บทที่ 5

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารเคมีและความร้อนในการปรับสภาพผักตบชวาก่อนนำมาย่อยสลาย พบว่า การใช้ด่างร่วมกับความร้อนจัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการวิจัยนี้ โดยให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มีค่า 52 ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับทดลองของ Marton และ Granzow (107) ที่ศึกษาการใช้ด่างในการกำจัดลิกนินในไม้จำพวกสน แต่การปรับสภาพของผักตบชวาจะใช้เวลาที่สั้นกว่า และความเข้มข้นน้อยกว่า เนื่องจากปริมาณลิกนินของผักตบชวาก่อนปรับสภาพที่ค่าต่ำกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ Martin และคณะ (107) ได้สรุปว่าการใช้ด่างจะมีผลลดปริมาณลิกนินได้สูงสุด เมื่อทำการปรับสภาพชานอ้อยโดยใช้ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถให้การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการปรับความเข้มข้นเอนไซม์เป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 72 ชั่วโมง

นอกจากนี้ Tarkow (108) รายงานว่าด่างจะช่วยให้เส้นใยเซลลูโลสเกิดการพองน้ำเพิ่มความสามารถในการอมน้ำ โดยเกิด ammonolysis ของ intermolecular esterbonds ทำให้เพิ่มการแพร่ของเอนไซม์ เข้าไปในโครงสร้างผนังเซลล์ของพืชได้มากขึ้น

เมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูโลสจาก Trichoderma reesei ต่อการย่อยสลายผักตบชวาพบว่า ที่ช่วงความเข้มข้นสูง ๆ 35-60 หน่วย FPU ต่อกรัมผักตบชวาไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ทั้งนี้อาจเพราะการใช้ด่างที่มีความเข้มข้นสูง ๆ อาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส โดยผลิตภัณฑ์นี้ดังกล่าว คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส (61) ดังนั้น โดยสาเหตุนี้จึงต้องใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซีเดสจากเชื้อ Aspergillus niger ซึ่งจะเปลี่ยนเซลลูโลสในรูปของเซลโลไบโอสเป็นกลูโคสได้ ซึ่งเมื่อทดลองใช้เอนไซม์นี้ พบว่าการแปรเปลี่ยนผักตบชวาไปเป็นน้ำตาลกลูโคสเกิดได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และ 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซีเดสจะไปย่อยเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคสอีกทั้งยังเป็นการป้องกันไม่ให้เซลโลไบโอสไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสด้วย (5) พบว่าอัตราส่วนหน่วย FPU ของเซลลูเลส ต่อหน่วยเอนไซม์เบต้า-กลูโคสซีเดสที่เหมาะสมมีค่า 30 FPU ต่อ 30 หน่วยเอนไซม์ต่อกรัมของผักตบชวา

เมื่อทดลองหาความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการย่อยโดยสารผสมของเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส พบว่าหากมีการเพิ่มปริมาณของสับสเตรทถึงระดับหนึ่งแล้ว การย่อยสลายโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์มีทั้งสอง จะลดลงถึงแม้ว่ามีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ทั้งสอง ซึ่งตรงกับรายงานของ Spano และคณะ (109) ซึ่งอธิบายว่าปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้น เนื่องจากการเพิ่มปริมาณวัตถุดิบที่เกินกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นการยากในการผสม และการเกิด low bulk density ของผักตบชวารวมทั้งปริมาณกลูโคสและเซลโลไบโอสที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณผักตบชวาจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคสซิเดส ทำให้ระดับการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคสมีค่าลดลง

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูโลสจาก Trichoderma reesei 30 FPU และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากเชื้อ Aspergillus niger 30 หน่วยเอนไซม์ต่อกรัมผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพในปริมาณผักตบชวา 10 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะอุณหภูมิการย่อยสลาย 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 4.8 ในเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวามาเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักอาซีโตน-บิวทานอล โดยเชื้อคลอสตริเดียม 3 สายพันธุ์ อันได้แก่ Cl. acetobutylicum ATCC 824, Cl. butylicum NRRL B592 และ Clostridum สายพันธุ์ 8p-2 ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย จากผลการทดลองในระดับหลอดทดลองและขวดเขย่า พบว่า Cl. butylicum NRRL B592 สามารถเจริญเติบโตผลิตตัวทำละลายได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Cl. acetobutylicum ATCC 824 และ Clostridum สายพันธุ์ 8p-2 ให้ปริมาณตัวทำละลายน้อยที่สุด (ตารางที่ 15 และ 16)

การศึกษาการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในถังหมัก โดย Cl. butylicum NRRL B592 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า เชื้อสามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาถึงค่าจลน์ศาสตร์ (ตารางที่ 33) ปรากฏว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงกว่า แต่มีค่าของอัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะ (ν_{sol}) ต่ำที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากว่าแม้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนรวดเร็ว แต่ก็ให้ผลิตภัณฑ์ในรูปของกรดอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ในช่วงแรก (ν_{ac} มีค่าสูง) ซึ่งให้ปริมาณกรดอะเซติคถึง 8.9392

กรัมต่อลิตร ทำให้มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตช่วงต่อไป ผลที่ได้คือ เชื้อผลิตตัวทำละลายได้ในปริมาณต่ำ ส่วนที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส ผลของ มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการสร้างตัวทำละลายในอัตราต่ำกว่า และให้ปริมาณตัวทำละลายน้อยกว่า ดังนั้นอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส จึงเหมาะสมในการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ต่อไป

ในตารางที่ 19 แสดงผลที่ได้จากการหมักที่ภาวะความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน เนื่องจากในงานวิจัยนี้ ใช้แอมโมเนียไฮดรอกไซด์เป็นตัวปรับสมดุลย์ของความเป็นกรดด่างของน้ำหมักจะเห็นว่าการไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างสามารถผลิตอาซีโตน-บิวทานอลได้ดีกว่าภาวะที่ควบคุมความเป็นกรดด่าง และเมื่อเปรียบเทียบผลทางจลน์ศาสตร์ (ตารางที่ 20) สภาพที่ควบคุมความเป็นกรดด่างให้ค่า ต่ำกว่าที่สภาวะไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณแอมโมเนียมอิออน (NH_4^+) ที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลต่อค่า Ionic strenght ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อ Cl. butylicum NEEL B592 เจริญเติบโตไม่ค่อยดีที่สภาพควบคุมความเป็นกรดด่าง จึงทำให้มีผลกระทบต่อการสร้างตัวทำละลายด้วย (ν_{sol} มีค่าต่ำ) และเมื่อพิจารณาที่ภาวะควบคุมความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างสูง (6.0 และ 6.5) เชื้อมีการสร้างกรดดีกว่า (ν_{ac} มีค่าสูง) ที่ความเป็นกรดด่างต่ำ (5.5) ทำให้มีอัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะ (ν_{sol} มีค่าสูง) สำหรับการหมักที่ภาวะไม่ควบคุมนั้น จะไม่มีการเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ลงไปจึงมีผลต่อระบบคือ

1. ทำให้อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อปริมาณกลูโคสมีค่าต่ำ ทำให้มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในวิถีเมตาบอลิซึมของการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดย $NADH_2$ กับ FdH_2 เลื่อนไปเป็นการผลิต $NADH_2$ มากกว่า ช่วยให้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดบิวทีริคเป็นบิวทานอลเกิดได้ดีขึ้น (110)

2. อาจมีอิทธิพลของโซเดียมไอออนบางส่วนที่เติมลงไปเพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่เลี้ยงเชื้อเริ่มต้น มีผลกระทบต่อสมดุลย์การแตกตัวของกรดอ่อน (กรดบิวทีริค, กรดอะเซติค) ที่เชื้อสร้างขึ้น Greorge และ Chen (111) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การแตกตัวของกรดเหล่านี้มีผลต่อการปรับสมดุลย์ของค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ให้สัมพันธ์กับการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบางส่วนของกรดสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปเพื่อช่วยในการรักษาค่าความเป็นกรดด่างของเซลล์ให้คงที่ ดังนั้น โซเดียมไอออน อาจไปมีผลต่อการเลื่อน (shift) จากภาวะการสร้างกรดให้เปลี่ยนเป็นการสร้างตัวทำละลาย

