

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้วและการประยุกต์ใช้กลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้
เพื่อผลิตไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

BIODIESEL PRODUCTION BY USED VEGETABLE OIL AND APPLICATION OF
BY-PRODUCT BASED GLYCEROL TO PRODUCE BIOETHANOL
AND POLYHYDROXYBUTYRATE

ธนาภรณ์ รักการ¹ และ กนกพร สังขรักษ์^{2*}

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

²สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

Thanaphorn Rakkan¹ and Kanokphorn Sangkharak^{2*}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210

*E-mail: skanokphorn@yahoo.com

Received: 2019-12-17

Revised: 2021-02-02

Accepted: 2021-05-31

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้ว นอกจากนี้ยังมีการนำกลีเซอรอล (ผลพลอยได้) จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลไปใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้ว ร่วมกับเมทานอลผ่านปฏิกิริยา ทรานเอสเตอริฟิเคชันโดยมีโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะการผลิตที่มีอัตราส่วนน้ำมัน ต่อเมทานอล 6:1 ตัวเร่งปฏิกิริยาร้อยละ 1 เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้ผลผลิต ไบโอดีเซลสูงถึงร้อยละ 90.92 ± 0.06 และปริมาณเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 96.50 ± 0.01 นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด กรดไขมันอิสระ ค่าสaponification น้ำหนักโมเลกุล (Potentiometric Titration) จุดไหลเท และจุดขุ่นของไบโอดีเซล เท่ากับ 0.45 ± 0.02 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน ร้อยละ 0.21 ± 0.02 153.30 ± 0.15 352.00 ± 0.15 กรัมต่อโมล 18 องศาเซลเซียส และ 16 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สมบัติและคุณภาพของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืช ใช้แล้วผ่านมาตรฐานของกรมธุรกิจพลังงาน (ประเทศไทย) หลังจากนั้นจึงแยกกลีเซอรอลผลพลอยได้จากไบโอดีเซล และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลและ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้ *Cupriavidus necator* TISTR 1095 และ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้การหมักแบบกะ (เขย่า 150 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส) ผลการศึกษาพบว่าอาหารเหลว Nutrient broth (NB) เสริมกลีเซอรอลร้อยละ 10 ให้ผล ไบโอเอทานอล สูงสุดร้อยละ 1.94 หลังเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ในขณะที่พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต สูงสุดเท่ากับ

3.98 กรัมต่อลิตร จะได้จากอาหารเหลว NB เสริมด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 10 และใยปาล์มน้ำมันร้อยละ 4 หลังเพาะเลี้ยง 84 ชั่วโมง

คำสำคัญ: ไบโอดีเซล ไบโอเอทานอล กลีเซอรอล พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

ABSTRACT

This study aimed to produce biodiesel from used vegetable oil. Moreover, glycerol (the by-product) from biodiesel process was also utilized for bioethanol and polyhydroxyalkanoate production. The experiment was divided into 2 steps. First, the production of biodiesel from used vegetable oil and methanol by transesterification reaction using potassium hydroxide as catalyst. The condition for biodiesel production containing 6:1 oil to methanol ratio, 1% catalyst, 250 rpm at 60 °C for 1 h. Under these condition, 90.92±0.06% of biodiesel with 96.5±0.01% methyl ester was obtained. In addition, the acid value, free fatty acid, saponification value, molecular weight (Potentiometric Titration), pour point and cloud point of biodiesel were 0.45±0.02 mg KOH/g oil, 0.21±0.02%, 153.3±0.15 352±0.15 g/mol, 18 °C and 16 °C, respectively. The characteristic of biodiesel was met the standard of Department of Energy Business (Thailand). Afterward, the glycerol by-product was isolated from biodiesel and utilized as carbon source for bioethanol and polyhydroxyalkanoate production using *C. necator* TISTR 1095 and *S. cerevisiae* under batch fermentation (150 rpm, 37 °C). The result found that the NB supplemented with 10% glycerol yield highest bioethanol at 1.94% after 48 h cultivation. While, the highest polyhydroxyalkanoate (3.98 g/L) obtained from NB supplemented with 10% glycerol and 4% palm fiber after 84 h cultivation.

Keywords: Biodiesel, Bioethanol, Glycerol, Polyhydroxyalkanoates, Polyhydroxybutyrate

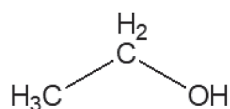
บทนำ

ในปัจจุบันมีแนวโน้มการใช้เชื้อเพลิงและพลาสติกเพิ่มมากขึ้นในทุกวัน ซึ่งเชื้อเพลิงและพลาสติกเหล่านี้ส่วนใหญ่ผลิตมาจากปิโตรเคมี มีสมบัติย่อยสลายได้ยากและใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลาย จึงทำให้เกิดการสะสมและก่อให้เกิดปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในด้านการกำจัดพลาสติก เนื่องจากการนำพลาสติกไปเผาทำลายจะก่อให้เกิดก๊าซพิษ รวมถึงการเผาไหม้ของเชื้อเพลิง เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน ดังนั้นจึงมีการวิจัยและพัฒนาเชื้อเพลิงและพลาสติกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงและพลาสติกที่สามารถผลิตได้จากทรัพยากรหมุนเวียน (Renewable sources) พลังงานเชื้อเพลิงที่ได้รับความสนใจในการวิจัยได้แก่ ไบโอดีเซล (Biodiesel) และไบโอเอทานอล (Bioethanol) (Diasakou, 1998; Niwaswong & Ruangviriyachai, 2012) ในขณะเดียวกันพลาสติกที่ได้รับความสนใจในการวิจัยคือ พลาสติกที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic) หรือพลาสติกชีวภาพได้แก่ พอลิแลกติกแอซิด (Polylactic acid, PLA) และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) (Suksawat & Pathom-aree, 2012; Phol-in, 2011)

