บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการปรับสภาพผักตบชวาต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคซิเดส

เมื่อทดลองปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ อันได้แก่ การใช้กรด, ด่างและความร้อนภายใต้ความดัน พบว่า กรรมวิธีต่าง ๆ เหล่านี้สามารถเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายผักตบชวาโดยเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคซิเดสเมื่อบ่มผักตบชวาที่ได้รับการปรับสภาพกับเอนไซม์ในปริมาณ 20 หน่วยต่อกรัมผักตบชวาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่างที่ 4.8

1.1 การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริค

จากรูปที่ 16 แสดงผลการย่อยสลายผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 1-3 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้องในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มีค่ามากขึ้น เมื่อเทียบกับผักตบชวาที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ ซึ่งมีค่าเพียง 14 เปอร์เซนต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง แต่การเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกจาก 1 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์นั้น จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์มากนัก รวมทั้งเวลาในการปรับสภาพที่เพิ่มขึ้นก็ไม่มีผลมากเช่นกัน การย่อยสลายให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ดีที่สุด เมื่อทำการปรับสภาพโดยใช้ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 2 ชั่วโมง โดยให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 42.0 ที่เวลา 72 ชั่วโมง

1.2 การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน

ผลการทดลองการย่อยสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพ โดยใช้ด่างโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ พบว่าจะช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายผักตบชวาของเอนไซม์ โดยพบว่าตัวแปรความเข้มข้น, อุณหภูมิและเวลาในการปรับสภาพจะมีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปที่ 18 พบว่าการใช้ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะให้ผลการย่อยสลายได้ดีที่สุดประมาณ 52.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง

รูปที่ 15 ลักษณะของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ

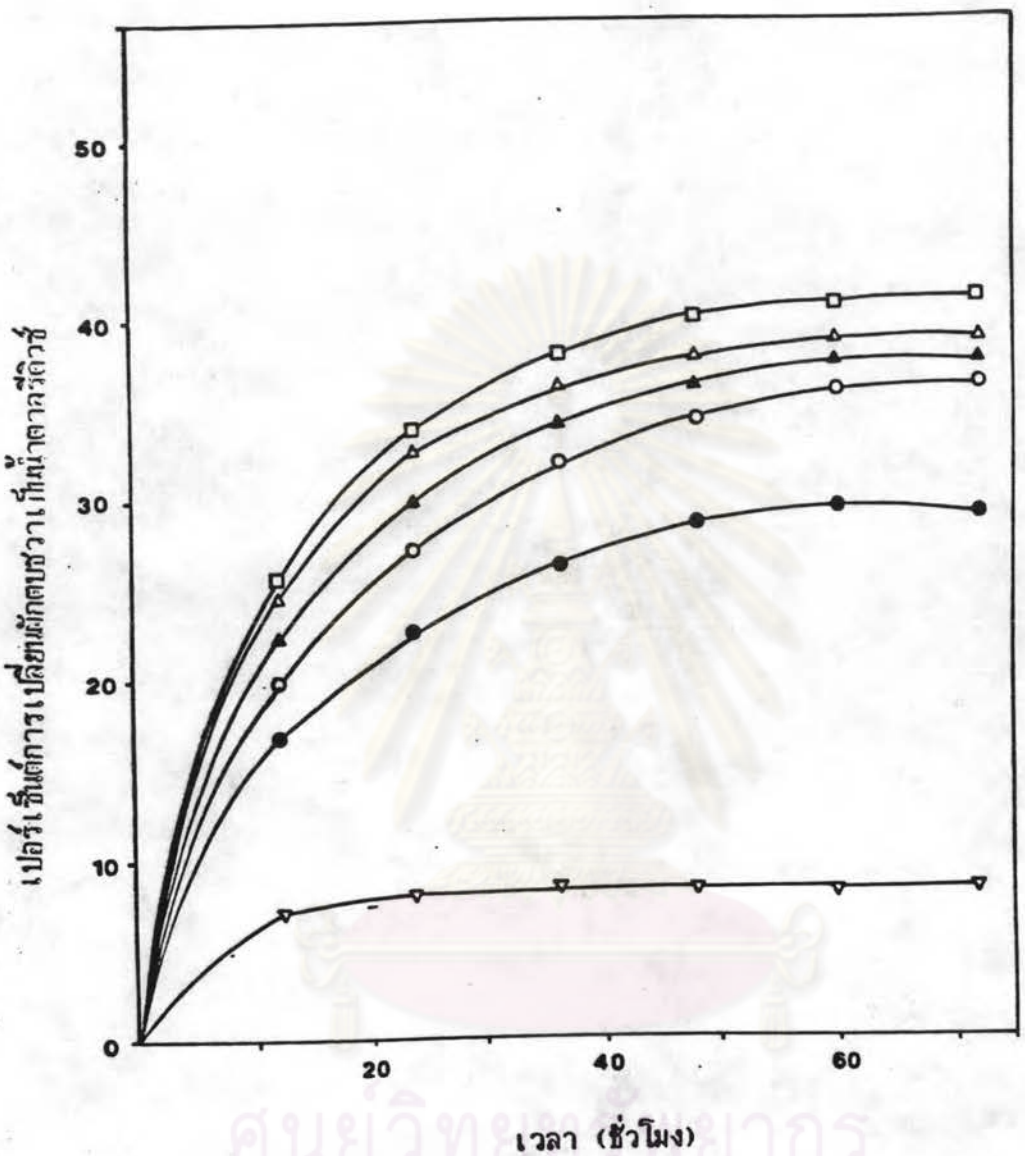
1.3 การปรับสภาพด้วยความร้อนภายใต้ความดัน

สำหรับการปรับสภาพโดยการใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆ พบว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โดยให้น้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น เมื่อเทียบกับผักตบที่ไม่ได้ปรับสภาพ ดังแสดงในรูปที่ 18 ผลของการเพิ่มเวลาในการอบด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิสูงนี้ในช่วงต่าง ๆ พบว่าเวลาที่เพิ่มขึ้นไม่ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันนัก การปรับสภาพในช่วงเวลา 1.5 ชั่วโมง จะให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดเป็น 47.4 ที่เวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อสรุปผลการทดลองดังตารางที่ 13 พบว่าการปรับสภาพด้วยด่าง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เมื่อเทียบกับอีก 2 วิธีการ โดยให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด

ตารางที่ 13 ผลการย่อยสลายผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ

การปรับสภาพเบื้องต้น	% การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ผักตบชวาที่ไม่มีการปรับสภาพ	12.0	14.0	14.2
5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายกรดซัลฟูริก อุณหภูมิห้อง, 2 ชั่วโมง	34.0	40.0	42.0
4 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 100 องศาเซลเซียส, 30 นาที	48.0	51.0	52.0
การใช้ไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส 1.5 ชั่วโมง	39.0	46.0	47.4



รูปที่ 16 ผลการย่อยสลายผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับเบต้า-กลูโคซิสเคส 20 หน่วย ต่อกรัมผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 4.8

▽ ผักตบชวาที่ไม่ได้ถูกปรับสภาพ

● 1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริก, อุณหภูมิห้อง, 10 นาที

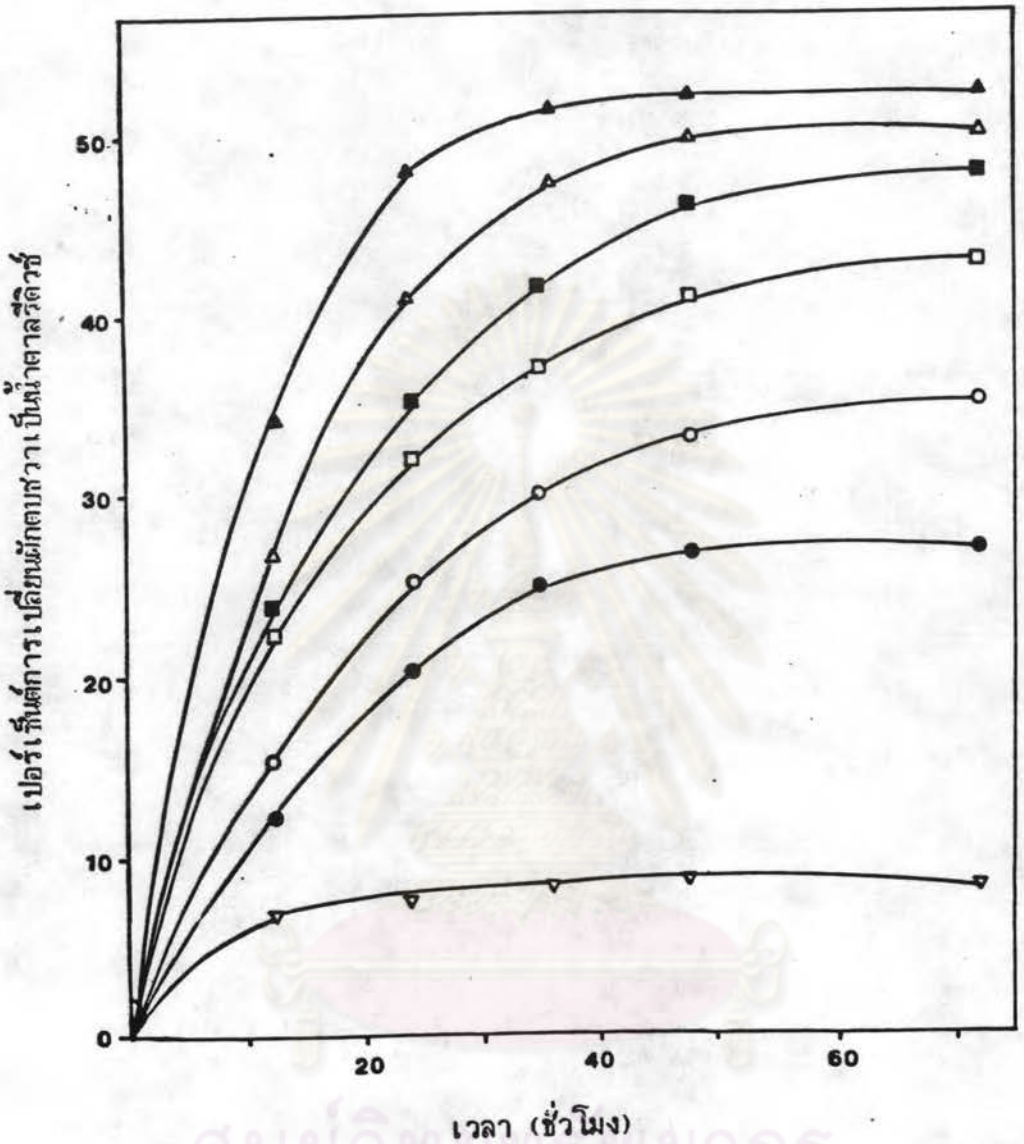
○ 3 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริก, อุณหภูมิห้อง, 15 นาที

▲ 3 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริก, อุณหภูมิห้อง, 30 นาที

△ 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริก, อุณหภูมิห้อง, 1 ชั่วโมง

□ 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายกรดซัลฟูริก, อุณหภูมิห้อง, 2 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 ผลการย่อยสลายผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน โดยแปรผันความเข้มข้น, อุณหภูมิและเวลาในการปรับสภาพ เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเบต้า-กลูโคซิสเดส 20 หน่วย ต่อกรัมผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 4.8