สรุปได้ว่าการไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างจะเหมาะสมต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล จากผักตบชวามากกว่าการควบคุม

สำหรับการหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการหมักนั้น (ตารางที่ 21) พบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ให้ค่า μ ที่สูงกว่าการหมักที่ความเข้มข้น 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ ปริมาณน้ำตาลสูงจะมีผลยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Substrate Inhibition) ทำให้ปริมาณกรดที่ผลิตได้ไม่สูงพอที่จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต ดังนั้นเชื้อจึงสามารถเปลี่ยนกรดให้เป็นตัวทำละลายได้ดีกว่า (ν_{sol} มีค่าสูง) แต่ให้ปริมาณตัวทำละลายต่ำกว่าการหมักที่ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่า μ และ ν_{sol} รองลงมา โดยได้ปริมาณตัวทำละลายสูงถึง 16.3811 กรัมต่อลิตร ส่วนการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตรนั้น เชื้อเจริญเติบโตได้ไม่ดี (μ ต่ำ) และมีน้ำตาลเหลือภายหลังการหมักถึง 16.1 กรัมต่อลิตร แสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลมากขึ้น ตัวทำละลายจะไม่เพิ่มขึ้นตามและปริมาณน้ำตาลที่มากเกินพอ มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการยับยั้งตัวทำละลาย (ν_{sol} มีค่าต่ำ)

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดย Cl. butylicum NRRL B592 คือ อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจากการย่อยสลายผักตบชวา 60 กรัมต่อลิตร สำหรับพฤติกรรมการเจริญเติบโตของเชื้อโดยดูจากการเปลี่ยนแปลงค่าต่าง ๆ ทางจลน์ศาสตร์นั้น (รูปที่ 47) เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์พร้อมกับการสร้างกรดอินทรีย์ เมื่อกรดถูกสร้างขึ้นในปริมาณที่เหมาะสมจะมีผลทำให้เชื้อเปลี่ยนภาวะไปเป็นการสร้างตัวทำละลาย พร้อมกับมีการลดลงของปริมาณกรดในน้ำหมัก โดยกรดถูกเปลี่ยนเป็นตัวทำละลาย อันได้แก่ บิวทานอล อาซิโตน และเอธานอล ปริมาณบิวทานอลที่สร้างขึ้นนี้มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ที่ความเข้มข้นบิวทานอลที่สูงเกินกว่า 9.7 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 48) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและหยุดการสร้างตัวทำละลายในชั่วโมงที่ 36 โดยในช่วงนี้เซลเริ่มสลายตัวกลายเป็นสปอร์

ตารางที่ 24 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดย Cl. butylicum NRRL B592 เมื่อใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อสามารถใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวาเพื่อผลิตบิวทานอลและอาซีโตนอยู่ในเกณฑ์ที่ดี กล่าวคือจากผักตบชวาแห้งหลังการปรับสภาพ 1 กิโลกรัม จะให้ปริมาณตัวทำละลายรวมได้ปริมาณ 251.03 กรัม

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล โดย Cl. butylicum NRRL B592 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายวัตถุดิบประเภทต่าง ๆ

สารอาหาร	μ สูงสุด (ชม.$^{-1}$)	$Y_{s/l}$ สูงสุด (x 10^{-12}) (กรัม/จำนวนเซลล์-ชม.)	% การเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายรวม	ปริมาณตัวทำละลายรวม (ก./ล.)	เอกสารอ้างอิง
น้ำตาลจากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง	0.247	0.090	24.41	12.56	14
น้ำตาลจากการย่อยมันสด	0.174	0.0761	27.83	14.64	14
น้ำตาลจากการย่อยสลายผักตบชวา	0.2364	0.2413	34.38	16.3811	งานวิจัยนี้
น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์	0.312	0.316	39.73	16.41	14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้น ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่าผักตบชวาสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลได้ดี นับเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มคุณค่าของวัชชพืชให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ทางเคมี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย