

สถานะที่เหมาะสมในการลดค่ากรดที่สูงของน้ำมันยีสต์ *Pseudozyma parantarctica* CHC28 เพื่อการผลิตไบโอดีเซลจุลินทรีย์

Optimization on Decreasing High Acid Value of Yeast Oil

Pseudozyma parantarctica CHC28 for Microbial Biodiesel Production

อัสาดวูท อารีศิริสุข^{1*}, กนกภรณ์ สุขมาก², จิตินธรณ์ บุญชื่น², สุจยา ฤทธิสร¹ และจันทิมา ทีฆะ¹

Atsadawut Areesirisuk^{1*}, Kanokporn Sukmark², Jatintorn Boonchuen², Sujaya Ritthisorn¹ and Jantima Teeka¹

บทคัดย่อ

ปัจจุบันไบโอดีเซลได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในฐานะพลังงานทดแทนที่สำคัญในการแก้ปัญหาวิกฤติพลังงานและสถานะโลกร้อน โดยน้ำมันจุลินทรีย์ได้รับความสนใจนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนวัตถุดิบดั้งเดิมในการผลิตไบโอดีเซล อย่างไรก็ตามน้ำมันจุลินทรีย์เป็นน้ำมันที่มีค่ากรดสูงเนื่องจากมีกรดไขมันอิสระเป็นองค์ประกอบหลักทำให้ไม่สามารถใช้ผลิตไบโอดีเซลได้โดยตรง โดยในขั้นตอนแรกเป็นการเพาะเลี้ยงยีสต์น้ำมัน *Pseudozyma parantarctica* CHC28 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร เป็นเวลา 5 วัน พบว่ายีสต์สามารถผลิตชีวมวล และน้ำมันได้เท่ากับ 11.39 และ 5.48 g/L ตามลำดับ คิดเป็นการสะสมน้ำมันภายในเซลล์เท่ากับ 48.10 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นทำการสกัดน้ำมันในเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายกรด HCl (4.0 N) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาณน้ำมันที่สกัดได้เท่ากับ 31.80 g ซึ่งมีค่ากรดเท่ากับ 28.14 mgKOH/g และนำมาศึกษากระบวนการลดค่ากรดด้วยวิธีการทางสถิติโดยใช้การทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ระดับ ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการลดค่ากรด ซึ่งมีตัวแปรในการศึกษาคือ ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (H₂SO₄) อุณหภูมิ และอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน ซึ่งสถานะที่เหมาะสมคือ การใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.2 N ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 °C และใช้อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน เท่ากับ 5:1 ทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงเป็น 2.04 mgKOH/g (ลดลง 92.74 %) ค่ากรดของน้ำมันที่ผ่านการปรับสภาพใกล้เคียงกับระดับที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล (2.0 mgKOH/g) โดยงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดค่ากรดของน้ำมันที่ผลิตจากยีสต์ CHC28

คำสำคัญ: น้ำมันยีสต์ *Pseudozyma parantarctica* ไบโอดีเซลจุลินทรีย์ การทดลองแฟคทอเรียลแบบ 2 ระดับ

Abstract

Currently, biodiesel has been received much attention for as an important renewable energy for resolving the energy crisis and global warming problems. The microbial oil is interested to use as an alternative raw material in biodiesel production instead of conventional oils. However, the microbial oil has high acid value (AV) oil because it contained the free fatty acid as a main component which cannot convert to biodiesel directly. Firstly, oleaginous yeast *Pseudozyma*

¹ อ.ดร., สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี 12110

² นักศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี 12110

¹ Lecturer, Dr., Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 12110

² Undergraduate Student, Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani, 12110

* Corresponding Author: Tel. 02-5494177, E-mail Address: atsadawut_a@rmutt.ac.th

parantarctica CHC28 was cultured in a 10-L fermenter for 5 days. The result showed that yeast could produce the biomass and oil concentration for 11.39 and 5.48 g/L, respectively. The oil accumulation was expressed as oil content for 48.10 % of dry cell weight. The oil in yeast biomass was extracted by using HCl solution (4.0 N) with ratio of 1:1. The extracted oil was obtained for 31.80 g which had the AV was 28.14 mgKOH/g. Then, the simple pretreatment process for decreasing the AV by statistical methods based on 2-level factorial experimental design was studied. The independent variables were amount of H_2SO_4 , temperature, and ratio of methanol to oil. The AV was reduced to 2.04 mgKOH/g (92.74 % decreasing) under optimum condition: 0.2 N H_2SO_4 , 65 °C of temperature, and 5:1 of methanol to oil ratio. The AV of pretreated oil was in suitable level for producing biodiesel (2.0 mgKOH/g). This research demonstrated the high efficiency of pretreatment process to decrease AV of oil produced by yeast CHC28.

