะไปทำให้หัวฉีดอุดตันได้ ดังนั้นการให้ความร้อนแก่ท่อส่งและถังน้ำมันอาจมีความจำเป็นแม้สภาพอากาศไม่เย็นมาก(มงคล, 2557) และเพื่อแก้ปัญหาอัน

เนื่องมาจากไบโอดีเซลบี100 กรมธุรกิจพลังงานได้กำหนดส่วนผสมของไบโอดีเซลในน้ำมันดีเซลไว้ไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานของเครื่องยนต์ แต่น้ำมันดีเซลบี20 ลดปัญหามลพิษได้ระดับหนึ่ง ไม่ดีเท่าน้ำมันดีเซลบี80(มงคล, 2557) มัทนาและคณะ(2558) สามารถผลิตไบโอดีเซลบี100จากน้ำมันปาล์มโดยใช้ไลเปส แต่ไบโอดีเซลที่ได้มีจุดไหลเทที่ +11 องศาเซลเซียส ซึ่งไบโอดีเซลจะแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า +11 องศาเซลเซียส ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในพื้นที่หนาวเย็นได้ และไม่สามารถเพิ่มอัตราส่วนในการผสมกับน้ำมันดีเซลได้ ส่งผลให้ไม่สามารถลดมลพิษลงได้ตามเกณฑ์มาตรฐาน ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการผลิตไบโอดีเซลให้มีจุดไหลเทต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำมันให้ใช้ได้ในสภาพอากาศหนาวเย็น และเพื่อการลดมลพิษต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดไหลเทต่ำ มีคุณภาพตรงตามมาตรฐานสากล และต้นทุนในการผลิตต่ำ

7. วิธีดำเนินการ

ดำเนินการทดลอง 6 การทดลอง ได้แก่

1. การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น โดยใช้ไลเปส

1.1 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียในถังหมัก

1.2 การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆด้วยไลเปส

2.การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยวิธี chromatography

2.1การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้สารเคมี

ก. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้ยูเรีย

ข. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆ ที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปส โดยใช้เมทธานอล

3. การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดเยือกแข็งต่ำโดยใช้กรดไขมันอัตราส่วนต่างๆ

4 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ชนิดต่างๆที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากส่วนผสมไบโอดีเซลโดยใช้ความเย็น(crystallization)

5 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

ก. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

ข. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ยูเรีย

ค. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

6 การทดลองใช้ไบโอดีเซลกับเครื่องยนต์

การทดลองที่1. การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น โดยใช้ไลเปส

1.1 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียในถังหมัก

วิธีดำเนินการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเหลว Luria-Bertani(LB) + ampicilin 100 ug/ml
2. ตู้บ่มเชื้อ SHE LAB
3. เครื่อง autoclave
4. ถังหมัก(Biostat B B. Braun Biotech International)
5. สารเคมีต่างๆ เช่น ammonium sulphate, IPTG, citric acid,
6. เครื่อง sonicator
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ยี่ห้อ TOMY MX301
8. ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ SHEL LAB
9. เครื่อง HPLC ยี่ห้อ WATER 515
10. เครื่องแก้ว เช่น ขวดแก้วดูแรน บีกเกอร์

แบบและวิธีการทดลอง

-

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เลี้ยง *E. coli* Bl21 ที่ได้รับยีน *lip*A ของ *Bacillus subtilis* clone 6 ในอาหารเหลว LB 400 มล.+ampicillin 100 ug/ml 800 ul บ่มเชื้อข้ามคืน ที่ 37 ^{0}ซ, 200 rpm

2. อบถังหมักที่มีอาหาร LB 4 ล. บรรจุไว้ภายในถัง ที่ 121 ^{0}ซ, 15 ปอนด์ 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นข้ามคืน

3. ถ่ายเชื้อ *E. coli* Bl21ที่เลี้ยงไว้ ลงในถังหมัก และเติม ampicillin 100 ug/ml 8 มล.ตั้งโปรแกรมการหมักที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO_2 (ปริมาณออกซิเจน) 80 %

4. เหนี่ยวนำให้ผลิตไลเปสด้วย IPTG 2 ครั้ง

ครั้งที่1 เมื่อเชื้อเจริญถึง $O.D_{600}$ 0.6-0.8

ครั้งที่2 หลังจากครั้งที่1 1 ชม. ความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ในถังหมัก = 1 mM

5. บ่มเชื้อต่อไปอีก 5 ชม. จึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 ^{0}ซ 8,000 รอบ/นาที 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่-20 ^{0}ซ

6. ทำให้เซลล์แตก ดังนี้ นำตะกอนเซลล์มาละลายใน 1X 250 mM sodium phosphate(NaH_2PO_4) buffer pH 8.0 + lysozyme ใส่ lysozyme อัตรา 4 มก./ตะกอนเซลล์ 30 มก.. ผสมให้เข้ากันดี ไม่จับเป็นก้อน บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน

7. เติม RNase A (100 มก./มล.) 10 µl /ตะกอนเชื้อ 30 มก. คว่ำ-หงาย ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 ^{0}ซ 8,000 รอบ/นาที 10 นาที

8. เก็บส่วนใสที่มี crude enzyme ไปตกตะกอนข้ามคืนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ 4 ^{0}ซ

9. ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน crude enzyme ที่ 4 ^{0}ซ 8,000 รอบ/นาที 30 นาที

10. วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และ ตรวจสอบโปรตีนที่ได้โดยวิธี SDS-PAGE

8. เก็บ crude lipase ไว้ที่ - 20 ^{0}ซ

การบันทึกข้อมูล

ปริมาณโปรตีน และขนาดโปรตีนที่ได้โดยวิธี SDS-PAGE

1.2 การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆด้วยไลเปส

แบบและวิธีการทดลอง

-

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ทำการกำจัดยางเหนียว(gums or phosphatides) ออกจากน้ำมันพืชดิบโดยใช้ citric acid 1 % ของปริมาตรน้ำมัน โดยดัดแปลงวิธีการของ วัชระ และ พัชรินทร์(2014) และ Etienne Deffense(http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40322) มีวิธีการดังนี้

-เทน้ำเปล่า 400 มล. ลงในขวดแก้วฝาเกลียว จากนั้นใส่ citric acid 1 % ของปริมาตรน้ำมันลงไป กวนให้ละลายหมด เสร็จแล้วใส่น้ำมันพืชดิบปริมาตร 600 มล. ลงไป กวนหรือเขย่าให้กรดและน้ำมันดิบผสมกันดี จากนั้นนำไปวางบน hot plate อุณหภูมิ 95 ^{0}ซ กวนตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer จนน้ำมันพืชดิบมีอุณหภูมิ 95 ^{0}ซ กวนต่อไปอีก 25 นาที จึงดับไฟ

-ค่อยๆเติมเกล็ด NaOH ลงไปในน้ำมันพืชดิบ กวนให้ NaOH ละลายโดยใช้ magnetic stirrer เพื่อสมดุลย์ความเป็นกรดและด่าง = 7 ซึ่งจะทำให้ phosphatidic acid แตกตัวออกมาจากยางเหนียวที่ไม่ละลายน้ำมากขึ้น ขั้นนี้จะเกิดความร้อนสูงมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องค่อยๆเติม NaOH ลงไป และถ้ามีความร้อนสูง ต้องหยุดเติม NaOH รอให้เย็นลง จึงเติมลงไปใหม่

-เติมน้ำร้อน อุณหภูมิ 60-70 ^{0}ซ ลงไป กวนอย่างแรง ยางเหนียวจะแตกตัวออกจากน้ำมันพืชดิบ ผสมอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำชั้นล่าง

-เทน้ำมันดิบส่วนบนลงใน separating funnel แล้วล้างด้วยน้ำอุ่น อุณหภูมิ 60-70 ^{0}ซ 3 ครั้ง

-แยกน้ำและสิ่งสกปรกที่หลงเหลืออยู่ในน้ำมันพืชดิบโดยการนำไปอบด้วยความร้อนในตู้อบ อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ 30 นาที

- เก็บน้ำมันพืชดิบส่วนบนไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. ทำการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าวด้วย crude lipase(30 มก./มล.)ที่เตรียมไว้ ในถุงพลาสติกขนาด 16x26 นิ้ว อัตรา crude lipase 500 มล./น้ำมันปาล์มหรือน้ำมันพืชต่างๆ 4 ล. ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มปฏิกิริยาที่ 37 ^{0}ซ, 80 rpm เป็นเวลา 17 ชม. หรือ crude lipase(30 มก./มล.) อัตรา crude lipase 100 มล./น้ำมันปาล์มหรือน้ำมันพืชต่างๆ 4 ล. ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มปฏิกิริยาที่ 37 ^{0}ซ, 80 rpm จนกระทั่งน้ำมันใส เป็นเวลา 48-36 ชม. สำหรับน้ำมันปาล์ม ส่วนน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว บ่มปฏิกิริยาที่ 37 ^{0}ซ, 80 rpm นาน 24 ชม. ก็พอเพียงแล้ว

3. หยุดปฏิกิริยาที่ 60 ^{0}ซ 3 ชม. ขั้นตอนนี้น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำและสิ่งสกปรก ไม่จำเป็นต้องนำไปปั่นเหวี่ยง

4. นำน้ำมันที่ย่อยแล้ว ไปตรวจสอบการแข็งตัวของน้ำมันที่ 4 และ -20 ^{0}ซ

การบันทึกข้อมูล

1. คุณภาพน้ำมัน

2. การแข็งตัวของน้ำมันหลังการย่อยด้วยไลเปสที่ 4 และ -20 ^{0}ซ

เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2558 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. **การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยวิธี chromatography**

2.1 การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้สารเคมี

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีต่างๆ เช่น ยูเรีย แมทธานอล

2. tube ขนาดต่างๆ

3. เครื่อง HPLC

4. ตู้อบ

5. น้ำมันปาล์ม และน้ำมันสบู่ดำที่ย่อยด้วยไลเปสแล้ว

6. hot plate

แบบและวิธีการทดลอง

-

ก. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้ยูเรีย

วิธีการทดลอง

เตรียมส่วนผสมของน้ำมันปาล์มที่ย่อยด้วยไลเปสแล้ว : ยูเรีย : เมทธานอล ในอัตราส่วน 25 มล. : 10 ก. : 160 มล. ในขวดแก้วดูแรนขนาด 500 มล. แล้วเขย่าหรือกวนให้ผสมกันดี นำไปบ่มปฏิกิริยาบน hot plate ที่ 68 °ซ พร้อมกับกวนส่วนผสมด้วย magnetic stirrer เมื่อยูเรียละลายหมดแล้ว และอุณหภูมิของ

ส่วนผสมถึง 68 °ซ บ่มปฏิกิริยาต่อไปอีก 30 นาที เสร็จแล้วยกลงตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปตกตะกอนแยกกรดไขมันต่างๆที่ 4 และ -20 °ซ กรองตะกอนกรดไขมันที่ได้ที่อุณหภูมิต่างๆด้วยกระดาษ Kimwipes Kimtech ล้างตะกอนกรดไขมันด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 °ซ pH 3-4 3 ครั้ง ปรับค่าความเป็นกรดและด่างของน้ำมันให้เป็น 7 ด้วยน้ำ pH 7 ตรวจสอบกรดไขมันด้วยเครื่อง HPLC

การบันทึกข้อมูล

1. การแข็งตัวของกรดไขมันที่อุณหภูมิต่างๆ
2. ปริมาณกรดไขมันที่ 4 และ -20 °ซ

ข. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้เมทธานอล

วิธีการทดลอง

ผสมน้ำมันที่ย่อยแล้วกับเมทธานอล ปรับตามที่เหมาะสม นำไปบ่มปฏิกิริยาใน water bath ที่ 50 °ซ นาน 30 นาที เขย่าให้น้ำมันและเมทธานอลผสมกันเป็นระยะๆ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแยกกรดไขมันที่ 4 และ -20 °ซ แยกส่วนใสและตะกอนออกจากกัน นำส่วนใสและตะกอนไประเหยเมทธานอลออกไป ตรวจสอบกรดไขมันด้วยเครื่อง HPLC

การบันทึกข้อมูล

ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ได้

เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2559 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่3 การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดเยือกแข็งต่ำโดยใช้กรดไขมันอัตราส่วนต่างๆ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ

1. สารเคมีต่างๆ

3. water bath

4. เครื่อง HPLC

แบบและวิธีการทดลอง

-

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. นำกรดไขมันที่ได้ไปผลิตเป็นไบโอดีเซล โดยการผสมกับสารละลาย methanol และ KOH ที่ 55 °ซ นาน 25 นาที แล้วนำมาเขย่าอย่างแรงบนเครื่องเขย่าที่ 37 °ซ 200 รอบ/นาที 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนน้ำมันแยกชั้น นำไปล้างด้วยน้ำสะอาด และปั่นเหวี่ยงเอาน้ำออกไปให้หมด

2. นำไบโอดีเซลที่ได้ในข้อ1 ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ

2. เทไบโอดีเซลที่ไม่ตกตะกอนที่ 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ เก็บไว้ และเก็บไบโอดีเซลที่ตกตะกอนที่ 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ ไว้ ไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่ -20 ^{0}ซ คือไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำที่ -20^{0}ซ

4. วิเคราะห์ fatty acid methyl ester ที่ได้โดยวิธี reversed phase HPLC เพื่อตรวจสอบ fatty acid methyl ester ที่มีปรากฏอยู่ในไบโอดีเซล

การบันทึกข้อมูล

1. fatty acid methyl ester ที่มีปรากฏอยู่ในไบโอดีเซล ที่ 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ

การทดลองที่4 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ชนิดต่างๆที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากส่วนผสมไบโอดีเซลโดยใช้ความเย็น(crystallization)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1.อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ separating funnel, beaker, ขวด duran ขนาดต่างๆ

2. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ methanol AR grade, urea, KOH

3.hot plate

4. hot oven

5. tube ขนาด 50 มล.

6. บีกเกอร์

แบบและวิธีการทดลอง

-

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ทำการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันสบู่ดำที่ย่อยด้วยไลเปสแล้ว โดยการผสมน้ำมัน 30 มล. กับ สารละลาย methoxide (methanol 60 มล. และ KOH 1.2 ก.) บน hot plate อุณหภูมิ 58 ^{o}ซ และกวนตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer นาน 25 นาที เสร็จแล้วปิดไฟ และกวนต่อไปอีก 30 นาที ยกลง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด วิธีการล้าง มีดังนี้ นำไบโอดีเซลเทลงใน separating funnel เติมน้ำลงไปพอประมาณ ไม่มาก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น รอจนส่วนที่เป็นสารละลายข้างล่างใส จากนั้นเขย่าเบาๆให้ส่วนน้ำมันข้างบนสัมผัสกับส่วนของสารละลายข้างล่าง นาน 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอีกครั้ง และทำการปล่อยทิ้งสารละลายข้างล่าง แล้วล้างไบโอดีเซลที่ได้ด้วยน้ำ pH7 3 ครั้ง จนน้ำล้างใส วิธีการล้างแบบนี้จะประหยัดน้ำที่ใช้ล้างมาก และได้ไบโอดีเซลมาก เก็บไบโอดีเซลใส่ขวด นำไปใส่ในตู้อบอุณหภูมิ 60 ^{o}ซ 30 นาที ไบโอดีเซลจะใสแยกตัวออกจากสิ่งสกปรก ไขมันอิ่มตัวสูงและน้ำ น้ำมันที่ได้จะใสเหมือนน้ำมันที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว

2. นำไบโอดีเซลที่ได้ในข้อ1 ไปทดสอบการแข็งตัวที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ ข้ามคืน

3. เทไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ ใส่ขวดแล้วนำไปทดสอบการแข็งตัวในตู้เย็น -20 ^{0}ซ ข้ามคืน เก็บไบโอดีเซลที่แข็งตีวที่ -20 ^{0}ซ และไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่ -20 ^{0}ซ ไว้

4. วิเคราะห์ fatty acid methyl ester ที่ได้โดยวิธี reversed phase HPLC เพื่อตรวจสอบ fatty acid methyl ester ที่มีปรากฏอยู่ในไบโอดีเซล

การบันทึกข้อมูล

1. ปริมาณน้ำมันไบโอดีเซลที่ได้ที่ 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ

2. fatty acid methyl ester ที่มีปรากฏอยู่ในน้ำมันไบโอดีเซล ที่ 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ

เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2559 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่5 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

จากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่า ที่ 4 ^{0}ซ ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าวจะแข็งตัวทั้งหมด ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง จะใส ไม่แข็งตัว ส่วนไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำจะแข็งตัวไม่สมบูรณ์ที่ 4 ^{0}ซ (ส่วนใหญ่จะแข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ มีส่วนน้อยที่ไม่แข็งตัว) และถ้าพิจารณาสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมันเหล่านี้แล้ว ทำให้ได้ข้อสมมุติฐานว่าการผลิตไบโอดีเซลให้มีจุดแข็งตัวต่ำ โดยการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันผสมโดยใช้ยูเรีย น่าจะเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด

งานทดลองนี้มี 3 การทดลองย่อย

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1.อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ separating funnel ขวดแก้วดูแรนขนาดต่างๆ แท่งกวนสารเคมี บีกเกอร์

2. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ KOH, methanol, urea

3. water bath

4. เครื่อง HPLC

5. ตู้เย็น 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ

6. hot plate

7. tube ขนาด 50 มล.

8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้

ก. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 1/2 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 2. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 1 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 3. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 2 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 4. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 3 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 5. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 4 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม และน้ำมันถั่วเหลืองตามกรรมวิธีที่แสดงไว้ในการทดลองที่ 4

2. ผสมไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันปาล์มและน้ำมันถั่วเหลือง ตามกรรมวิธีของการทดลอง ในขวดแก้วขนาด 2 ล. ผสมให้เข้ากันดี

3. เติมเมทธานอล 1,536 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน

4. นำไปตั้งบน hot plate ใส่ยูเรีย 96 ก.ลงไป กวนให้ยูเรียละลายหมดโดยใช้ magnetic stirrer ปรับอุณหภูมิเป็น 68 ^{0}ซ เมื่อน้ำมันร้อนถึงอุณหภูมิ 68 ^{0}ซ กวนต่อไปอีก 30 นาที

5. ยกลง ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปตกตะกอนที่ 4 ^{0}ซ ข้ามคืน

7. รีบเทส่วนใสใส่ขวดใหม่ นำส่วนใส ไปตกตะกอนที่ -20 ^{0}ซ ข้ามคืน เมื่อน้ำมันที่ตกตะกอนได้ที่ 4 ^{0}ซ ละลาย เทน้ำมันที่ได้ใส่บีกเกอร์ และนำยูเรียที่ตกผลึกลงมาไปผึ่งแห้ง ก่อนนำไปชั่งน้ำหนักได้เป็นน้ำหนักยูเรีย +ไบโอดีเซลที่หลงเหลืออยู่

8. กรองตะกอนน้ำมันที่ตกได้ที่ -20 ^{0}ซ ด้วยกระดาษ Kimwipes Kimtech ตักตะกอนใส่บีกเกอร์ในข้อ7 ที่มีตะกอนน้ำมันที่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ อยู่

9. ล้าง ตะกอนที่ตกได้ที่ 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ และส่วนใสที่กรองได้ที่ -20 ^{0}ซ ด้วยน้ำ pH 3-4 อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ เพื่อแยกน้ำมันออกจากยูเรียและเมทธานอล

10. เทส่วนที่เป็นน้ำมันลงใน separating funnel แล้วล้างด้วยน้ำ pH5 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำ pH 7 1 ครั้ง เพื่อปรับความเป็นกรดและด่างของน้ำมันให้ได้7 เก็บน้ำมันที่ได้ไว้ในขวดแก้ว

11. นำขวดที่บรรจุน้ำมันไปใส่ไว้ในตู้อบ 60 ^{0}ซ 30 นาที เพื่อแยกน้ำและสิ่งสกปรกออกไป น้ำมันที่ตกตะกอนได้ที่ 4 และ -20 ^{0}ซ คือน้ำมันที่มีจุดขุ่น(could point) ที่อุณหภูมิ 6 ^{0}ซ (RT) ส่วนน้ำมันที่ได้จากส่วนใสที่ -20 ^{0}ซ คือน้ำมันที่มีจุดขุ่นที่ -20 ^{0}ซ (CP) บันทึกปริมาตรของน้ำมัน RT และ CP

12. ตรวจสอบการแข็งตัวของน้ำมัน RT โดยการนำน้ำมัน RT ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที ที่ 8 ^{0}ซ นาน 60 นาที และตรวจสอบการแข็งตัวของน้ำมัน CP โดยการนำน้ำมัน CP ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที ที่ -9 ^{0}ซ นาน 60 นาที

13. ส่งน้ำมัน RT และ CP อัตราส่วน 1:2 ไปวิเคราะห์คุณภาพที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ

14. คำนวณค่าสัดส่วนของน้ำมัน CP และ RT ที่ได้ ดังนี้

$$\text{ค่าสัดส่วนของน้ำมันที่ได้} = \frac{\text{ปริมาตรของน้ำมัน CP}}{\text{ปริมาตรของน้ำมัน RT}}$$

การบันทึกข้อมูล

1. ปริมาตรน้ำมัน RT และ CP
2. คุณภาพน้ำมัน RT และ CP

ข. **การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ยูเรีย**

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 1/2 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 2. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 1 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 3. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 2 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 4. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 3 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 5. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 4 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

ค. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 1/2 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 2. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 1 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 3. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 2 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 4. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 3 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

กรรมวิธีที่ 5. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 4 ส่วน(ปริมาตร : ปริมาตร)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2560 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

6 การทดลองใช้น้ำมันไบโอดีเซลกับเครื่องยนต์

เนื่องจากการทดลองนี้ขาดเครื่องยนต์ที่จะใช้ในการทดสอบน้ำมันกับเครื่องยนต์ และจากการสอบถามจากทางกองเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตรแล้ว สรุปได้ว่า ไบโอดีเซลที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติแล้ว ไม่จำเป็นต้องทดสอบกับเครื่องยนต์ก็ได้ เพราะปตท.ได้ทำการทดสอบไว้แล้ว(ศุภชัย, 2560 http://www.biodiesel.eng.psu.ac.th/webboard/view.php?No-133.) ผลงานวิจัยของปตท.ที่ได้ทดสอบการใช้ไบโอดีเซลบี100 กับ เครื่องยนต์ DMAX ปี 2003 และ TOYOTA คอมมอนเรลปี 2003 มีดังนี้ อัตราการสิ้นเปลืองน้ำมันเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้น 8-10 % อัตราการเร่งลดลง 7-10 % แต่ค่า CO ลดลง 40 % ควันดำลดลง 60 % และไม่มีรายงานว่าจะมีผลเสียหายต่อเครื่องยนต์ในระยะยาว ดังนั้นไบโอดีเซลที่ผลิตได้ สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้แน่นอน แต่ถ้าต้องการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันให้ใช้ได้ในสภาพอากาศหนาวเย็น และหรือเพื่อลดมลพิษ จำเป็นต้องทดสอบการตกตะกอนของน้ำมันที่อากาศเย็น เพื่อแก้ปัญหาการอุดตันของหัวฉีดในขณะใช้เครื่องยนต์หรือเมื่อต้องจอดรถทิ้งไว้นานๆ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1..อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ ขวดดูแรน

2. ทิ้วขนาด 50 มล.

3. ตู้เย็น 4 ^{0}ซ และ -20 ^{0}ซ

6. น้ำมันดีเซลเกรด1และเกรด2

7. น้ำมันไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ

8. เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง(vortex)

9. ทิปขนาด 5 มล.

10. ไมโครไปเปตขนาด 5 มล.

แบบและวิธีการทดลอง -

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การผลิตไบโอดีเซล

ดำเนินการผลิตไบโอดีเซล ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ จากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วน 1 : 2 ตามวิธีการการศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูงออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย จำนวน 6.5 ล.

2. การศึกษาการตกตะกอนของน้ำมันดีเซลที่ผสมกับไบโอดีเซล ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ

2.1 ทำการผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ กับดีเซลเกรด1 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด1 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ จำนวน 2 ชุด ชุดที่1 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่ 2-4 ^{0}ซ ชุดที่2 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่ -20 ^{0}ซ เป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ใช้ดีเซลเกรด1และไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.2 ทำการผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ กับดีเซลเกรด2 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด2 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ จำนวน 2 ชุด ชุดที่1 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่ 2-4 ^{0}ซ ชุดที่2 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่ -20 ^{0}ซ เป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ใช้น้ำมันดีเซลเกรด2 และไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.3 ทำการผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ กับดีเซลเกรด1 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด1 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ จำนวน 2 ชุด ชุดที่1 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่ 2-4 ^{0}ซ ชุดที่2 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่ -20 ^{0}ซ เป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ใช้น้ำมันดีเซลเกรด1และไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.4 ทำการผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ กับดีเซลเกรด2 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด2 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ จำนวน 2 ชุด ชุดที่1 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่ 2-4 ^{0}ซ ชุดที่2 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่ -20 ^{0}ซ เป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ใช้ดีเซลเกรด2และไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ เป็นตัวเปรียบเทียบ

ตรวจสอบการตกตะกอนของน้ำมันทุกวัน

เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2560 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

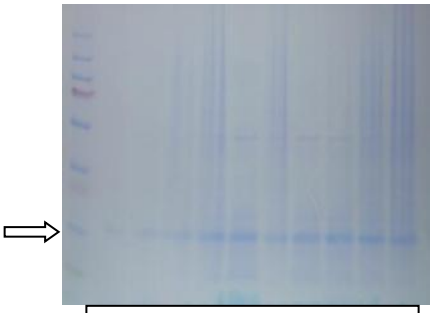
8.ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

1 การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆเช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น โดยใช้ไลเปส

1.1 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียในถังหมัก

สามารถผลิตไลเปสในถังหมักโดยการใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO_2 (ปริมาณออกซิเจน) 80 % ในระยะเวลา 6 ชม. หลังจาก BL21 เจริญถึง O.D.$_{600}$ 0.6-0.8 ได้ไลเปสความเข้มข้น 30 มก/มล. (รูปที่1)

การผลิตไลเปสในถังหมัก



lip B. subtilis 19.7 KDa T0-T8

รูปที่1 การผลิตไลเปสในถังหมัก และแถบโปรตีนที่ตรวจสอบได้โดยวิธี SDS-PAGE

1.2 การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆด้วยไลเปส

วิธีการกำจัดยางเหนียว(gums or phosphatides) โดยใช้ citric acid 1% สามารถกำจัดยางเหนียวในน้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันสบู่ดำดิบ และน้ำมันรำข้าวดิบ ได้ผลดีมาก สูญเสียน้ำมันน้อยมาก โดยใน

น้ำมันปาล์มดิบเริ่มต้น 1,600 มล. จะได้ปริมาณน้ำมันใส เสถียร ไม่ตกตะกอนง่าย 1,350 มล. ที่สูญเสียไป 250 มล. เป็นยางเหนียว สิ่งสกปรก และไขมันอิ่มตัวที่แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง(รูปที่2) นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือ citric acid จะไปจับกับ Ca และ Mg ในน้ำมัน กำจัดออกไปในคราวเดียวกัน(Etienne Deffense(http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40322) ในการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำโดยใช้ไลเปสให้เป็นผลสำเร็จนั้น จำเป็นต้องกำจัดยางเหนียว ไขมันอิ่มตัวที่แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และสิ่งสกปรกออกให้หมด เพื่อไม่ให้มารบกวนในขั้นตอนการผลิต และเพื่อให้ได้น้ำมันบริสุทธิ์ มีคุณภาพสูง เหตุที่เลือกใช้ citric acid 1% เพราะน่าจะปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่ากรดอื่นๆ

รูปที่2 วิธีการกำจัดยางเหนียวโดยการใช้ 1 % citric acid ซึ่งต่อมาจะทำในขวดปิดสนิท

ไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าวอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด ตกตะกอนน้อยมากเมื่อทิ้งไว้นานๆ และเมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ได้เป็นไบโอดีเซลทั้งหมด ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมา ได้ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 93.3(รูปที่3 และ4) , 86.7, 75.0 และ 68.5 ตามลำดับ การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว ค่อนข้างจะได้ผลผลิตน้อย เนื่องจากในน้ำมันเหล่านี้มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ปริมาณมาก และการแยกตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวออกจากสารละลาย ต้องการอุณหภูมิและความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสม ดังเช่นที่ได้ประสบมาในการทดลองนี้คือ ถ้าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2-3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะตกตะกอนลงมา แต่ถ้าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4-5 กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะลอยขึ้นข้างบน อยู่ที่ผิวหน้าของน้ำล้าง เมื่อการแยกตัวออกมาของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีน้อย เป็นผลให้ผลผลิตที่ได้ลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าความเร็วในการกวนในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลมีผลต่อการแยกตัว

ของไบโอดีเซล ซึ่งถ้าทุกอย่างเหมาะสมจะสามารถผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำได้สูงถึงร้อยละ 95 ส่วนไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าวนั้น ไม่เสถียร จะตกตะกอนสีขาวลงมามากตลอดเวลาที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

การแข็งตัวของน้ำมันที่ 4 ^{0}ซ

น้ำมันปาล์ม แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ (มี melting point 42-46 ^{0}ซ, HTTPS://WWW.CHEMPRO.IN/FATTYACID.HTM)

น้ำมันถั่วเหลือง เหลว ใส ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ (มี melting point 22-27 ^{0}ซ, HTTPS://WWW.CHEMPRO.IN/ FATTYACID.HTM)

น้ำมันสบู่ดำ มีทั้งหนืดข้น ไปจนถึงแข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ (มี melting point 31 ^{0}ซ, HTTPS://WWW.CHEMPRO.IN/ FATTYACID.HTM)

น้ำมันรำข้าว หนืดข้นมาก ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ(มี melting point 24-28 ^{0}ซ, HTTPS://WWW.CHEMPRO.IN/ FATTYACID.HTM)

การแข็งตัวของน้ำมันที่ -20 ^{0}ซ

น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ -20 ^{0}ซ

การแข็งตัวของไบโอดีเซลที่ 4 ^{0}ซ

ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ (มีจุดขุ่นที่ 17 ^{0}ซ และจุดไหลเทที่ 15 ^{0}ซ, Moser,2008; Vyas *et al*.,2009)

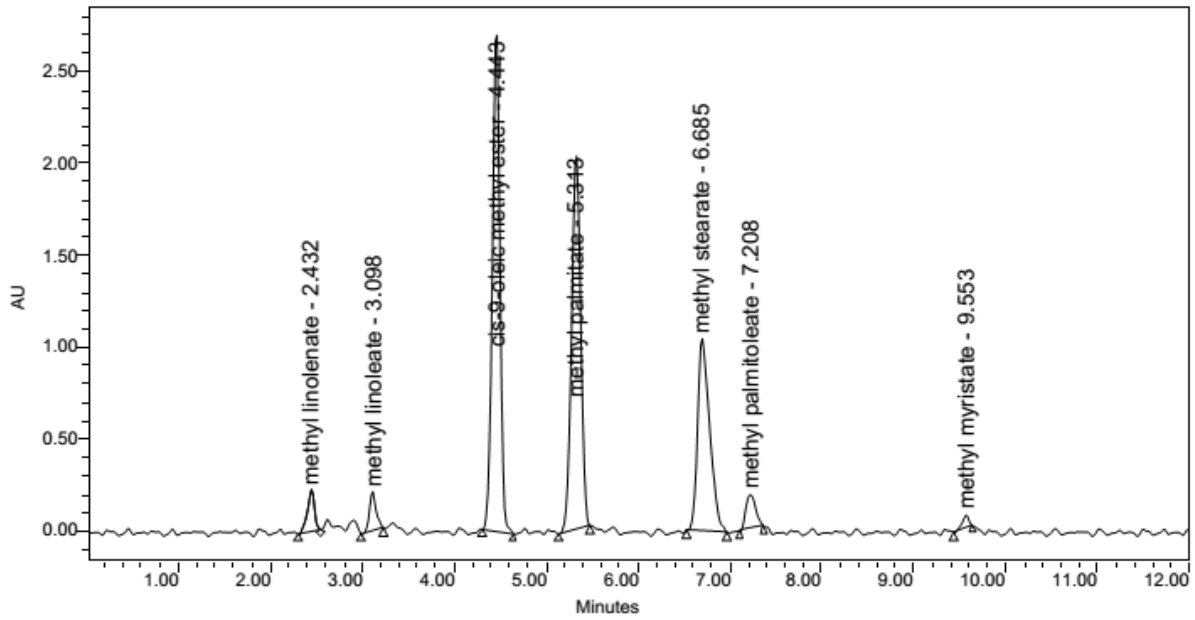
ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ มีลักษณะใส(มีจุดขุ่นที่ 1 ^{0}ซ และจุดไหลเทที่ 0 ^{0}ซ, Moser,2008; Vyas et al.(2009)

ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ แข็งตัวไม่สมบูรณ์ที่ 4 ^{0}ซ จับกันเป็นก้อน ไม่แข็งตัว มีน้ำมันใสปน(มีจุดขุ่นที่ 8 ^{0}ซ และจุดไหลเทที่ 6 ^{0}ซ, Moser,2008; Vyas et al.(2009)

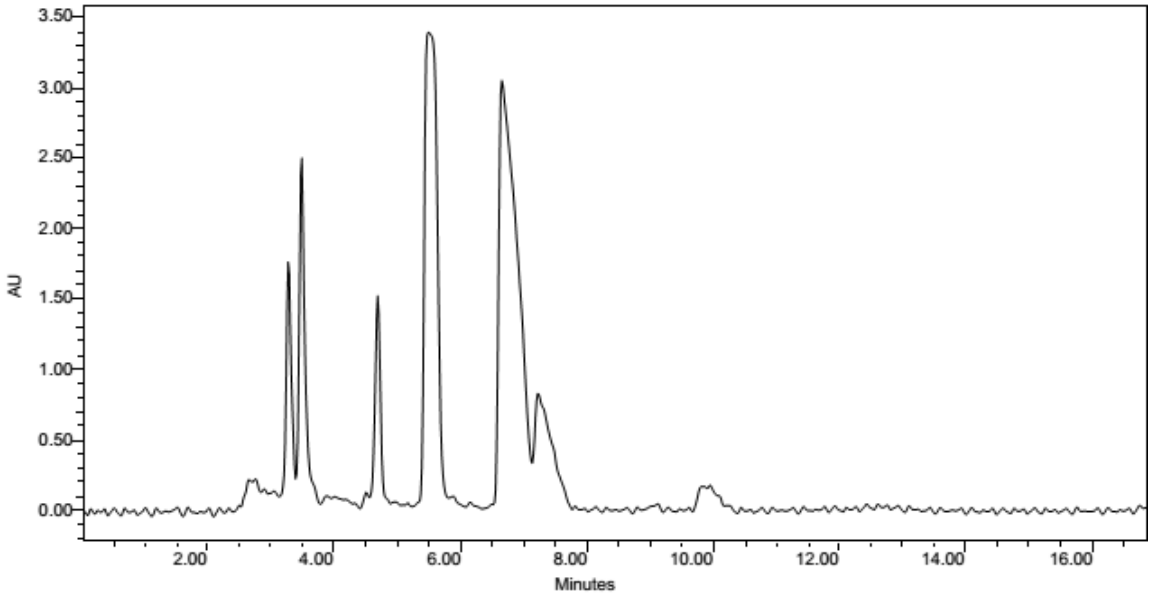
ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ

การแข็งตัวของไบโอดีเซลที่ -20 ^{0}ซ

ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชทุกชนิด แข็งตัวที่ -20 ^{0}ซ



รูปที่3 standard FAME(2 µg/ µl)



รูปที่4 fatty acid methyl ester ที่ตรวจพบใน ไบโอดีเซลบี100ผลิตจากน้ำมันปาล์ม โดยวิธี HPLC

การแข็งตัวและไม่แข็งตัวของน้ำมันที่อุณหภูมิต่างๆนั้น พบว่าขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของกรดไขมันที่มีอยู่ในน้ำมันนั้นๆ โดยคุณสมบัติของกรดไขมันจะขึ้นอยู่กับความยาวของโมเลกุล(chain length) และระดับความอิ่มตัวของกรดไขมันนั้นๆ เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัว สายสั้น จะช่วยไม่ให้น้ำมันแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ กรดไขมันไม่อิ่มตัวมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่ากรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายคู่ในโมเลกุล จะยิ่งมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่ากรดไขมันแบบใดๆ(http://www.natuurlijkerwijs.com/english/Fatty_acid_

metabolism.htm) ถ้ามีกรดไขมันที่มีจุดหลอมเหลวต่ำและมีปริมาณมาก น้ำมันนั้นๆจะไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ(Wanasundara, *et al*., 2005) กรดไขมันที่พบในน้ำมันปาล์ม และน้ำมันพืชต่างๆมีดังนี้(**Luković, *et.al*(2011)**

Oil	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	Others	Ratio SFA/UFA
Almond	6,5	0,5	1,4	70,7	20			3,5	0,9	7,9/91,2
Borage	12,9	0,2	4,3	19,1	39	18,7	0,3		2	17,5/82,5
Corn	11,7		1,9	25,2	60,5	0,5	0,2			13,8/86,2
Cotton seed	28,3		0,9	13,3	57,5					29,2/70,8
Jatropha	16,4	1	6,2	37	39,2		0,2			22,8/77,2
Olive	11,8	1,5	2,7	74,1	8,5	0,7	0,4	0,3		14,9/85,1
Palm	42,6	0,3	4,4	40, 5	10,1	0,2			1,9	47/51,1
Canola	3,5		0,9	64,4	22,3	8,2			0,7	4,4/94,9
Soybean	11,4		4,4	20,8	53,8	9,3	0,3			16,1/83,9
Sunflower	7,1		4,7	25,5	62,4		0,3			12,1/87,9

Table 3. Fatty acid composition for different vegetable oils (Robles–Medina et al., 2007)

กรดไขมันที่พบในน้ำมันรำข้าวมีดังนี้ C14:0 Myristic acid 0.6%, C16:0 Palmitic acid 21.5%, C18:0 Stearic acid 2.9%, C18:1 Oleic acid (an Omega 9 fatty acid) 38.4%, C18:2 Linoleic acid (LA, an Omega 6 fatty acid) 34.4% และ C18:3 **α**-Linolenic acid (ALA, an Omega 3 fatty acid) 2.2%(https://en.wikipedia. org/wiki /Rice_bran_oil)

2. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยวิธี chromatography

2.1 การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้สารเคมี

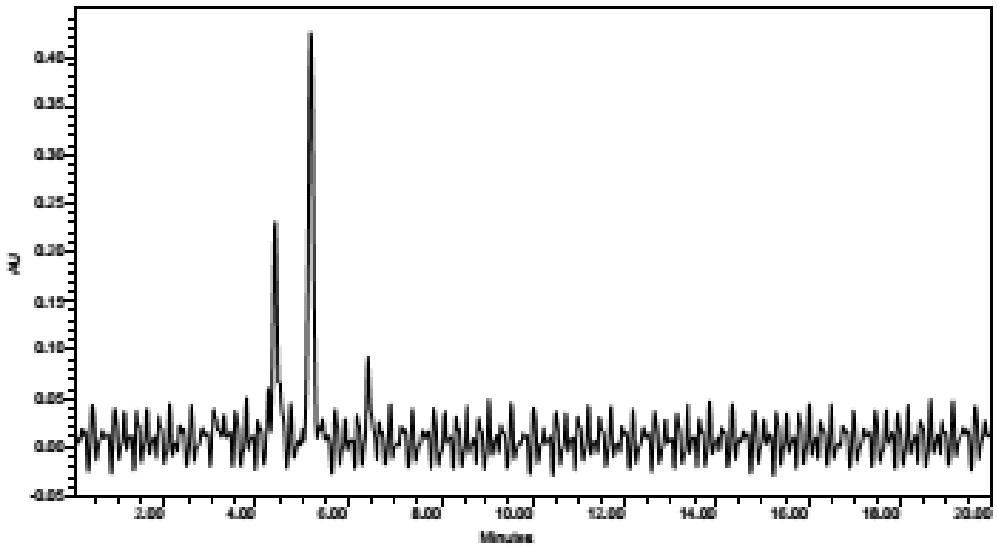
ก. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้ยูเรีย น้ำมันปาล์ม

ได้กรดไขมันที่แข็งตัวที่ 4 °ซ 22 มล.และได้กรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ 1 มล. ซึ่งน้อยมากไม่เพียงพอที่จะนำไปผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำได้ การผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำต้องการกรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำในสัดส่วนที่มากพอที่จะต้านการแข็งตัวของไบโอดีเซลได้ ในทางทฤษฎียูเรียจะชอบจับกับกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันสายยาว กรดไขมันที่เป็นทรานส์ และจะว่องไวต่อพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมัน นอกจากนี้การจับตัวของยูเรียกับกรดไขมันจะขึ้นอยู่กับ configuration of fatty acid moieties มากกว่า จุดเดือด หรือ การละลายของกรดไขมันในตัวทำละลาย(Wanasundara *et al*., 2005) อย่างไรก็ตามยูเรียไม่สามารถแยกกรดไขมันอิ่มตัว และไม่อิ่มตัวออกจากกันได้ทั้งหมด สัดส่วนร้อยละของกรดไขมันที่ตกตะกอนและไม่ตกตะกอนด้วยยูเรีย รายงานโดย Pongket *et al*.(2015) มีดังนี้

Type of fatty acids	Oil hydrolysates (%)	Non-urea complex fraction (%)	Urea complex fraction (%)
Palmitic acid (16:0)	5.63 § 0.57	1.10 § 0.46	11.62 § 1.25
Stearic acid (C18:0)	3.06 § 0.16	0.48 § 0.20	6.57 § 1.62

Oleic acid (C18:1)	47.73 § 0.25	27.91 § 3.20	53.70 § 2.60
Linoleic acid (C18:2)	43.48 § 0.12	70.07 § 3.05	27.73 § 0.76
Others	0.61 § 0.48	0.43 § 0.01	0.49 § 0.14

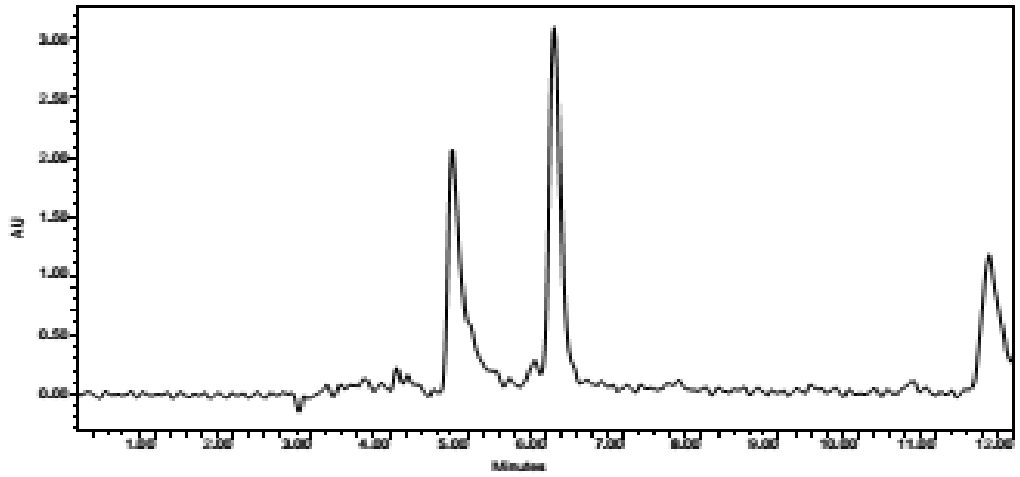
ดังนั้นจึงพอที่จะสรุปได้ว่า palmitic, stearic, oleic 18:1 *trans* และ linoleic acid ซึ่งมีอยู่ในสัดส่วนที่สูงในน้ำมันปาล์ม จะจับตัวกับยูเรีย แล้วตกตะกอนลงมามาก จึงได้กรดไขมันที่แข็งตัวที่ 4 °ซ เกือบทั้งหมด(รูปที่ 5)



รูปที่ 5 กรดไขมันสีแดงในน้ำมันปาล์มที่ตกตะกอนที่ 4 °ซ มีดังนี้ cis-9 Oleic methyl ester methyl methyl palmitate, methyl stearate และอื่นๆ

น้ำมันสบู่ดำ

ได้กรดไขมันอิ่มตัวแข็งตัวที่ 4 °ซ น้อย(**รูปที่6**) ได้กรดไขมันที่แข็งตัวที่ -20 °ซ เป็นส่วนใหญ่ และได้กรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ น้อยมาก



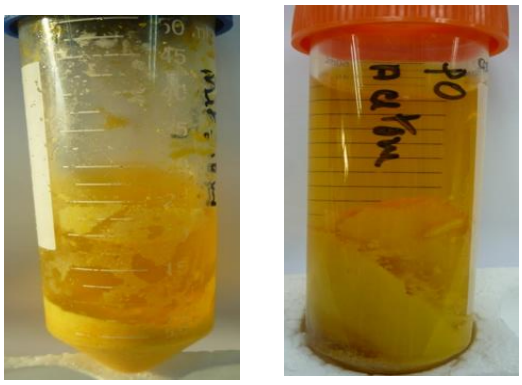
รูปที่6 กรดไขมันของน้ำมันสบู่ดำที่ตกตะกอนที่ 4 °ซ มีดังนี้ methyl palmitate, methyl stearate และ อื่นๆ

เครื่อง HPLC เสีย ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบชนิดของกรดไขมันที่ปรากฏในทุกตัวอย่างได้ และการตรวจสอบด้วยวิธีการ Thin Layer Chromatography ก็ไม่สามารถกระทำได้ เนื่องจากขาดสารเคมีบางตัว เช่น silver nitrate ซึ่งมีราคาแพงและมีความเป็นพิษสูง และสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบกรดไขมัน เช่น primulin ซึ่งไม่มีจำหน่าย

ข. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้เมทธานอล

ได้กรดไขมันที่แข็งตัวที่ 4 °ซ เป็นส่วนใหญ่(รูปที่7) และได้กรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ น้อยมาก (มีปริมาณแค่ติดอยู่ที่ก้นภาชนะบางๆ เมื่อระเหยเอาเมทธานอลออกไป) ซึ่งมีสาเหตุมาจาก เกิดการแข็งตัวของน้ำมันภายใน 3 ชม. ที่ -20 °ซ ทำให้กรดไขมันละลายออกมาน้อย ซึ่งถ้าพิจารณาจากจุดหลอมละลาย(melting point) ของกรดไขมัน จะพบว่าที่ 50 °ซ กรดไขมันที่ไม่มีการละลาย คือ Palmitic และ Stearic และที่ละลายออกมาคือ Oleic, Linoleic และ Linolenic เมื่อนำไปไว้ที่ 4 °ซ จะได้ตะกอนของกรด Palmitic, Stearic และ Oleic (http://chemistry. elmhurst.edu/vchembook/551fattyacids.html) ส่วนที่ -20 °ซ กรดไขมันที่ยังคงละลายอยู่ในเมทธานอล คือ Linolenic และ Linoleic เพราะว่าถ้าไม่มียูเรีย polyenoic compounds จะไม่ตกตะกอนลงมา(Wanasundara *et al*., 2005) งานวิจัยนี้สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ เรื่อง การละลายของกรดไขมันต่างๆในสารละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิต่างๆ(ก. ของกรดไขมัน/ 100 ก. สารละลาย) ดังนี้ ในสารละลายเมทธานอล palmitic และ stearic ละลายได้น้อยมาก(1.30-0.16 และ 0.26-0.031 ตามลำดับ) ที่10 ถึง -20 °ซ oleic 18:1 *cis* ละลายได้ 4.02 ที่ -20 °ซ ส่วน elaidic 18:1 *trans* ละลายได้น้อย(0.0-0.48) ที่ 0 ถึง -20 °ซ และ linoleic 18:2 *cis* ละลายได้(3.10) ที่ -50 °ซ(Wanasundara *et al*., 2005) สรุปได้ว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

Table of Fatty Acids		
Acid Name	Structure	Melt Point
SATURATED		
Lauric	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	+44
Palmitic	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	+63
Stearic	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	+70
UNSATURATED		
Elaidic	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	+16
Linoleic	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$	-5
Linolenic	$CH_3CH_2(CH=CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$	-11
Arachi-donic	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$	-50



ก. **-.**

รูปที่ 7 ก. การละลายของน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยด้วยไลเปสในเมทธานอล (น้ำมันปาล์ม 5 มล. + เมทธานอล 10 มล.) น้ำมันปาล์มละลายได้น้อย ยังคงเหลือน้ำมันเท่าเดิมคือ 5 มล. ข. การละลายของน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยด้วยไลเปสในอะซิโตน น้ำมันปาล์มละลายได้น้อย ยังคงเหลือน้ำมันเท่าเดิม

การทดลองที่3 การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดเยือกแข็งต่ำโดยใช้กรดไขมันอัตราส่วนต่างๆ

วิธีการนี้ไม่สามารถกระทำได้ เนื่องจากปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นต่อการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดเยือกแข็งต่ำนั้นมีปริมาณน้อย สกัดได้น้อย เพราะมักจะสูญหายไปในระหว่างการสกัดแต่ละขั้นตอน และมักติดกับภาชนะบรรจุ ต้องใช้สารเคมีอันตรายเช่น อะซีโตนหรือเฮกเซนชะล้างออกมา ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเทคโนโลยีสำหรับแนะนำได้ เนื่องจากสารเคมีมีราคาแพงและมีอันตรายสูงและได้ผลผลิตน้อย ในกรณีของน้ำมันสบู่ดำ ปัจจุบันเกษตรกรเลิกปลูกแล้ว จึงหาน้ำมันสบู่ดำได้ยาก นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองใช้กรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่ที่ -20 °ซ ไปผลิตไบโอดีเซลเพื่อทดสอบการแข็งตัวของน้ำมันที่ -20 °ซ ผลปรากฏว่า

ไบโอดีเซลที่ได้สูญหายไปในขั้นตอนการล้าง เป็นน้ำขุ่นขาว ปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ต้องใช้เวลาในการทดลองเพิ่มเติมมาก ไม่สามารถดำเนินให้สำเร็จได้ในระยะเวลาอันสั้น ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นยุติการทดลอง

การทดลองที่4 การศึกษาการแยก methyl fatty acid ester ชนิดต่างๆที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากส่วนผสมน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้ความเย็น(crystralization)

ผลการทดลองพบว่า

1. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มจะแข็งตัวทั้งหมดที่ 4 ^{0}ซ ไม่แยกชั้น จึงไม่สามารถแยก methyl fatty acid ester ชนิดต่างๆได้

2. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ และไม่แยกชั้น หรือ ตกตะกอนที่ 4 ^{0}ซ แต่แข็งตัวทั้งหมดที่ -20 ^{0}ซ ทำให้ไม่สามารถแยก methyl fatty acid ester ชนิดต่างๆได้

3. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ แข็งตัวเกือบทั้งหมดที่ 4 ^{0}ซ มีส่วนใสปะปนอยู่ แต่มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณทั้งหมด และแข็งตัวทั้งหมดที่ -20 ^{0}ซ

4.สรุปได้ว่า วิธีการนี้ไม่ใช่วิธีการที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองที่จะตามมา

5.จากผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่าถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำจำเป็นต้องผสมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่ำ เช่นผสมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น

6. จากค่า melting point ของ methyl ester ของกรดไขมันแต่ละชนิด(http://biorefinery.utk.edu/technical_reviews/BAsic%20BioDiesel%20Properties.pdf) ชี้ให้เห็นว่า ไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ จำเป็นต้องมีปริมาณ Methyl palmitate และ Methyl stearate ต่ำ ดังเช่นไบโอดีเซลที่ผลิตจากถั่วเหลือง เป็นต้น และถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำมากๆ จำเป็นต้องแยกเอา Methyl palmitate และ Methyl stearate ออกให้หมด แต่มีข้อเสียคือ จะมี Cetane number ลดลงมาก จะทำให้การสตาร์ทติดยาก และสิ้นเปลืองน้ำมัน Cetane number ของดีเซลเบอร์สองเท่ากับ 40-55

Fatty acid Methyl ester	Formula	Acronym	Molecular weight	Melting point [°C]	Cetane number
Palmitic acid Methyl palmitate	C16H32O2 C17H34O2	C16:0	256.4 270.5	63-64 30.5	--- 74.5
Stearic acid Methyl stearate	C18H36O2 C19H38O2	C18:0	184.5 198.5	70 39	--- 86.9
Oleic acid Methyl oleate	C18H34O2 C19H36O2	C18:1	282.5 296.5	16 -20	--- 47.2 - 55
Linoleic acid Methyl linoleate	C18H32O2 C19H34O2	C18:2	280.5 294.5	-5 -35	--- 28.5-42.2
Linolenic acid Methyl	C18H30O2	C18:3	278.4	-11	---

linolenate	C19H32O2		292.5	-52/-57	20.6-22.7

การทดลองที่5 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

ก. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

ผลการทดลองพบว่า

1. สามารถปรับปรุงคุณภาพไบโอดีเซลให้มีจุดขุ่นที่ 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ(รูปที่11) ซึ่งดีกว่าเดิมที่มีค่าจุดไหลเทอยู่ที่ 11^{0}ซ(มัทนาและวิภา, 2558) และได้มาตรฐานไบโอดีเซลบี100 ตามมาตรฐานสากล ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐาน อาจจะมีสาเหตุมาจาก ในขั้นตอนการล้างแยกน้ำมันออกมาจากส่วนผสมของยูเรียและเมทธานอลนั้น ยังมีน้ำมันไม่อิ่มตัวบางส่วนที่หลงเหลืออยู่ในน้ำล้าง(รูปที่10) น้ำมันไม่อิ่มตัวนี้ต้องการเวลา ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการแยกตัวออกมาจากน้ำล้างมากกว่าปกติทั่วไป บางครั้งต้องใช้เวลานานถึง 3-5 วันจึงจะแยกตัวออกมาหมด แต่เนื่องจากระยะเวลาของการทดลองมีจำกัด จึงไม่เก็บผลผลิตทั้งหมด จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของไบโอดีเซลบี100ที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มมีค่าเท่ากับ 98.87 %(มัทนา และวิภา, 2558; รูปที่) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นเพียงงานวิจัยขั้นแรก ยังต้องมีการแก้ไขปรับปรุงต่อไป

2. สาเหตุที่มีกรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเตอร์**(** มีจุดหลอมละลาย -52/-57) ทั้งในไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ นั้น พบว่าเกิดจาก ในขั้นตอนการกรองที่ดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง(รูปที่ 4 และ 5) จำเป็นต้องรีบกรองเพื่อไม่ให้น้ำมันที่ตกตะกอนได้ละลายตกลงไป จึงทำให้มีส่วนใสที่ไม่ตกตะกอนที่ -20 ^{0}ซ ปะปนไปมาก ซึ่งเป็นผลดี เพราะจากรายงานของ Choo Yuen *et al.*(2009) พบว่า ถ้าไบโอดีเซลมี methyl oleate{ C18:1 (>98 % purity) มีจุดไหลเท -18 องศาเซลเซียส } และ methyl linoleate{ C18:2 (>98 % purity) มีจุดไหลเท -39 องศาเซลเซียส } อยู่ จะทำให้ไบโอดีเซลไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำช่วยแก้ปัญหาการแข็งตัวของไบโอดีเซลได้ การมีกรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเตอร์**(** มีจุดหลอมละลาย -52/-57) ก็น่าจะให้ผลทำนองเดียวกัน

3. น้ำมันที่ตกตะกอนที่ -20 ^{0}ซ มีมากกว่าหรือใกล้เคียงกับที่ 4 ^{0}ซ

4. มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้($p<0.01$) และค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ มากที่สุดคือ 1:2 ได้ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ และ 6 ^{0}ซ อย่างละ 1 ส่วน (ตารางที่1) และจะใช้สัดส่วนนี้ในการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

5. **ผลวิเคราะห์คุณภาพไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ มีดังนี้**

รายการทดสอบ	**วิธีทดสอบ**	**ไบโอดีเซล**		**หน่วย**
		น้ำมันไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิ 6 ^{0}ซ	**ASTM specification for biodeisel B100**	
1. ค่าความหนาแน่น ณ. 15 ^{0}ซ (density at 15 ^{0}ซ)	ASTMD 4052-16	879.50	860-900	กก./ลูกบาศก์เมตร
2. ความหนืดคิเนมาติก(จลน์) ณ. 40 ^{0}ซ (viscosity at 40 ^{0}ซ	ASTM D 445-17	4.370	3.5-5.0	เซนติสโตกส์ (cSt) (ตารางมม./วินาที)
3. จุดขุ่น	ASTM D5771-15	6.0	Max. 18	^{0}ซ
4. จุดวาบไฟ (flash point)	ASTM D93-16a	174.0	Min 120 Thai Min 130 USA	^{0}ซ
5.ค่าความเป็นกรด (acid number)	ASTM D664-11a	0.17	Max 0.50	มก. KOH/ก. น้ำมัน
6. การกัดกร่อนทองแดง ที่ 50 ^{0}ซ 3 ชม. (copper strip corrosion)	ASTM D 130-12	1A	No.1 max	-
7. ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester)	EN14103:2011	90.50	96.5	%โดยน้ำหนัก
8. กรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเตอร์	EN14103:2011	2.1	-	-
9. เสถียรภาพต่อการเกิด ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่110 ^{0}ซ (oxidation stability at 110 ^{0}ซ)	EN15751-14	5.3	ไม่สูงกว่า 25	ชม.
10. Micro carbon residue(กากถ่าน)	ASTM D 4530-15	<0.10	Max. 0.30	% wt
11. sulphated ash(เถ้าซัลเฟต)	ASTM D 874-13a	<0.005	Max. 0.02	% โดยน้ำหนัก
12. ปริมาณน้ำและตะกอน (water and sediment)	ASTM D 482-13	<0.005	Max. 0.2	%vol.

13. สิ่งปนเปื้อนทั้งหมด	EN12662-1998	<24		mg./kg.
14. ค่าไอโอดีน(วิจล์)	EN 14111-03	89.4	ไม่เกิน 120	กรัมไอโอดีน/ 100 กรัม

6. **ผลวิเคราะห์คุณภาพไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ มีดังนี้**

รายการทดสอบ	**วิธีทดสอบ**	**ไบโอดีเซล**		**หน่วย**
		น้ำมันไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิ -12 ^{0}ซ	**ASTM specification for biodeisel B100**	
1. ค่าความหนาแน่น ณ. 15 ^{0}ซ (density at 15 ^{0}ซ)	ASTMD 4052-16	884.1	860-900	กก./ลูกบาศก์เมตร
2. ความหนืดคิเนมาติก(จลน์) ณ. 40 ^{0}ซ (viscosity) at 40 ^{0}ซ	ASTM D 445-17	4.115	3.5-5.0	เซนติสโตกส์ (cSt) (ตาราง มม./วินาที)
3. จุดขุ่น	ASTM D5771-15	-12	Max. 18	^{0}ซ
4. จุดวาบไฟ (flash point)	ASTM D93-16a	170.0	Min 120 Thai Min 130 USA	^{0}ซ
5.ค่าความเป็นกรด (acid number)	ASTM D664-11a	0.36	Max 0.50	มก. KOH/ก. น้ำมัน
6. การกัดกร่อนทองแดง ที่ 50 ^{0}ซ 3 ชม. (copper strip corrosion)	ASTM D 130-12	1A	No.1 max	-
7. ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester)	EN14103:2011	94.2	96.5	%โดยน้ำหนัก
8. กรดลิโนเลนิกเมทิล เอสเตอร์	EN14103:2011	3.5	-	-
9. เสถียรภาพต่อการเกิด ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่110 ^{0}ซ (oxidation stability at 110 ^{0}ซ)	EN15751-14	3.2	Max. 25	ชม.
10. Micro carbon residue (กากถ่าน)	ASTM D 4530-15	<0.10	Max. 0.30	% wt
11. sulphated ash(เถ้าซัลเฟต)	ASTM D 874-13a	<0.005	Max. 0.02	% โดยน้ำหนัก
12. ปริมาณน้ำและตะกอน (water and sediment)	ASTM D 482-13	<0.005	Max. 0.2	%vol.

13. สิ่งปนเปื้อนทั้งหมด	EN12662-1998	<24		mg./kg.
14. ค่าไอโอดีน(วิจล์)	EN 14111-03	128.8	ไม่เกิน 120	กรัมไอโอดีน/ 100 กรัม

ตารางที่1 ค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้จากการ**แยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย**

กรรมวิธี	ranks	ค่าเฉลี่ย
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**ถั่วเหลือง** 1:1/2 (V:V)	4	0.778 c
2.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**ถั่วเหลือง** 1:1 (V:V)	5	0.758 c
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**ถั่วเหลือง** 1:2 (V:V)	1	1.012 a
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**ถั่วเหลือง** 1:3 (V:V)	3	0.802 c
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**ถั่วเหลือง** 1:4 (V:V)	2	0.932 b
	ค่าเฉลี่ย	0.856

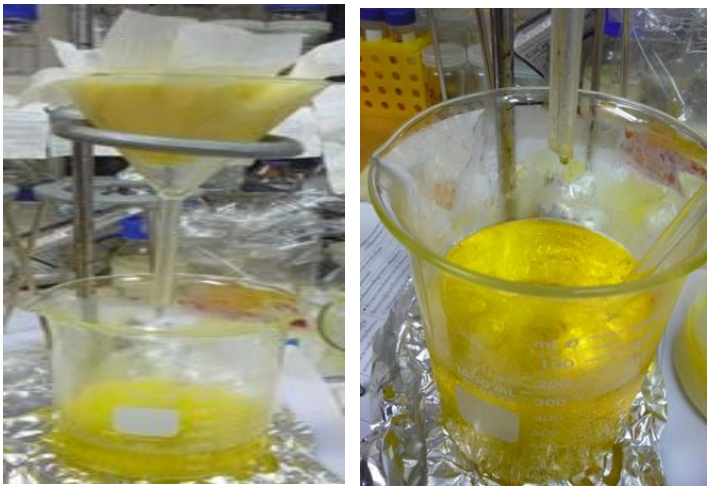
Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

cv. = 5.5%, LSD.(p ≤ 0.05) = 0.063, **LSD.(p ≤ 0.05)** = 0.087

ก.

ข.

รูปที่8 ก. ตะกอนน้ำมันที่ตกได้ที่ 4 ^{0}ซ ข. ตะกอนน้ำมันที่ตกได้ที่ -20 ^{0}ซ



ก **ข**

รูปที่9 ก การกรองตะกอนน้ำมันที่แข็งตัวที่ -20 ^{0}ซ ข น้ำมันที่ไม่แข็งตัวที่ -20 ^{0}ซ

ก. **ข.**

รูปที่ 10 การล้างแยกน้ำมันที่ตกตะกอนได้ที่ 4(ก) และ -20 ^{0}ซ (ข)

ก ข

รูปที่ 11 ก ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่นที่ 6 ^{0}ซ ข ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่นที่ -20 ^{0}ซ

ข. **การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ยูเรีย**

มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้($p<0.01$) และค่าสัดส่วนที่ให้ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ มากที่สุดคือ 1:4(1.026) และ 1:3(0.998) ตามลำดับ (ตารางที่2)

ตารางที่2 ค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้จากการ**แยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ยูเรีย**

กรรมวิธี	ranks	ค่าเฉลี่ย
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 1/2 (V : V)	3	0.798 b
2.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 1 (V : V)	4	0.788 b
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 2 (V : V)	5	0.710 c
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 3 (V : V)	2	0.998 a
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอ	1	1.026 a

ดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 4 (V : V)		
	ค่าเฉลี่ย	**0.864**

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

cv. = 5.0%, LSD(p ≤ 0.05) = 0.058, LSD(p ≤ 0.01) = 0.080

ค. **การศึกษาการแยก methyl fatty acid ester ในส่วนผสมของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว**

มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้(p<0.01) และค่าสัดส่วนที่ให้ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ มากที่สุดคือ 1:4 ได้ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ 1.8 เท่าของ 6 ^{0}ซ (ตารางที่3)

ตารางที่3 ค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้จากการ**แยก methyl fatty acid ester ในส่วนผสมของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว**

กรรมวิธี	ranks	ค่าเฉลี่ย
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**รำข้าว** 1: 1/2 (V: V)	5	0.518 d
2.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**รำข้าว** 1: 1 (V : V)	4	0.880 c
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**รำข้าว** 1: 2 (V : V)	2	1.170 b
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**รำข้าว** 1: 3 (V : V)	3	1.122 b
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมัน**รำข้าว** 1: 4 (V : V)	1	1.800 a
	ค่าเฉลี่ย	1.098

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

cv = 5.2%, LSD. (p ≤ 0.05) = 0.077, LSD. (p ≤ 0.01) = 0.106

การใช้น้ำมันรำข้าวดิบมาผลิตเป็นไบโอดีเซลมีข้อจำกัด คือ น้ำมันไม่อิ่มตัว ไม่ค่อยแยกตัวออกมาจากน้ำล้างและมักจะสูญเสียไปในขั้นตอนการล้าง ทำให้ได้ผลผลิตเป็นไบโอดีเซลน้อยเพียง 68.5 % นอกจากนี้ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว จะตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทิ้งไว้นานๆ และยังทำให้ไบโอดีเซลในอัตราส่วนผสมต่างๆแข็งตัวในภายหลังอีกด้วย

การทดลองที่6 การทดลองใช้น้ำมันไบโอดีเซลกับเครื่องยนต์

1. สามารถผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ ได้ตัวอย่างละ 6.5 ล. แต่ไม่ได้ทดสอบกับเครื่องยนต์เนื่องจากไม่มีเครื่องยนต์ที่จะใช้ทดสอบ และหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบ อยู่ในระหว่างการปรับปรุงมาตรฐานการทดสอบและเครื่องมือ

2.ดีเซลเกรด1(ปตท. พรีเมียมเกรด) ตกตะกอนเล็กน้อย ประมาณ 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 3 วัน ที่ 2- 4 ^{0}ซ แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 ^{0}ซ และเมื่อตรวจสอบที่ 15 และ30 วัน พบว่าทั้งที่ 15 และ30 วัน ดีเซลเกรด1ตกตะกอน 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 15 และ 30 วัน(รูปที่8ก)

3. ดีเซลเกรด2 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. แต่ไม่แข็งตัว ที่ 2- 4 ^{0}ซ ในระยะเวลา 3 วัน แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 ^{0}ซ และเมื่อตรวจสอบที่ 15 และ 30 วัน พบว่า ตกตะกอนเท่าเดิม ทั้งนี้เพราะว่าดีเซลเกรด2มีจุดขุ่นที่ -15 ถึง 5 ^{0}ซ และจุดไหลเทที่ -35 ถึง -15 ^{0}ซ(มงคล, 2557) จึงทำให้น้ำมันเป็นไขตกตะกอนลงมา(รูปที่ 8 ข)

4. ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ แข็งตัวที่ 2- 4 ^{0}ซ ทันที

5. ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ใส ไม่แข็งตัวและไม่ตกตะกอนที่ 2- 4 ^{0}ซ

6. ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ ผสมกับ ดีเซลเกรด1และ2 ทุกอัตรา แข็งตัวทันที ที่ -20^{0}ซ

7. ผลการทดลอง การผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ กับดีเซลเกรด1 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด1 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ พบว่าไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด1 อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ไม่ตกตะกอน ไม่จับตัวเป็นก้อนที่ 2-4 ^{0}ซ ในระยะเวลา 5 วัน แต่ที่อัตรา 50:50 ตกตะกอนบางส่วนติดก้นหลอดทดลองขนาด 40 มล.(หรือตกตะกอนประมาณ 5 มล. ใน 100 มล.) ส่วนที่อัตราตั้งแต่ 60:40 ถึง 90:10 ตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนทั้งหมด และเมื่อตรวจสอบการตกตะกอนที่ 15 และ 30 วัน พบว่าที่ 15 วัน อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนเล็กน้อยพอมองเห็นได้ อัตรา 50:50 ตกตะกอนเท่าเดิม ส่วนที่ 30 วัน อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนประมาณ 1 มล. ใน 40 มล. อัตรา 50:50 ตกตะกอนเท่าเดิม ตะกอนที่ตกลงมาคือตะกอนของดีเซล สรุปได้ว่า อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 40:60 ระยะเวลาการใช้งานภายในเวลา 15 วัน

8. ผลการทดลอง การผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ กับดีเซลเกรด2 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด2 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ พบว่า ไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด2 อัตรา 10:90 ถึง 50:50 ไม่ตกตะกอน ไม่จับตัวเป็นก้อนที่ 2-4 ^{0}ซ ในระยะเวลา 5 วัน แต่ที่อัตรา 60:40 ตกตะกอนบางส่วน ปริมาตร 7 มล. ใน 40 มล. อัตราตั้งแต่ 70 :30 ถึง 90 :10 ตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนทั้งหมด และเมื่อตรวจสอบการตกตะกอนที่ 15 และ 30 วัน พบว่า อัตรา 10:90 ถึง 50:50 ตกตะกอนมากเท่าดีเซลเกรด2 คือ 6-7 มล.ใน 40 มล. ตะกอนที่ตกลงมาคือตะกอนของ

ดีเซล สรุปได้ว่า อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 50:50 ในระยะเวลา 5 วัน ถ้าเกินกว่าระยะเวลา 5 วัน ใช้ไม่ได้ในทุกอัตรา

9. ผลการทดลอง การผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ กับดีเซลเกรด1 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด1 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 2-4 ^{0}ซ ในระยะเวลา 5 วัน ไม่มีการตกตะกอนในทุกอัตรา น้ำมันใส แต่เมื่อตรวจสอบการตกตะกอนที่ 15 และ 30 วัน พบว่าที่ 15 วัน อัตรา 10:90 ถึง 20:80 ตกตะกอนประมาณ 1 มล. ใน 40 มล. ส่วนอัตราอื่นๆไม่ตกตะกอน ส่วนที่ 30 วัน พบว่า อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนประมาณ 2.5 มล. ใน 40 มล. อัตรา 50:50 ตกตะกอนเล็กน้อยแค่ติดก้นหลอดทดลอง อัตรา 60:40 ถึง 90:10 ไม่ตกตะกอน จะพบว่าในส่วนผสมยิ่งมีไบโอดีเซลบี100มากเท่าไร น้ำมันจะใส ไม่ตกตะกอน ตะกอนที่ตกลงมาคือตะกอนของดีเซล สรุปได้ว่า อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 50:50 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน

10. ผลการทดลอง การผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ กับดีเซลเกรด2 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด2 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ พบว่าที่ 2-4 ^{0}ซ ในระยะเวลา 5 วัน ไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด2 ที่อัตรา 10:90 ถึง 50:50 น้ำมันผสมเริ่มขุ่นแต่ไม่ตกตะกอน ส่วนอัตรา 60:40 ถึง 90:10 น้ำมันใส ไม่ตกตะกอน แต่เมื่อตรวจสอบการตกตะกอนที่ 15 และ30 วัน พบว่าที่ 15 วัน อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. และอัตรา 50:50 และ 60:40 ตกตะกอนเล็กน้อยแค่เห็นติดอยู่ก้นหลอดทดลองประมาณ 0.2 มล. ใน 40 มล. ส่วนอัตราอื่นๆใส ไม่ตกตะกอน ส่วนที่ 30 วัน พบว่า อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. อัตรา 50:50 ถึง 60:40 ตกตะกอนประมาณ 2.5 มล. ใน 40 มล. อัตรา 70:30 ตกตะกอนประมาณ 1 มล. ใน 40 มล. อัตรา 80:20 ถึง 90:10 ใส ไม่ตกตะกอน ตะกอนที่ตกลงมาคือตะกอนของดีเซล(รูปที่8ค) สรุปได้ว่า อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 80:20 ถึง 90:10 มีระยะการใช้งาน 30 วัน

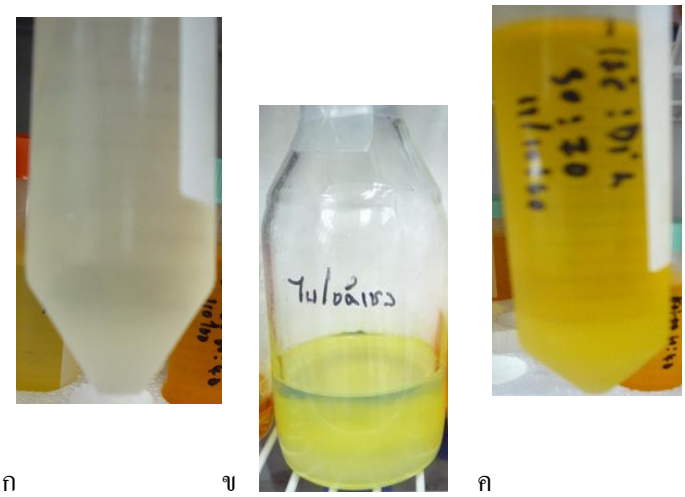
11. ไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ และ 6 ^{0}ซ มีค่าความหนืดอยู่ที่ 4.115 และ 4.370 เซนติสโตกส์ (cSt) (ตาราง มม./วินาที) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน 3.5-5.0 เซนติสโตกส์ (cSt) (ตาราง มม./วินาที) จึงไม่มีผลต่อระบบหัวฉีดและการก่อตัวของคราบยางเหนียวที่หัวฉีด

12. ผลการวิเคราะห์คุณภาพของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ มีค่า Micro carbon residue(กากถ่าน), sulphated ash(เถ้าซัลเฟต) ปริมาณน้ำและตะกอน (water and sediment) และสิ่งปนเปื้อนทั้งหมด มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานมาก บ่งชี้ว่า ไบโอดีเซลที่ผลิตได้นี้ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม สามารถใช้กับเครื่องยนต์ได้โดยไม่ไปมีผลเสียต่อระบบเชื้อเพลิง ปั๊มน้ำมันและไส้กรองและสภาพแวดล้อม และไม่ก่อให้เกิดภาวะฝนกรด(มีค่าเถ้าซัลเฟต น้อยกว่า 0.005 โดยค่ามาตรฐานอยู่ที่ไม่เกิน 0.2) และสามารถใช้ในสภาพที่มีอากาศเย็นได้ อย่างไรก็ตามมลพิษที่เกิดจากค่าออกไซด์ของไนโตรเจนจำเป็นต้องตรวจวัดต่อไป

13.ค่าไอโอดีน(วิจล์)ของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ค่อนข้างสูง 128.8 กรัมไอโอดีน/100 กรัม (ไม่เกิน 120) ทำให้ไบโอดีเซลที่ได้ ค่อนข้างง่ายต่อการถูกออกซิไดซ์เมื่อสัมผัสอากาศ และเกิดปฏิกิริยา

พอลิเมอไรซ์ได้ที่อุณหภูมิสูง ทำให้ไบโอดีเซลเสื่อมสภาพเป็นสารเหนียว ดังนั้นการป้องกันอาจทำได้โดยการเก็บน้ำมันไว้ในที่ที่ไม่สัมผัสกับออกซิเจนหรืออนุมูลอิสระอื่นๆ และเก็บในที่ที่เย็นและไม่มีแสงผ่าน แต่เท่าที่ตรวจสอบการเสื่อมสภาพเป็นสารเหนียวของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ที่อุณหภูมิห้อง 28-30 ^{0}ซ ในสภาพปิดฝาสนิท ในขวดแก้วใส เป็นเวลา 8 เดือน ไบโอดีเซลยังคงมีสภาพปกติเหมือนเดิม คือ ใส ไม่หนืด ไม่ตกตะกอน Leung *et al* (2006 , กรดไขมันอิสระ digi.library.tu.ac.th/thesis/en/0232/10CHAPTER_2.pdf) ได้ศึกษาคุณภาพน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันเมล็ดเรป และการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิและสภาวะที่แตกต่างกัน เช่นที่อุณหภูมิห้องและที่ 40 ^{0}ซ ในภาชนะปิดสนิท หรือในสภาพที่สัมผัสกับอากาศ หรือในสภาพที่มีหรือไม่มีความชื้น ผลการทดลองพบว่า ถ้าอุณหภูมิการเก็บรักษายิ่งสูงประกอบกับสภาวะที่สัมผัสกับอากาศ ยิ่งทำให้อัตราการเสื่อมสภาพของน้ำมันเพิ่มสูงขึ้น แต่อุณหภูมิหรือการสัมผัสกับอากาศอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ส่งผลน้อยมากต่อการเสื่อมสภาพของน้ำมัน แต่ บเอดและคณะ(2007)(กรดไขมันอิสระ digi.library.tu.ac.th/thesis/en/0232/10CHAPTER_2.pdf) รายงานว่า ในช่วงระยะเวลา 0-12 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงมากนัก ระหว่างตัวอย่างที่ทำการเก็บรักษาในสภาพที่มีแสงผ่านกับไม่มีแสงผ่าน แต่หลังจากนั้นการเปลี่ยนแปลงก็สังเกตได้อย่างชัดเจน

14.การทดลองนี้ไม่ได้รายงานค่าซีเทน(ค่าที่บ่งบอกถึงความสามารถในการจุดติดไฟของน้ำมันไบโอดีเซล) และค่าอื่นๆ เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์อยู่ในระหว่างการปรับปรุง หรือหยุดให้บริการตรวจวิเคราะห์ แต่หากเทียบเคียงผลวิเคราะห์กับผลงานวิจัยที่ผ่านมามีค่าใกล้เคียงกัน



ก ข ค

รูปที่ 12 ก ตะกอนดีเซลที่ตกลงมาในน้ำมันดีเซลเกรด1 ข ตะกอนดีเซลที่ตกลงมาในน้ำมันดีเซลเกรด2 ค ตะกอนดีเซลที่ตกลงมาในน้ำมันผสมไบโอดีเซลและดีเซล

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สามารถผลิตไลเปสในถังหมักโดยการใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO_2 (ปริมาณออกซิเจน) 80 % ในระยะเวลา 6 ชม. ได้ไลเปสความเข้มข้น 30 มก/มล. ไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าวอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด ตกตะกอนน้อยมากเมื่อทิ้งไว้นานๆ และเมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ได้เป็นไบโอดีเซลทั้งหมด ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมา ได้ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 93.3, 86.7, 75.0 และ 68.5 ตามลำดับ น้ำมันปาล์มแข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ น้ำมันถั่วเหลือง เหลว ใส ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ น้ำมันสบู่ดำ มีทั้งหนืดข้น ไปจนถึงแข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ น้ำมันรำข้าว หนืดข้นมาก ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ -20 ^{0}ซ ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง ไม่แข็งตัวที่ 4 ^{0}ซ มีลักษณะใส ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ แข็งตัวไม่สมบูรณ์ที่ 4 ^{0}ซ จับกันเป็นก้อน ไม่แข็งตัว มีน้ำมันใสปน ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชทุกชนิด แข็งตัวที่ -20 ^{0}ซ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ จำเป็นต้องผสมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่ำ ถ้าใช้น้ำมันพืชเดี่ยวจะได้ผลผลิตน้อย ยากต่อการปฏิบัติ และคุณสมบัติของไบโอดีเซลอาจจะไม่ได้ตามมาตรฐาน สามารถปรับปรุงคุณภาพไบโอดีเซลให้มีจุดขุ่นที่ 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ ซึ่งดีกว่าเดิมที่มีค่าจุดไหลเทอยู่ที่ 11 ^{0}ซ และได้มาตรฐานไบโอดีเซลบี100 ตามมาตรฐานสากล มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้($p<0.01$) และค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ และ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ มากที่สุดคือ 1:2, 1:4และ 1:3, 1:4 ตามลำดับ ดีเซลเกรด1(ปตท. พรีเมียมเกรด) ตกตะกอนเล็กน้อย ประมาณ 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน ที่ 2- 4 ^{0}ซ แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 ^{0}ซ ดีเซลเกรด2 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. แต่ไม่แข็งตัว ที่ 2- 4 ^{0}ซ ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 ^{0}ซ ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ แข็งตัวที่ 2- 4 ^{0}ซ ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ใส ไม่แข็งตัวและไม่ตกตะกอนที่ 2- 4 ^{0}ซ ไบโอดีเซลบี100ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ และ -12 ^{0}ซ ผสมกับ ดีเซลเกรด1และ2 ทุกอัตรา แข็งตัวทันที ที่ -20^{0}ซ อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น 6 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 50:50 ในระยะเวลา 5 วัน ถ้าเกินกว่าระยะเวลา 5 วัน ใช้ไม่ได้ในทุกอัตรา อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 50:50 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดขุ่น -12 ^{0}ซ ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 80:20 ถึง 90:10 มีระยะการใช้งาน 30 วัน

11.การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ไบโอดีเซลที่ได้ สามารถนำไปใช้กับเครื่องจักรกลการเกษตร และเครื่องยนต์ดีเซลทั่วไป ในสภาพอากาศเย็นและสภาพอากาศปกติ และสามารถลดมลพิษได้ ซึ่งถ้าดีเซลไม่ตกตะกอนลงมาก่อน จะสามารถเพิ่มอัตราส่วนของไบโอดีเซลและระยะเวลาการใช้งานได้มากกว่าที่ได้รายงานไว้

2. สามารถนำกรรมวิธีการผลิตไปเผยแพร่ใช้กับกลุ่มเกษตรกร และผู้สนใจ เพราะเป็นกรรมวิธีที่ง่าย ประหยัด

12. เอกสารอ้างอิง

กัญจนา บุณยเกียรติ. 2544 . **ไบโอดีเซล : พลังงานทางเลือกใหม่สำหรับเครื่องยนต์ดีเซล *ว. วิทยาศาสตร์.* 148-152.**

นิรนาม. 2559 **.** อวสานรถดีเซล. หนังสือพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ. 36(3).197.

มัทนา และวิภา, 2558**.** การศึกษาไลเปสของราและแบคทีเรีย และการใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอดีเซล.ใน: รายงานโครงการวิจัยที่สิ้นสุดปี **25**58.สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร**.**

มงคล สมประสิทธิ์. 2557. การทดสอบไบโอดีเซลที่ทำจากน้ำมันพืชใช้แล้วในเครื่องยนต์คอมมอนเรล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล. คณะวิศวกรรมศาสตร์. ม.เทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. 113 น.

วัชระ เถื่อนถ้ำ และ พัชรินทร์ ระวียัน. 2014. สภาวะในการกำจัดยางเหนียวต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของน้ำมันปาล์ม. GRC Graduate Research Conference 2514. Khon kaen University. 798-803.

Choo Yuen, M., F. Cheng Sit, L. Yung Chee, N. Harrison Lau Nik, N. Ma Ah and B. Yusof. 2009. Palm diesel with low pour point for cold climate countries. US Patent 20090199463.

Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed. 2006. Industrial applications of microbial lipase. *Enz. Microb. Tech.* 39(2) : 235-251.

Jensen, R.G. 1983. Detection and determination of lipase (acyl glycerol hydrolase) activity from various source. Lipids 18(9): 650-657.

Luković, N., Z. Knežević-Jugović and D. Bezbradica (2011). Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives, Alternative Fuel. M. Manzanera (*Ed.*), InTech, DOI: 10.5772/21905. https://www.intechopen.com/books/alternative-fuel/biodiesel-fuel-production-by-enzymatic-transesterification-of-oils-recent-trends-challenges-and-futu

Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 61(6): 1067-1071.

Moser, B. R. 2008. Influence of blending canola, palm, soybean and sunflower oil methyl esters on fuel properties of biodiesel. *Ener. & Fuels*. 22(6) : 4301-4306.

Nagao, T., Y. Shimada, A. Sugihara and Y. Tominaga. 2002. Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase. *J. Molec. Catal. B: Enz.* 17(3-5) : 125-132.

Pongket, U., W. Piyatheerawong, S. Thapphasaraphong and A. H-Kittikune. 2015. Enzymatic preparation of linoleic acid from sunflower oil: an experimental design approach. *Bio. & Biotech. Equip*. 29(5) : 926-934.

Royon, D., M. Daz, G. Ellenrieder and S. Locatelli. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. *Bioresource tech*. 98(3) : 648-653.

Vyas, A. P., N. Subrahmanyam and P. A. Patel. 2009. Production of biodiesel though transesterification of Jatropha oil using KNO3/AI203 solid catalyst. Fuel. 88(4) :625-628.

Wanasundara, U. N., P. K. J. P. D. Wanasundara, and F. Shahidi. 2005. Novel separation techniques for isolation and purification of fatty acids and oil by-products. pp.585-621. F. Shahidi.(ed.) Bailey's industrial oil and fat products. 6th. Six volume set.