ไบโอดีเซล เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซลที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีสมบัติในการเผาไหม้ที่ดีไม่ต่างจากน้ำมันดีเซล การผลิตไบโอดีเซลเกิดจากปฏิกิริยาเคมีเรียกว่า ทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชัน

(Transesterification) เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอทานอล เมทานอล และบิวทานอล โดยมีตัวเร่ง กรด หรือเอนไซม์ (Luque et al., 2010) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ผลผลิตเป็นอัลคิลเอสเทอร์ (Alkyl ester) หรือไบโอดีเซล และผลิตภัณฑ์พลอยได้เป็นกลีเซอรอล จากงานวิจัยของ Banerjee et al. (2014) ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้วร่วมกับเมทานอล โดยมีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าให้ผลผลิตไบโอดีเซลสูงสุดร้อยละ 94 และงานวิจัยของ Kawentar & Budiman (2013) ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้วร่วมกับเมทานอลโดยมีโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่าให้ผลผลิตไบโอดีเซลสูงสุด ร้อยละ 92

ไบโอเอทานอล เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เกิดจากการหมักพืชเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 1 สมบัติของไบโอเอทานอลคือ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มี취 ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จุดเดือด 78.5 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -114.1 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพทำให้มีความเป็นพิษต่ำ การใช้ประโยชน์จากไบโอเอทานอลสามารถใช้ได้หลากหลาย เช่น เป็นตัวทำละลาย ใช้ทำความสะอาดฆ่าเชื้อโรค และพลังงาน เป็นต้น วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ง่ายและสะดวก ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาโดยตรงทำให้เกิดสีของเอทานอลกับโพแทสเซียมไดโครเมต โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์อยู่ที่ 585 นาโนเมตร



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไบโอเอทานอล

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เป็นสารประเภทพอลิเอสเตอร์ (Polyester) ที่สังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ มีสมบัติทางกายภาพที่โดดเด่นหลายประการ เช่น ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทนต่อความร้อน (Thermoplastic) มีความยืดหยุ่น (Elastometric) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์ประเภท พอลิเอทิลีน (Polyethylene, PE) และพอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP) (Suksawat, 2012) การนำพลาสติกประเภทพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ แทนพลาสติกที่ผลิตมาจากปิโตรเคมี จึงเป็นการช่วยลดผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อมในระยะยาว จากปริมาณการใช้พลาสติกที่เพิ่มสูงขึ้น (Phol-in, 2010) ซึ่งในกลุ่มที่รู้จักกันดีและนิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายคือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

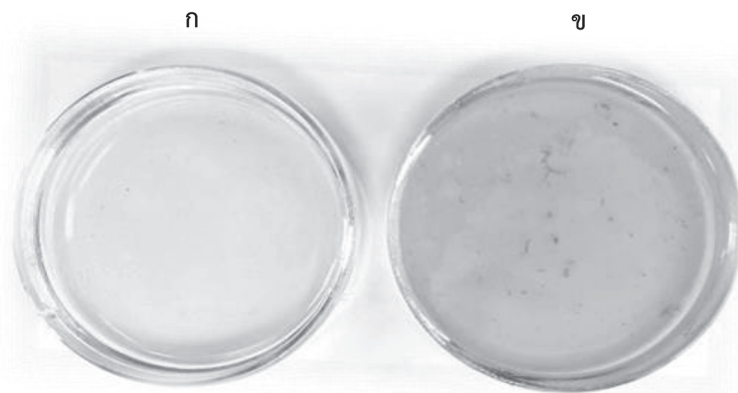
การผลิตพลังงานเชื้อเพลิงและไบโอพลาสติกนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของต้นทุนในการผลิต เนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูง การลดต้นทุนการผลิตโดยการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกหรือเป็นวัสดุเศษเหลือจึงเป็นงานวิจัยที่ทำหาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้ว และใช้ประโยชน์กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมันมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซี-บิวทิเรตที่เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ และใช้เป็นแนวทางสำหรับการพิจารณาต้นทุนในการผลิต ลดของเสียที่จะเกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อมและลดระยะเวลาในการผลิตเชื้อเพลิงและพลาสติกชีวภาพในอนาคตต่อไป

วิธีการ

1. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้วด้วยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยมีโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันพืชใช้แล้วและการวิเคราะห์ผล

น้ำมันพืชที่ใช้แล้ว (ผลิตจากปาล์มน้ำมัน) เก็บจาก อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง ประกอบด้วย กรดไมริสติก อิมตัว (C14) กรดปาล์มมิติคอิมตัว (C16) กรดสเตียริกอิมตัว (C18) กรดโอเลอิก ไมอิมตัวเชิงเดี่ยว (C18) กรดไลโนเลนิก ไมอิมตัวเชิงซ้อน (C18) และอื่น ๆ ประมาณร้อยละ 1.0 43.5 4.3 36.6 9.1 และ 5.5 ตามลำดับ ซึ่งน้ำมันได้ผ่านการทอดมาแล้ว 1 ครั้ง และเก็บรักษาในภาชนะปิดเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้ในการวิจัย น้ำมันพืชที่ใช้แล้วมีลักษณะของสีเข้ม และมีความใส่น้อยกว่าน้ำมันพืชก่อนทอด รวมถึงมีตะกอนของเศษอาหารปะปนอยู่ ดังภาพที่ 2



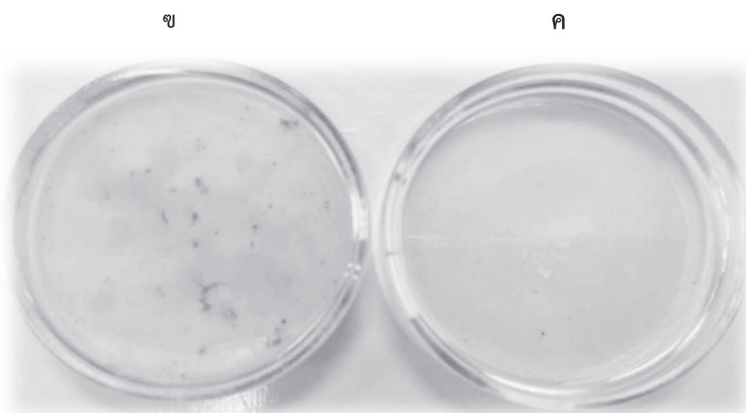
ภาพที่ 2 ลักษณะน้ำมันพืช (ก ไม่ผ่านการทอด ข ผ่านการทอด)

นำน้ำมันพืชที่ใช้แล้วมาหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนและกากอาหารออกจากน้ำมันที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนของน้ำมันไประเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำน้ำมันที่ได้ไปวิเคราะห์คุณลักษณะ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด (Acid value) และปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) ตามวิธีการมาตรฐาน Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration 664-01 (ZD-2A Potentiometric Titration) (Diasakou, 1998) ค่าสaponification (Saponification value) ตามวิธีการของ Diasakou (1998) และน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมัน (ZD-2A Potentiometric Titration) และวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของน้ำมัน (ATR-FTIR, Bruker รุ่น TENSOR 27) (Kumneadklang et al., 2012)

1.2 การผลิตไบโอเอทานอลและการวิเคราะห์ผล

นำน้ำมันที่ผ่านการเตรียมแล้วใส่ในขวดรูปชมพู่ให้ความร้อนถึง 60 องศาเซลเซียส เติมนีโอเพนอล อัตราส่วนโมล 6:1 ที่มีโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ผสมอยู่ร้อยละ 1 ลงในขวดรูปชมพู่ช้า ๆ กวนด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย้ายส่วนผสมที่ได้ใส่กรวยแยก ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จะได้ผลิตภัณฑ์แยกเป็นสองชั้น ชั้นบนคือไบโอดีเซล ส่วนชั้นล่างคือกลีเซอรอล (Suwanno et al., 2017) จากนั้นแยกไบโอดีเซลไประเหยเมทานอลออกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วนำไปล้างด้วยน้ำร้อน 80 องศาเซลเซียส จนน้ำที่ล้างใส ไม่มีสี ดังภาพที่ 3 และต้มไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไบโอดีเซลที่ได้ไปวิเคราะห์คุณลักษณะ ได้แก่ ค่าความ

เป็นกรด ร้อย-ละกรดไขมันอิสระ ค่าสปอนนิฟิเคชัน น้ำหนักโมเลกุลของไบโอดีเซล (ZD-2A Potentiometric Titration) หมู่ฟังก์ชันของไบโอดีเซล (ATR-FTIR) จุดไหลเท (Pour point) และจุดขุ่น (Cloud point) วิเคราะห์ตามวิธีของ Rakkan et al., 2017 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ และร้อยละผลผลิต (Yield) ของไบโอดีเซล $[ร้อยละผลผลิต = (น้ำหนักไบโอดีเซล/น้ำหนักน้ำมันพืชใช้แล้ว)*100]$ ในส่วนชั้นล่างคือ กลีเซอรอล นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 3 ลักษณะน้ำมัน (ข) ก่อนดำเนินการ ค หลังดำเนินการ

2. การผลิตไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้กลีเซอรอลจากการผลิตไบโอดีเซลร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมัน

การผลิตไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้กลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมันแบ่งออกเป็นสามชุดการทดลองโดยมีการเติมอาหาร แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชุดการทดลองการผลิตไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้กลีเซอรอลจากการผลิตไบโอดีเซลร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมัน

ชุดการทดลอง	อาหารเหลว Nutrient broth (NB) (มิลลิลิตร)	สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	เปปโตन (กรัมต่อลิตร)	กลีเซอรอล (ร้อยละ)	เส้นใยปาล์มน้ำมัน (ร้อยละ)
1	250	3	5	-	-
2	250	3	5	10	-
3	250	3	5	10	0.4

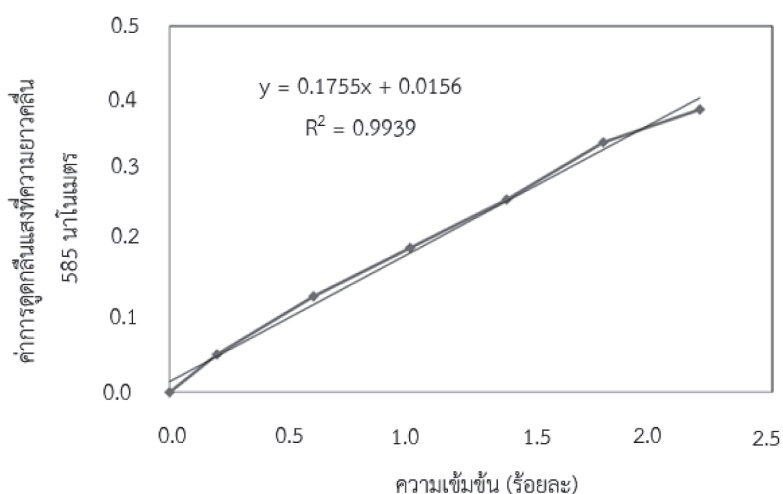
ชุดการทดลองที่ 2 และ 3 เป็นสถานะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต อ้างอิงจากงานวิจัย Kumneadklang (2012) และ (Sonnam et al., 2015) ตามลำดับ และชุดการทดลองทั้ง 2 ชุดการทดลองถูกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

นำชุดการทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลองไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมเชื้อ *C. necator* TISTR 1095 ร้อยละ 10 และเติมเชื้อ *S. cerevisiae* ร้อยละ 0.4 (Kumneadklang, 2012; Sonnam, 2015) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้ และวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเทคนิค ATR-FTIR โดยเปรียบเทียบกับ โครงสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา)

2.1 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.1.1 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Dinitrosalicylic colorimetric (DNS) นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีเอ็นเอส 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มให้เดือด 5 นาที ย้ายมาแช่ในน้ำเย็น 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu รุ่น UV-1601) ที่ 540 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐาน (Niwaswong, 2012)

2.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล นำตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก 2 มิลลิลิตร เขย่าและทิ้งไว้ให้แยกชั้น 30 นาที นำชั้นบนมาเติมโพแทสเซียมไดโครเมต 1.5 มิลลิลิตร เขย่าและทิ้งไว้ให้แยกชั้น 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างชั้นล่างวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร (เอทานอลที่ผลิตได้จะทำปฏิกิริยากับไดโครเมตเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสารละลายสีส้มเป็นสีเขียวแกมน้ำเงิน) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 4 (Niwaswong, 2012)



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.1.3 วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมานำเซลล์ไปใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Sonnam, 2015)

2.1.4 วิเคราะห์หาปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต คำนวณหาร้อยละ (กรัมต่อลิตร) ความเข้มข้น (ร้อยละต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามวิธีการของ Sonnam (2015)

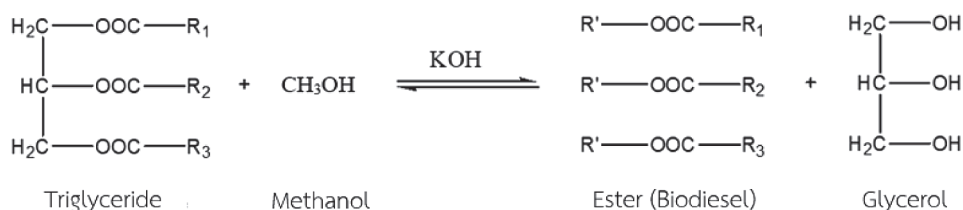
2.1.5 วิเคราะห์เอสเทอร์ วิเคราะห์ร้อยละผลผลิต และวิเคราะห์ ATR-FTIR ตามวิธีการของ Suwanno et al. (2017)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้วด้วยกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยมีโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1.1 วิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำมันพืชใช้แล้ว ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว และไบโอดีเซลทางการค้า

จากผลการทดลองการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วดังสมการเคมีในภาพที่ 5 ให้ร้อยละผลผลิตอยู่ที่ 90.92 ± 0.06 และมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 96.50 ± 0.01 คุณลักษณะของน้ำมันพืชใช้แล้ว ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วและไบโอดีเซลทางการค้า แสดงดังตารางที่ 2 โดยพบว่าค่าความเป็นกรด (มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน) ปริมาณกรดไขมันอิสระ (ร้อยละ) ค่าสaponification ของไบโอดีเซลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันพืชก่อนดำเนินการจาก 4.08 ± 0.03 1.86 ± 0.01 และ 207.00 ± 0.22 ตามลำดับ เปลี่ยนเป็น 0.45 ± 0.02 0.21 ± 0.02 และ 153.30 ± 0.15 ตามลำดับ ในทางกลับกันน้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล) จุดขุ่น (องศาเซลเซียส) และจุดไหลเท (องศาเซลเซียส) เพิ่มขึ้นจาก 258.35 ± 0.22 14.00 ± 1.00 และ 14.00 ± 1.00 ตามลำดับ เพิ่มขึ้นเป็น 352.63 ± 0.15 18 และ 16 อย่างไรก็ตามจากตารางแสดงให้เห็นว่าไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานของกรมธุรกิจพลังงาน



ภาพที่ 5 สมการเคมีของการผลิตไบโอดีเซล

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของน้ำมันพืชใช้แล้ว ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว และไบโอดีเซลทางการค้า

คุณลักษณะ	น้ำมันพืช ที่ใช้แล้ว	ไบโอดีเซล	ไบโอดีเซล ทางการค้า	มาตรฐาน กรมธุรกิจ พลังงาน
ค่าความเป็นกรด (มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมไขมัน)	4.08±0.03	0.45±0.02	0.5	ไม่สูงกว่า 0.5
ปริมาณกรดไขมันอิสระ (ร้อยละ)	1.86±0.01	0.21±0.02	0.23	-
ค่าสaponิฟิเคชัน	207.00±0.22	153.30±0.15	-	-
น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	258.35±0.22	352.63±0.15	-	-
จุดขุ่น (องศาเซลเซียส)	14.00±1.00	18	-	รายงาน
จุดไหลเท (องศาเซลเซียส)	14.00±1.00	16	10-16	รายงาน
ผลผลิต (ร้อยละ)	-	90.92±0.06	-	-
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ร้อยละ)	-	96.50±0.01	96.5	ไม่ต่ำกว่า 96.5

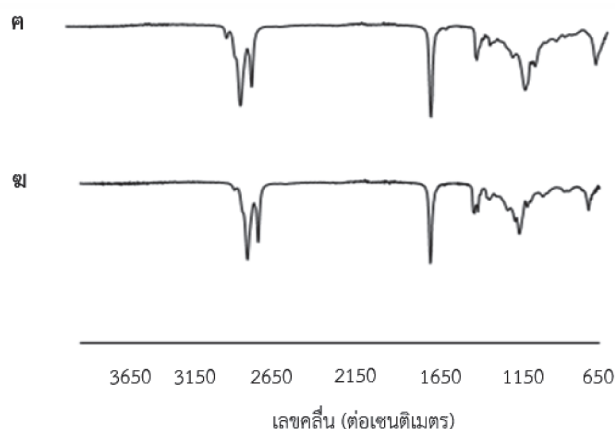
ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน จะถูกนำมาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) โดยเปรียบเทียบระหว่าง น้ำมันพืชใช้แล้ว ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว และไบโอดีเซลทางการค้าดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 หมู่ฟังก์ชันของน้ำมันพืชใช้แล้ว ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว และไบโอดีเซลทางการค้า วิเคราะห์
โดยวิธี ATR-FTIR

ประเภทการสั่น (ต่อเซนติเมตร)	น้ำมันพืชที่ใช้แล้ว	ไบโอดีเซลผลิต จากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว ^a	ไบโอดีเซลทางการค้า
C=O Stretching (ester)	1744	1742	1742
C-H Stretching	2923	2925	2924
-OCH ₃	-	1196, 1437	1196, 1437
C-O	1158	1169	1169

เมื่อ ก คือไบโอดีเซลทางการค้าจาก บจ. กรีนเพาเวอร์คอร์ปอเรชั่น จังหวัดชุมพร ที่ผลิตโดยวิธี ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน

สเปกตรัม ATR-FTIR ของไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ ส่วนใหญ่จะคล้ายกับไตรกลีเซอไรด์หรือน้ำมันพืชใช้แล้ว ดังภาพที่ 6 แต่จะมีแตกต่างกันที่เลขคลื่น 100-1500 ต่อเซนติเมตร ตารางที่ 3 แสดงหมู่ฟังก์ชันของน้ำมันพืชใช้แล้ว ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว และไบโอดีเซลทางการค้า ที่วิเคราะห์โดยวิธี ATR-FTIR พบว่าที่เลขคลื่น 1196 และ 1437 ต่อเซนติเมตร แสดงการอและการสั่นสะเทือน (Bending and Oscillating vibrations) ของ $-OCH_3$ แต่ไม่พบในสเปกตรัมของไตรกลีเซอไรด์ แต่จะเจอ $-OCH_2$ และ $-OCH$ แทน นอกจากนั้นที่เลขคลื่น 1158 ต่อเซนติเมตร ของไตรกลีเซอไรด์ยังพบการยืดของ C-O ที่เกิดพันธะอยู่กับ $-CH_2$ แต่สเปกตรัมของ ไบโอดีเซลจะพบการยืดของ C-O ที่เลขคลื่น 1169 ต่อเซนติเมตร เนื่องจาก C-O ที่เกิดพันธะอยู่กับ $-CH_3$ และพบว่าที่ 3500 ต่อเซนติเมตร ไม่ปรากฏพีค $-OH$ ของกลีเซอรอล และเมทานอล แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ เมื่อเทียบสเปกตรัมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว และไบโอดีเซลทางการค้าพบว่า มีลักษณะเลขคลื่นที่เหมือนกัน รวมถึงค่าความเป็นกรด ปริมาณกรดไขมัน จุดขุ่น และจุดไหลเท จึงสามารถยืนยันว่าผลผลิตที่ได้เป็นไบโอดีเซล (Rafati et al., 2018)

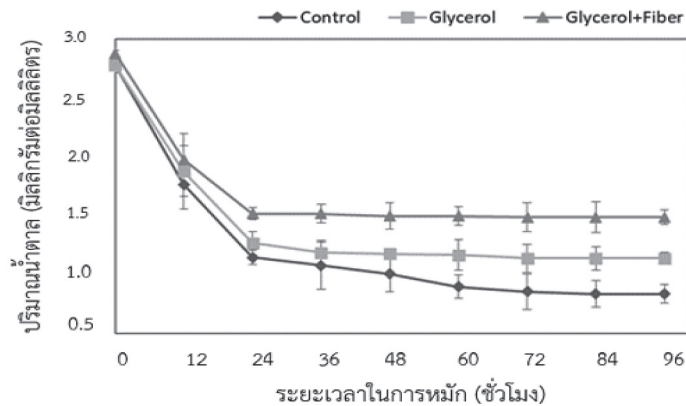


ภาพที่ 6 สเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วย ATR-FTIR (ค ก่อนดำเนินการ ข หลังดำเนินการ)

2. การผลิตไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้กลีเซอรอลจากการผลิตไบโอดีเซลร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมัน

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

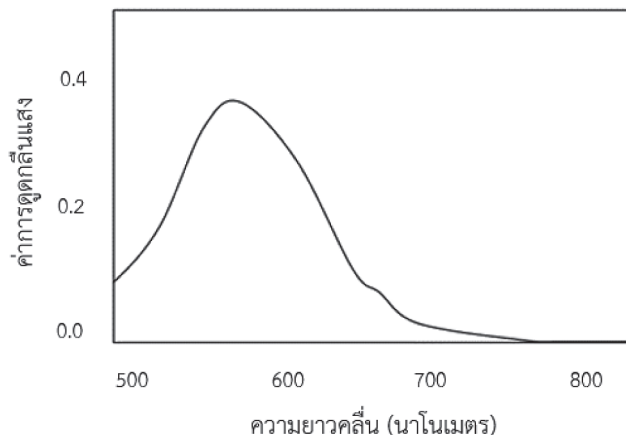
จากการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าทั้งสามชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 2.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งเกิดจากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของ *C. necator* TISTR 1095 และ *S. cerevisiae* เพื่อสร้างเซลล์ ไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดังภาพที่ 7



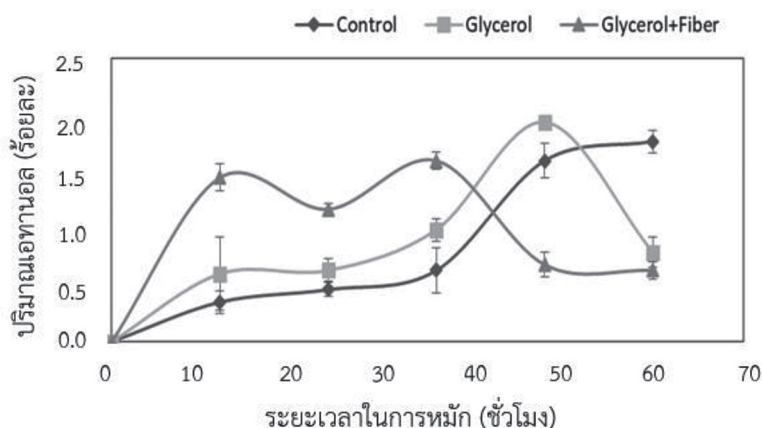
ภาพที่ 7 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลา 0-96 ชั่วโมง

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

จากการวิเคราะห์หาความยาวคลื่นสูงสุดพบว่าไบโอเอทานอลดูดกลืนแสงที่มีความยาวสูงสุดเท่า 585 นาโนเมตร และผลทดลองทั้งสามชุดการทดลองพบว่าปริมาณเอทานอลเพิ่มเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป ดังภาพที่ 8 เนื่องจากเชื้อ *S. cerevisiae* จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักเปลี่ยนไปเป็นไบโอเอทานอล และพบว่าชุดการทดลองที่ 2 ประกอบด้วยอาหารเหลว NB เสริมด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 10 ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณไบโอเอทานอลสูงสุดร้อยละ 1.94 ดังภาพที่ 9 ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *S. cerevisiae* จะผลิตไบโอเอทานอลในช่วง 0 ถึง 60 ชั่วโมง (Kumneadklang, 2012)



ภาพที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของไบโอเอทานอล



ภาพที่ 9 แสดงปริมาณเอทานอลที่เวลา 0-60 ชั่วโมง

2.3 การวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

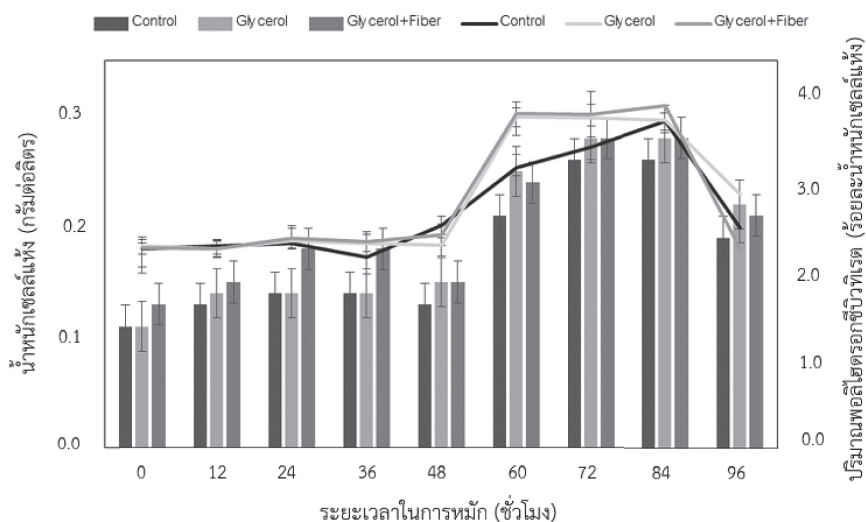
ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จาก *C. necator* TISTR 1095 จะถูกนำมาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค ATR-FTIR โดยเปรียบเทียบระหว่างโครงสร้างพอลิเมอร์ที่สกัดได้และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้าแสดงดังตารางที่ 4 จากผลการทดลองพบว่าพอลิเมอร์ที่สกัดได้มีหมู่ฟังก์ชัน C=O ที่เลขคลื่น 1559 ต่อเซนติเมตร ซึ่งเป็นการยืดของเอสเทอร์ของสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (Padernshoke et al., 2004) ซึ่งสอดคล้องกับหมู่ เอสเทอร์ คาร์บอนิล แสดงการยืดของหมู่เอสเทอร์ หมู่ C-O ที่เลขคลื่น 1275 1129 และ 1043 ต่อเซนติเมตร และแสดงการงอแบบสมมาตรของ C-H ที่เลขคลื่น 2957 และ 2918 ต่อเซนติเมตร นอกจากนี้ที่เลขคลื่น 3400 ต่อเซนติเมตร ยังสัมพันธ์กับ terminal -OH (Ramezan et al., 2014) การยืนยันโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *C. necator* TISTR 1095 ด้วยเทคนิค ATR-FTIR จากผลการทดสอบบ่งชี้ว่าสารที่สกัดได้นั้นมี หมู่ฟังก์ชันคล้ายกับพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

ตารางที่ 4 ข้อมูล ATR-FTIR ของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้าและพอลิเมอร์จาก *C. necator* TISTR 1095

ประเภทการสั่น (ต่อเซนติเมตร)	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตทางการค้า	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต <i>C. necator</i> TISTR
O-H Stretching	-	3400
CH ₃ Stretching	2973	2957
CH ₂ Stretching	2930	2918
C=O Stretching	1720	1559
C-O Stretching	1275 1129 และ 1043	1279 1129 และ 1044

2.4 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการทดลองพบว่าชุดการทดลองที่สามซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลว NB เสริมด้วย กลีเซอรอล ร้อยละ 10 ร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมันร้อยละ 0.4 มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต สูงสุดร้อยละ 3.98 และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 84 ชั่วโมง **ภาพที่ 10** เนื่องจากแบคทีเรียย่อยสลายกลีเซอรอล และเส้นใยปาล์มน้ำมัน ประกอบกับมีแหล่งไนโตรเจนที่มากพอทำให้การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bhandasak et al. (2018) พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างต่อเนื่อง เมื่อใช้ *P. fluorescens* TISTR 358 โดยมีกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ 72 ชั่วโมง ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.1



ภาพที่ 10 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เวลา 0-96 ชั่วโมง

สรุป

โลกปัจจุบันเกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมมากมายโดยส่วนใหญ่มาจากฝีมือมนุษย์ เช่น การใช้พลังงาน และพลาสติกที่เพิ่มขึ้น รวมถึงสิ่งเหล่านี้มีราคาแพง เพื่อขจัดปัญหาเหล่านี้ดังนั้นพวกเราจึงได้ศึกษาพลังงาน และพลาสติกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยการวิจัยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรกเป็นผลิต ไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้วร่วมกับเมทานอล โดยมีโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไบโอดีเซลสูงถึงร้อยละ 90.92 ± 0.06 จากการวิเคราะห์ด้วย ATR-FTIR พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีองค์ประกอบของเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 96.06 ± 0.01 ค่าความเป็นกรด (มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมน้ำมัน) กรดไขมันอิสระ (ร้อยละ) ค่าสaponification น้ำหนักโมเลกุลของไบโอดีเซล (กรัมต่อโมล) (Potentiometric Titration) จุดไหลเท (องศาเซลเซียส) และจุดขุ่น (องศาเซลเซียส) เท่ากับ 0.45 ± 0.02 0.21 ± 0.02 153.30 ± 0.15 352.00 ± 0.15 18 และ 16 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบสมบัติตามมาตรฐานของกรมธุรกิจพลังงาน พบว่าไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ในส่วนของการทดลองที่สองเป็นการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลในขั้นตอนแรกพร้อมกับเส้นใยปาล์มน้ำมัน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตไบโอเอทานอลและ

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้ *C. necator* TISTR 1095 และ *S. cerevisiae* ด้วยกระบวนการหมักแบบกะเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง พบว่าชุดการทดลองที่สองประกอบด้วยอาหารเหลว NB เสริมด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 10 มีปริมาณเอทานอลสูงสุดร้อยละ 1.94 ที่เวลา 48 ชั่วโมง และพบว่าชุดการทดลองที่สามมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดร้อยละ 3.98 มีน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลว NB เสริมด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 10 ร่วมกับเส้นใยปาล์มน้ำมันร้อยละ 0.4 ที่เวลา 84 ชั่วโมง และจากการยืนยันโครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้เทคนิค ATR-FTIR

จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว กลีเซอรอล และเส้นใยปาล์มน้ำมัน ซึ่งเป็นของเสียที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล ไบโอเอทานอลและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการนำวัตถุดิบเหล่านี้มาใช้เป็นสารตั้งต้นเป็นการสร้างมูลค่าของเสีย ลดภาระและค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสีย อีกทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่สนับสนุนสถานที่ และอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในการสนับสนุนผ่านทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) หมายเลขทุน PHD/00073/2559

เอกสารอ้างอิง

- Banerjee, N., Ramakrishnan, R., & Jash, T. (2014). Biodiesel production from used vegetable oil collected from shops. *Energy Procedia*, **54**, 161-165.
- Bhandasak, T., Ponchumni, P., Tanikku, P., Sawasdee, V., & Sawasdee, N. (2018). Polyhydroxyalkanoates production from fatty acids of palm oil using *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358. *The Journal of Industrial Technology*, **14**(3), 1-14.
- Diasakou, M. (1998). Kinetics of the non-catalytic transesterification of soybean oil. *Fuel*, **77**, 1297-1302.
- Kawentar, W.A., & Budiman, A. (2013). Synthesis of biodiesel from second-used cooking oil. *Energy Procedia*, **32**, 190-199.
- Kumneadklang, S., Arhma, A., Sangkarak, K., & O-Thong, S. (2012). Ethanol production from chemical pretreated oil palm trunk by yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Thaksin University Journal*, **15**(3), 116-123.
- Luque, R., Lovett, J.C., Clancy, J., Campelo, J.M., & Romero, A.A. (2010). Biodiesel as feasible petrol fuel replacement: a multidisciplinary overview. *Energy & Environmental Science*, **3**(11), 1706-1721.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, 717-724.
- Niwaswong, C., & Ruangviriyachai, C. (2012). Production of cellulosic ethanol in thailand. *KKU Science Journal*, **40**(4), 1073-1088.

- Padermshoke, A., Katsumoto, Y., Sato, H., Ekgasit, S., & Noda, I.(2004). Surface melting and crystallization behavior of polyhydroxyalkanoates studied by attenuated total reflection infrared spectroscopy. **Polymer**, **45**, 6547-6554.
- Phol-in, S. (2011). **Screening and production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by marine Microorganism**. Master Thesis, Department of Biotechnology Silpakorn University. (in Thai)
- Rafati, A., Tahvildari, K., & Nozari, M. (2018). Production of biodiesel by electrolysis method from waste cooking oil using heterogeneous MgO-NaOH nano catalyst. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, 1-14.
- Rakkan, T., Suwanno, S., Paichid, N., Yunu, T., Klomklao, S., & Sangkharak, K.(2017).Optimized synthesis method for transesterification of residual oil from palm oil mill effluent and lipase from pacific white shrimp (*Litopenaeus Vannamei* hepatopancreas to environmentally friendly biodiesel. **Fuel**, **209**, 309-314.
- Ramezani, M., Amoozegar, M.A., & Ventosa, A. (2015). Screening and comparative assay of polyhydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhooni Wetland in Iran and evaluation of poly-β-hydroxybutyrate production by halotolerant bacterium *Oceanimonas* sp. GK1. **Annals of Microbiology**, **65**(1), 517–526.
- Sonnam, S., Yunu, T., Paichid, N., & Sangkharak, K. (2015). Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Alcaligenes eutrophus* and its application. **Thaksin University Journal**, **18**(1), 49-56.
- Suksawat, S., & Pathom-aree, W. (2012). The role of bacteria on bioplastic. **Srinakhrinwirot Science Journal**, **28**(2). (in Thai).
- Suwanno, S., Rakkan, T., Yunu, T., Paichid, N., Kimtun, P., Prasertsan, P., & Sangkharak, K. (2017). The production of biodiesel using residual oil from palm oil mill effluent and crude lipase from oil palm fruit as an alternative substrate and catalyst. **Fuel**, **195**, 82-87.