Keywords: Yeast Oil, *Pseudozyma parantarctica*, Microbial Biodiesel, 2-Level Factorial Experiment

บทนำ

ในปัจจุบันทั่วโลกมีความต้องการใช้พลังงานมากยิ่งขึ้น ประกอบกับปริมาณของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Fossil Fuel) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักได้ลดลงอย่างต่อเนื่อง และราคาน้ำมันในตลาดโลกมีความผันผวนตลอดเวลา [1] ทำให้มีความจำเป็นต้องหาแหล่งพลังงานใหม่มาทดแทนพลังงานจากฟอสซิล ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นพลังงานชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล เนื่องจากสามารถผลิตได้จากทรัพยากรหมุนเวียน (Renewable Resource) เช่น น้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้แล้ว สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ และมีมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย [2] โดยนำน้ำมันหรือไขมันมาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอล หรือเอทานอล ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ในสถานะที่มีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Alkaline Catalyst) ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในน้ำมันจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ หรือเอทิลเอสเทอร์ (Methyl Ester or Ethyl Ester) [3] ซึ่งเป็นไบโอดีเซลที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้

อย่างไรก็ตามเนื่องจากวัตถุดิบหลักที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันยังมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการศึกษาเพื่อหาแหล่งวัตถุดิบอื่น ๆ มาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลทดแทนวัตถุดิบเดิม จากการวิจัยในปัจจุบันพบว่า จุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถในการสร้างและสะสมน้ำมันไว้ภายในเซลล์ได้มากกว่า 20 % (Oleaginous Microorganism) [4] จุลินทรีย์เหล่านี้จึงได้รับความสนใจนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล โดยเฉพาะยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว และสะสมน้ำมันในเซลล์ได้สูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น จึงนิยมนำยีสต์มาใช้ในการศึกษา ซึ่ง Areesirisuk และคณะ [5] ได้รายงานว่ายีสต์ *Pseudozyma parantarctica* CHC28 เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำมันภายในเซลล์ได้เท่ากับ 50 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนหลายชนิด จึงเลือกยีสต์ดังกล่าวมาใช้ในการวิจัยนี้ นอกจากนี้การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันจุลินทรีย์นั้นต้องสกัดน้ำมันภายในเซลล์ยีสต์ออกมาโดยทำให้เซลล์แตกก่อนด้วยวิธีการทางเคมี หรือวิธีการทางกายภาพ เช่น การใช้สารละลายกรด การใช้แรงดันสูง (High Pressure) และการใช้ไมโครเวฟ (Microwave) จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แยกน้ำมันออกมา ทั้งนี้การย่อยเซลล์ด้วยสารละลายกรดเป็นวิธีการที่ง่าย ต้นทุนต่ำ และมีประสิทธิภาพ จึงนิยมใช้กรดในการย่อยเซลล์ [6] นอกจากนี้การผลิตไบโอดีเซลจะต้องใช้น้ำมันที่มีค่ากรด (Acid Value) น้อยเป็นวัตถุดิบ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาซาโปนิฟิเคชัน (Saponification) ซึ่งเกิดสบู่เป็นผลิตภัณฑ์หลักทำให้ผลผลิตของไบโอดีเซลลดลง ทั้งนี้ น้ำมันที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เป็นน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid) และค่ากรดสูง ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

ได้โดยตรง [1, 7] ต้องใช้วิธีการผลิตแบบสองขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกต้องลดค่ากรดของน้ำมันให้ลดลงด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) ระหว่างกรดไขมันอิสระกับแอลกอฮอล์ในสภาวะที่เป็นกรด (Acidification) จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ไปผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันต่อไป ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาหลายชนิดเพื่อลดค่ากรดของน้ำมันด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน เช่น กรดซัลฟูริก (Sulfuric Acid) [8] ซัลโฟเนตแอคทีเวตคาร์บอน (Sulfonated Activated Carbon) [9] ซีโอไลต์ (Zeolite) [10] หรือ เอนไซม์ (Enzyme) [11] อย่างไรก็ตามการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นวิธีการที่ง่าย และมีต้นทุนต่ำ โดยสามารถลดค่ากรดของน้ำมันให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการทำไบโอดีเซลได้

งานวิจัยนี้จะทำให้ทราบวิธีการลดกรดของน้ำมันยีสต์และความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันยีสต์มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลทดแทนวัตถุดิบดั้งเดิม ช่วยลดมลพิษทางด้านสิ่งแวดล้อม และลดการนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพของน้ำมันยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ให้มีค่ากรดลดลง โดยการทดลองแบบแฟกทอเรียล 2 ระดับ ก่อนนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

จุลินทรีย์ การเก็บรักษาจุลินทรีย์ และการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ ยีสต์น้ำมัน *P. parantarctica* CHC28 ซึ่งเก็บรักษาไว้ในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80°C จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ดังกล่าวปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Maintenance (YM) broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นการเจริญ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C อัตราการเขย่าที่ 180 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่กระตุ้นการเจริญแล้ว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร มาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ Seed Medium [5] ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดิม นาน 24 ชั่วโมง และนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. parantarctica* เพื่อผลิตน้ำมันด้วยการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 10 ลิตร

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ ปริมาตร 0.3 ลิตร ลงในอาหาร Oil Production Medium [5] ปริมาตร 5.7 ลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยบรรจุในถังหมักขนาด 10 ลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30°C อัตราการกวน 200 rpm อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เป็นเวลา 5 วัน เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมา นำตัวอย่างส่วนหนึ่งมาศึกษาการสะสมน้ำมันในเซลล์ได้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พร้อมบันทึกภาพ จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลือมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ยีสต์ออกจากอาหาร ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำปลอดเชื้อและปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์อีกครั้ง นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ทั้งหมดมาย่อยเซลล์ด้วยการเติมสารละลายกรด HCl เจือจาง ความเข้มข้น 4.0 N และทำการย่อยเซลล์ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดน้ำมันด้วยวิธีการของ Bligh และ Dyer [12] นำน้ำมันที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนออกด้วยการเติมสารละลาย KCl ความเข้มข้น 0.1 M ลงไปเท่ากับปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ และแยกตะกอนโปรตีนออกด้วยการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำน้ำมันยีสต์ที่ได้มาศึกษาในขั้นตอนถัดไป

การศึกษาการลดค่ากรดของน้ำมันยีสต์โดยการทดลองแบบแฟกทอเรียล 2 ระดับ

นำน้ำมันยีสต์มาผสมกับเมทานอล และกรดซัลฟูริกนำไปทำปฏิกิริยาโดยควบคุมอุณหภูมิตามที่กำหนด ระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล 2 ระดับ ดังตารางที่ 2 เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดนำตัวอย่างไปแช่ในน้ำเย็นที่อุณหภูมิห้องเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงให้แยกชั้น แล้วแยกส่วนน้ำมันในชั้นล่างสุดมาผสมกับ 2-โพรพานอล (2-Propanol) นำไปวัดค่ากรดของน้ำมันยีสต์ที่เหลือด้วยวิธีการไทเทรตกับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 1.0 N โดยใช้สารละลายฟีนอล์ฟทาเลอิน (Phenolphthalein) เป็นอินดิเคเตอร์ และคำนวณค่ากรด

ของน้ำมันยีสต์ในหน่วย mgKOH/g [13] ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้อามาหาความสัมพันธ์ในรูปของสมการพหุนาม (Polynomial Equations) ด้วยโปรแกรม Design Expert V7.0

ตารางที่ 1 ระดับของปัจจัยที่กำหนดในการศึกษาการลดค่ากรดของน้ำมันยีสต์โดยการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ระดับ

Variables	Code	Experimental Level	
		-1 (Low)	1 (High)
H ₂ SO ₄ Concentration (N)	A	0.05	0.20
Temperature (°C)	B	55.0	65.0
Methanol to Oil Ratio (Volume to Weight)	C	5:1	20:1

ผลการวิจัย

การสะสมน้ำมันของยีสต์ และค่ากรดของน้ำมันยีสต์ที่สกัดได้

ยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำมันไว้ในเซลล์ ดังภาพที่ 1 ยีสต์ชนิดนี้ จะมีการสะสมน้ำมันภายในเซลล์เมื่อเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหารบางชนิดมีอยู่อย่างจำกัด และจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร เป็นเวลา 5 วัน พบว่า ยีสต์สามารถผลิตชีวมวล และน้ำมันได้เท่ากับ 11.39 และ 5.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นการสะสมน้ำมันภายในเซลล์เท่ากับ 48.10 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อนำเซลล์ยีสต์ที่ได้มาสกัดน้ำมันด้วยสารละลายกรด HCl ได้ ปริมาณน้ำมันเท่ากับ 31.80 g และมีค่ากรดเท่ากับ 28.14 mgKOH/g



ภาพที่ 1 การสะสมน้ำมันภายในเซลล์ของยีสต์ *P. parantarctica* CHC28 ในสภาวะจำกัดแหล่งไนโตรเจน (ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light Microscope ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า บริเวณลูกศรชี้หยดนํ้ามัน (Oil Droplet) ภายในเซลล์ยีสต์)

การลดค่ากรดของน้ำมันยีสต์โดยการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ระดับ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่ส่งผลต่อการลดค่ากรดของน้ำมันยีสต์ ได้แก่ ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ระดับ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่า การทดลองที่ 3 สามารถลดค่ากรดได้น้อยที่สุด และการทดลองที่ 4 สามารถลดค่ากรดได้มากที่สุด ซึ่งการทดลองในสภาวะดังกล่าวสามารถทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงจนเท่ากับ 7.64 และ 2.04 mgKOH/g ตามลำดับ แสดงว่าการใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกันทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงแตกต่างกัน

ตารางที่ 2 ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ในการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ระดับ

Run	H ₂ SO ₄ Concentration (N)	Temperature (°C)	Methanol to Oil Ratio (v/w)	Acid Value (mgKOH/g)
1	0.05 (-1)	55.00 (-1)	5.00 (-1)	5.03 ± 1.03*
2	0.20 (+1)	55.00 (-1)	5.00 (-1)	6.21 ± 0.11
3	0.05 (-1)	65.00 (+1)	5.00 (-1)	7.64 ± 0.05
4	0.20 (+1)	65.00 (+1)	5.00 (-1)	2.04 ± 0.17
5	0.05 (-1)	55.00 (-1)	20.00 (+1)	3.14 ± 0.43
6	0.20 (+1)	55.00 (-1)	20.00 (+1)	3.90 ± 0.68
7	0.05 (-1)	65.00 (+1)	20.00 (+1)	2.32 ± 0.03
8	0.20 (+1)	65.00 (+1)	20.00 (+1)	2.78 ± 0.79

*Mean ± Standard Deviation (SD).

การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัยต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3 พบว่าความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (A) และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (B) ส่งผลต่อการลดลงของค่ากรดในน้ำมันยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0190 และ 0.0125 ตามลำดับ ในขณะที่อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ (C) มีอิทธิพลต่อการลดลงของค่ากรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0001 นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกกับอุณหภูมิ (AB) และความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกกับอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ (AC) ยังแสดงอิทธิพลร่วมต่อการลดลงของค่ากรดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % เช่นกัน โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.0002 และ 0.0009 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของปัจจัย (Code) และผลกระทบต่อการลดลงของค่ากรดของน้ำมันยีสต์

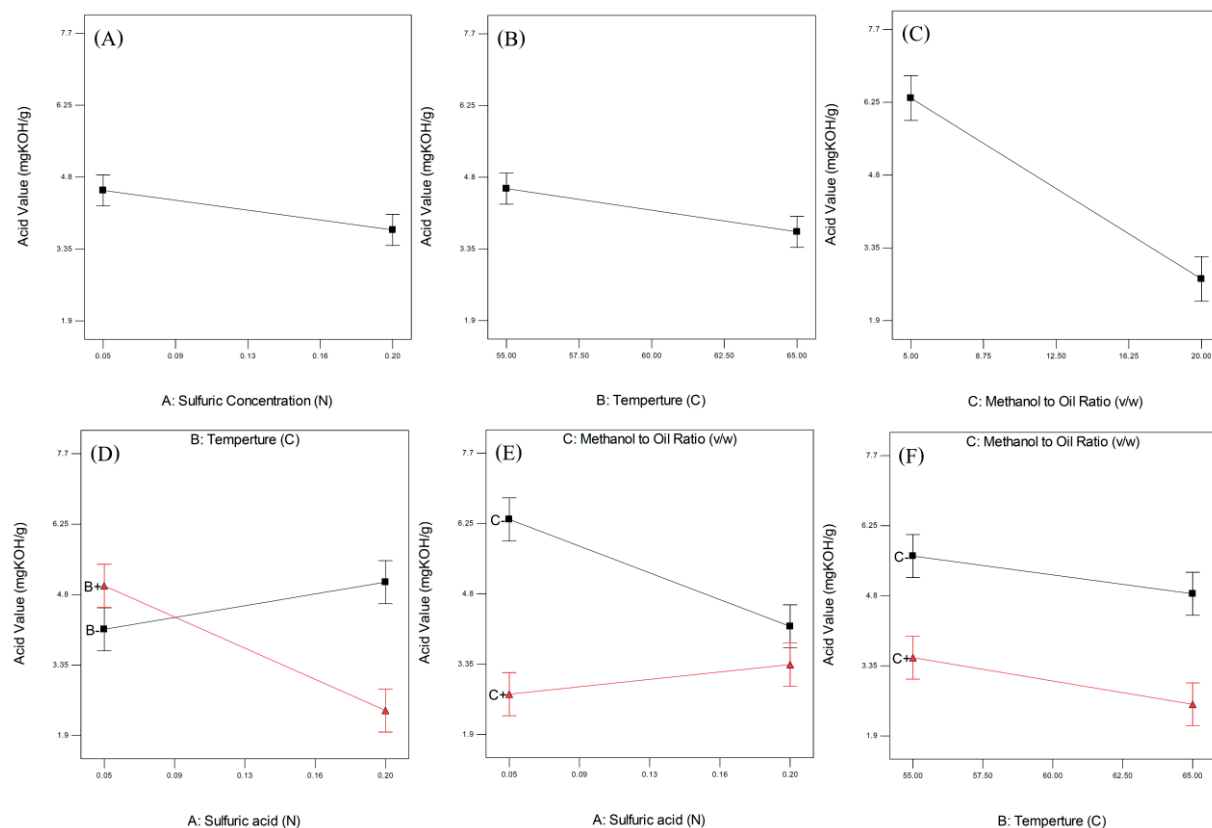
Source	SE	Coefficient	SS	df	MS	F-value	p-value
Model		4.13	55.86	7	7.98	26.89	0.0001
A: Sulfuric acid	-0.80	-0.40	2.54	1	2.54	8.58	0.0190*
B: Temperture	-0.87	-0.44	3.05	1	3.05	10.28	0.0125*
C: Methanol to oil ratio	-2.20	-1.10	19.27	1	19.27	64.96	0.0001**
AB	-1.77	-0.88	12.51	1	12.51	42.15	0.0002**
AC	1.44	0.70	7.92	1	7.92	26.69	0.0009**
BC	-0.093	-0.047	0.035	1	0.035	0.12	0.7403
ABC	1.62	0.81	10.53	1	10.53	35.48	0.0003**

SE is Standardized Effect, SS is Sum of Square, df is Degree of Freedom, MS is Mean Square, *Significant at $\alpha \leq 0.05$. **Significant at $\alpha \leq 0.01$.

อิทธิพลหลักและอิทธิพลร่วมของปัจจัยต่อการลดลงของค่ากรดในน้ำมันยีสต์

อิทธิพลความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ แสดงดังภาพที่ 2A-2F ผลการทดลองพบว่าปัจจัยทั้ง 3 ชนิดมีอิทธิพลต่อการลดลงของค่ากรดของน้ำมันยีสต์แบบแปรผกผัน โดยเมื่อระดับของแต่ละปัจจัยเพิ่มขึ้นทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงมาก ซึ่งการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ ส่งผลต่อการลดลงของค่ากรดมากที่สุด รองลงมาคือ อุณหภูมิ และความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก ตามลำดับ อิทธิพลหลัก (Main Effect) ของความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (A) แสดงดังภาพที่ 2A โดยผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรด เท่ากับ 0.2 N จะทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงมากกว่าที่ความเข้มข้น 0.05 N เมื่อพิจารณาอิทธิพลของอุณหภูมิ (B)

ดังภาพที่ 2B พบว่า การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 °C จะทำให้ค่ากรดลดลงมากกว่าการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 °C นอกจากนี้ยังพบว่าอิทธิพลของอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ (C) ดังภาพที่ 2C ส่งผลต่อการลดลงของค่ากรดของน้ำมันยีสต์ โดยเมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ เพิ่มขึ้นทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลง



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับค่ากรดของน้ำมันยีสต์

อิทธิพลร่วมของปัจจัย (Interaction Effect) ระหว่างความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิ (AB) แสดงดังภาพที่ 2D จากผลการทดลองพบว่า ปัจจัยทั้งสองชนิดแสดงอิทธิพลร่วมต่อค่ากรดของน้ำมันยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่กรดความเข้มข้นต่ำ ค่ากรดจะลดลงมากเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ แต่เมื่อใช้กรดความเข้มข้นสูง ค่ากรดจะลดลงมากเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และเมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลร่วมของปัจจัยระหว่างความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกกับอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน (AC) พบว่าปัจจัยทั้งสองชนิดแสดงอิทธิพลร่วมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2E โดยพบว่าเมื่อใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.05 N และใช้อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันที่ 20:1 จะสามารถลดค่ากรดได้ดีกว่าที่อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันที่ 5:1 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกเป็น 0.2 N พบว่าให้ผลการทดลองในทางตรงกันข้าม แสดงว่าเมื่อปัจจัยหนึ่งมีการเปลี่ยนแปลงอิทธิพลของปัจจัยร่วมที่มีต่อการลดลงของค่ากรดก็จะเปลี่ยนแปลงไปเช่นกัน

อภิปรายผลการวิจัย

ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ที่สกัดได้

น้ำมันที่สกัดได้จาก خمยีสต์มีค่ากรดเริ่มต้นเท่ากับ 28.14 mgKOH/g ซึ่งค่ากรดดังกล่าวสูงกว่าค่ากรดของน้ำมันที่ใช้ในการทำไบโอดีเซลโดยทั่วไป [14] ทำให้ไม่สามารถใช้น้ำมันยีสต์นี้ในการผลิตไบโอดีเซลได้ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ด่างเป็นตัวเร่งได้ โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลจะใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของไตรกลีเซอไรด์ใน

น้ำมันกับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอล หรือเอทานอล เกิดเป็นสารประกอบในกลุ่มเอสเทอร์ (Ester Compound) หรือไบโอดีเซล อย่างไรก็ตามหากในน้ำมันนั้นมีค่ากรดสูงกว่า 2.0 mgKOH/g จะเกิดปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชัน และเกิดสบู่หรือสารประเภทเกลือแทนการเกิดเอสเทอร์ การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่มีกรดสูงจึงไม่สามารถทำได้โดยตรง ดังนั้นจึงต้องมีการลดค่ากรดของน้ำมันยีสต์ให้ลดลงก่อนโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขั้นตอนแรกแทนสารละลายต่าง เมื่อค่ากรดลดลงจนถึงระดับที่เหมาะสมจึงใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในขั้นตอนถัดไปตามปกติ [15]

อิทธิพลหลักและอิทธิพลร่วมของปัจจัยต่อการลดลงของค่ากรดในน้ำมันยีสต์

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดสูงขึ้นทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ghadge and Raheman [14] ซึ่งศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกในการลดความเป็นกรดของน้ำมันจากเมล็ดพืชพบว่าเมื่อความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจะทำให้กรดไขมันอิสระเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลมากขึ้น อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นของกรดสูงเกินไปจะเกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่มีสีเข้มจนถึงดำทำให้ปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ลดลง ในขณะที่การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงมากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาดูดความร้อน (Endothermic Reaction) เมื่ออุณหภูมิของสูงขึ้นจะปฏิกิริยาจะเกิดมากขึ้น [15] โดยผลการทดลองยังสอดคล้องกับรายงานของ Marchetti and Errazu [15] ซึ่งรายงานแนวโน้มอิทธิพลของอุณหภูมิในลักษณะเดียวกันกับการทดลองนี้ และผลการทดลองยังพบว่าเมื่ออัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์เพิ่มขึ้นทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลง เนื่องจากกรดไขมันอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ ค่ากรดจึงลดลงมากกว่าการใช้อัตราส่วนต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramadhas และคณะ [8] ซึ่งพบว่าอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับน้ำมันเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการเปลี่ยนกรดไขมันให้เป็นสารประกอบเอสเทอร์หรือไบโอดีเซล ซึ่งในทางทฤษฎีหากใช้วัตถุดิบที่มีน้ำมันอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ จะใช้เมทานอล 3 mole ทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ 1 mole และในกรณีที่น้ำมันนั้นมีกรดไขมันอิสระเป็นส่วนประกอบ จะใช้เมทานอล 1 mole ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระ 1 mole อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันควรจะสูงกว่าอัตราส่วนตามหลักของ Stoichiometry เพื่อเร่งให้ปฏิกิริยาดำเนินไปข้างหน้าอย่างสมบูรณ์ ซึ่ง Canakci และ Van Gerpan [16] รายงานว่าอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันควรจะอยู่ในช่วง 15:1 ถึง 35:1 โดยเมื่อพิจารณาอิทธิพลหลักของอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ (ภาพที่ 2C) พบว่า ที่อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์เท่ากับ 20:1 ทำให้ค่ากรดลดลงมากกว่าที่อัตราส่วน 5:1

เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมของปัจจัย (Interaction Effect) ต่อการลดลงของน้ำมันยีสต์ พบว่าความเข้มข้นของกรดกับอุณหภูมิ (AB) และ ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกกับอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน (AC) แสดงอิทธิพลร่วมต่อค่ากรดของน้ำมันยีสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดย Ramadhas และคณะ [8] รายงานว่าอัตราส่วนของของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 6:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการลดค่ากรดของน้ำมันจากเมล็ดยางพารา (Rubber Seed Oil) ที่มีค่ากรดเริ่มต้นเท่ากับ 34 mgKOH/g จนเหลือค่ากรดน้อยกว่า 2 mgKOH/g ซึ่งเหมาะสมในการนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เนื่องจากกรดไขมันอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลในสภาวะที่มีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ค่ากรดของน้ำมันลดลง โดยในการวิจัยนี้พบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 5:1 ทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงมากที่สุด

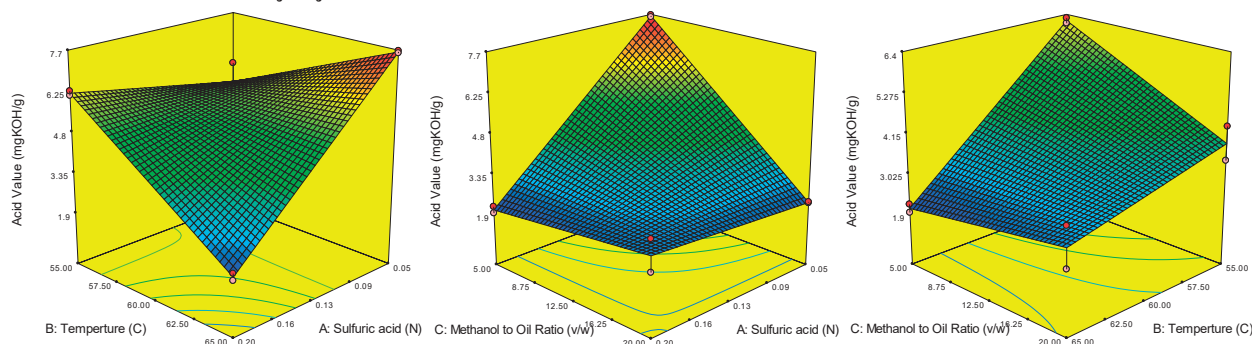
สภาวะที่เหมาะสมต่อการลดค่ากรดของน้ำมันยีสต์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยในรูปแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3 โดยพบว่า ปัจจัยทั้งสามชนิดมีอิทธิพลต่อการลดลงของค่ากรด ซึ่งระดับของปัจจัยที่แตกต่างกันทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์แตกต่างกันออกไป ซึ่งระดับของปัจจัยที่เหมาะสมต่อการลดลงของค่ากรดของน้ำมันยีสต์จะอยู่ในบริเวณพื้นที่สี

น้ำเงินของภาพที่ 3 นอกจากนี้ผลการทดลองข้างต้นสามารถสร้างความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสามชนิดกับค่าการตอบสนอง (ค่ากรดของน้ำมันยีสต์) ในรูปแบบสมการพหุนาม (Polynomial Equation) ได้ดังสมการที่ (1)

$$AV = 4.13 - 0.40A - 0.44B - 1.10C - 0.88AB + 0.70AC - 0.047BC + 0.81ABC \quad (1)$$

AV คือ ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ (mgKOH/g), A คือ ความเข้มข้นของกรด B คือ อุณหภูมิ และ C คือ อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน โดย A B และ C อยู่ในรูปของ Code (-1 ถึง +1)



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ในรูปแบบพื้นผิวดตอบสนอง (Response Surface) ระหว่างปัจจัยกับค่ากรดของน้ำมันยีสต์

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลจากการสร้างความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้ง 3 ชนิดต่อการลดลงของค่ากรดของน้ำมันยีสต์ พบว่าสภาวะที่สามารถลดค่ากรดได้สูงที่สุดคือ ความเข้มข้นกรดซัลฟริกเท่ากับ 0.2 N (Code Value = 1) อุณหภูมิ 65 °C (Code Value = 1) และอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์เท่ากับ 5:1 (Code Value = -1) ซึ่งเมื่อนำสภาวะนี้มาทำการทวนสอบ (Validation) ประสิทธิภาพของสมการที่ (1) โดยการแทนค่าลงในสมการ พบว่าได้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ (Predicted Result) เท่ากับ 2.05 mgKOH/g และเมื่อนำสภาวะดังกล่าวมาทดลองใช้จริงในการทำปฏิกิริยา พบว่าน้ำมันยีสต์มีค่ากรด (Experimental Result) เท่ากับ 2.04 mgKOH/g แสดงว่าสมการดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการทำนายสภาวะในการลดกรดของน้ำมันยีสต์ได้ โดยค่ากรดลดลงเท่ากับ 92.74 % ของค่ากรดในน้ำมันยีสต์เริ่มต้น

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นกรดซัลฟริกที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อุณหภูมิ และอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์ ที่มีต่อค่ากรดของน้ำมันยีสต์ *P. paratractica* CHC28 โดยใช้การทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ระดับ พบว่าปัจจัยทั้ง 3 ชนิดมีอิทธิพลต่อการลดลงของค่ากรดของน้ำมันยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และยังพบว่าปัจจัยร่วมระหว่างความเข้มข้นกรดซัลฟริกกับอุณหภูมิ และความเข้มข้นกรดซัลฟริกกับอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันยีสต์แสดงอิทธิพลร่วมต่อการลดลงของค่ากรดของน้ำมันยีสต์อีกด้วย และสภาวะที่ทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงมากที่สุดคือการใช้กรดซัลฟริกความเข้มข้น 0.2 N ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 °C และใช้อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน เท่ากับ 5:1 ซึ่งทำให้ค่ากรดของน้ำมันยีสต์ลดลงจากเดิม 28.14 mgKOH/g เป็น 2.04 mgKOH/g คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 92.74 % โดยค่ากรดดังกล่าวใกล้เคียงกับค่ากรดที่เหมาะสมของวัตถุดิบที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ตลอดการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Vicente, G., Fernando, B.L., Rodríguez, R., Javier, G.F., Sádabaa, I., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S. and Garreb, V. (2009). “Biodiesel Production from Biomass of an Oleaginous Fungus”, **Biochemical Engineering Journal**. 48, 22–27.
- [2] Thliveros, P., Uçkun, K.E. and Webb, C. (2014). “Microbial Biodiesel Production by Direct Methanolysis of Oleaginous Biomass”, **Bioresource Technology**. 157, 181–187.
- [3] Chisti, Y. (2007). “Biodiesel from Microalgae”, **Biotechnology Advances**. 25, 294–306.
- [4] Duarte, S. H., Ansolin, M. and Maugeri, F. (2014). “Cultivation Of *Candida* sp. LEB-M3 in Glycerol: Lipid Accumulation and Prediction of Biodiesel Quality Parameters”, **Bioresource Technology**. 161, 416–422.
- [5] Areesirisuk, A., Chiu, C.H., Yen, S.B. and Guo, J.H. (2015). “A Novel Oleaginous Yeast Strain with High Lipid Productivity and Its Application to Alternative Biodiesel Production”, **Applied Biochemistry and Microbiology**. 51, 411–418.
- [6] Halim, R., Danquah, M.K. and Webley, P.A. (2012). “Extraction of Oil from Microalgae for Biodiesel Production: A Review”, **Biotechnology Advances**. 30, 709–732.
- [7] Nakpong, P. and Wootthikanokkhan, S. (2010). “High Free Fatty Acid Coconut Oil as a Potential Feedstock for Biodiesel Production in Thailand”, **Renewable Energy**. 35, 1682–1687.
- [8] Ramadhas, A.S., Jayaraj, S. and Muraleedharan, C. (2005). “Biodiesel Production from High FFA Rubber Seed Oil”, **Fuel**. 84, 335–340.
- [9] Niu, S., Ning, Y., Lu, C., Han, K., Yu, H. and Zhou, Y. (2018). “Esterification of Oleic Acid to Produce Biodiesel Catalyzed by Sulfonated Activated Carbon from Bamboo”, **Energy Conversion Management**. 163, 59–65.
- [10] Prinsen, P., Luque, R. and González-Arellano, C. (2018). “Zeolite Catalyzed Palmitic Acid Esterification”, **Microporous and Mesoporous Materials**. 262, 133–139.
- [11] Mata, T.M., Correia, D., Pinto, A., Andrade, S., Trovisco, I., Mato, E., Martins, A.A. and Caetano, N.S. (2017). “Fish Oil acidity Reduction by Enzymatic Esterification”, **Energy Procedia**. 136, 474–480.
- [12] Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). “A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification”, **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 37, 911–917.
- [13] Ofoefule, A.U., Ibeto, C.N., Okoro, U.C. and Onukwuli, O.D. (2013). “Biodiesel Production from Tigernut (*Cyperus esculentus*) Oil and Characterization of Its Blend with Petro-Diesel”, **Physical Review and Research International**. 3, 145–153.
- [14] Ghadge, S.V. and Raheman, H. (2005). “Biodiesel Production from Mahua (*Madhuca indica*) Oil Having High Free Fatty Acids”, **Biomass and Bioenergy**. 28, 601–605.
- [15] Marchetti, J.M. and Errazu, A.F. (2008). “Esterification of Free Fatty Acids Using Sulfuric Acid as Catalyst in The Presence of Triglycerides”, **Biomass and Bioenergy**. 32, 892–895.