▽ ผักตบชวาที่ไม่ได้ถูกปรับสภาพ

● 1 เปอร์เซ็นต์, อุณหภูมิห้อง, 15 นาที

○ 4 เปอร์เซ็นต์, อุณหภูมิห้อง, 13 นาที

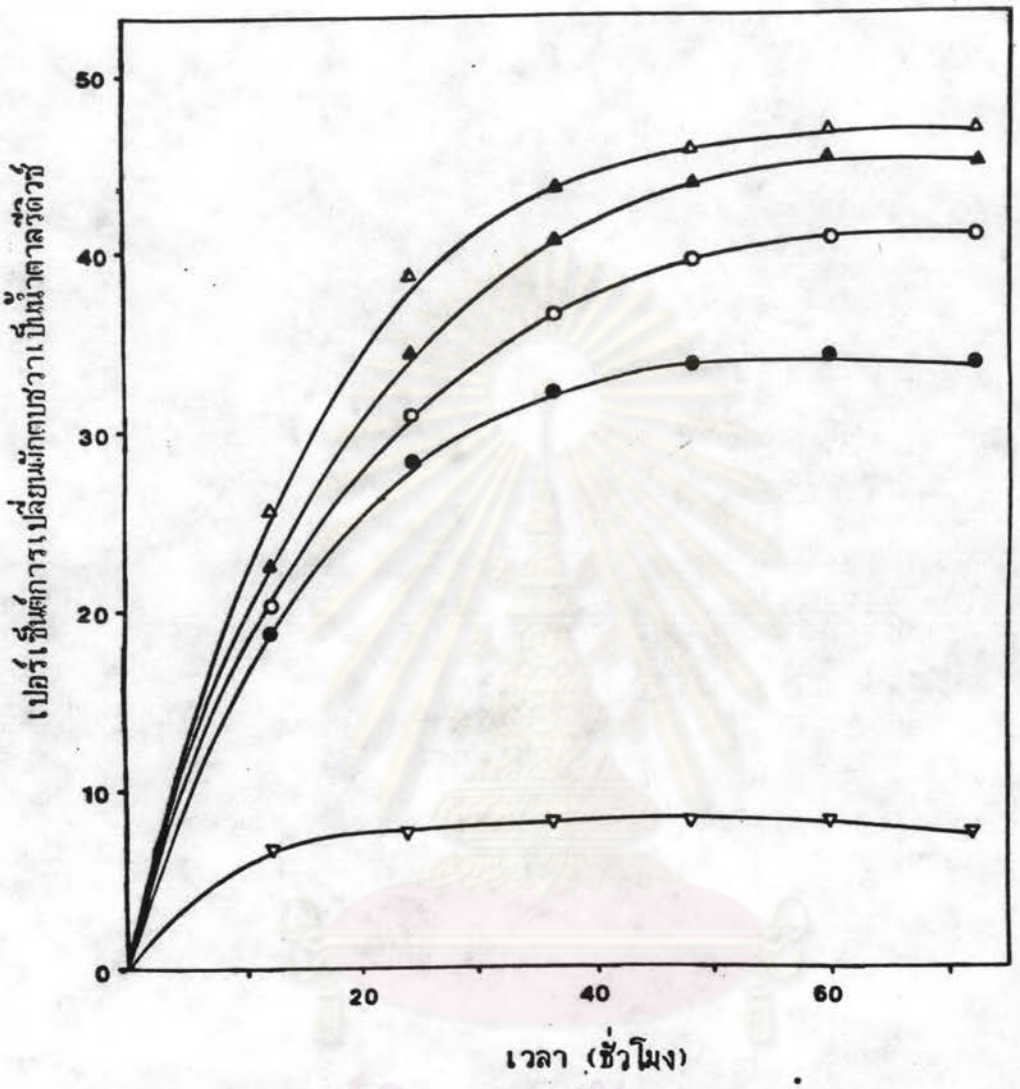
□ 1 เปอร์เซ็นต์, 100 องศาเซลเซียส 5 นาที

■ 1 เปอร์เซ็นต์, 100 องศาเซลเซียส 15 นาที

△ 4 เปอร์เซ็นต์, 100 องศาเซลเซียส 15 นาที

▲ 4 เปอร์เซ็นต์, 100 องศาเซลเซียส 30 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 ผลการย่อยสลายผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับเบต้า-กลูโคซิสเดส 20 หน่วยต่อกรัมผักตบชวาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 4.8

▽ ผักตบชวาที่ไม่ได้ถูกปรับสภาพ

● เวลา 10 นาที ▲ เวลา 1 ชั่วโมง

○ เวลา 30 นาที △ เวลา 1.5 ชั่วโมง

จากการปรับสภาพผักตบชวาโดยวิธีการทั้ง 3 การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จะช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ดีกว่าวิธีการใช้กรดและความร้อนภายใต้ความดัน ดังนั้น ในการทดลองครั้งต่อ ๆ ไป จึงเลือกใช้วิธีนี้ สำหรับการปรับสภาพผักตบชวาก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า–กลูโคซิเดส

ผักตบชวาที่ได้รับปรับสภาพด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วจะถูกนำไปย่อยสลายต่อโดยเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า–กลูโคสิเดส เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่น ๆ เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง จึงได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง อันได้แก่

2.1 ผลการศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายผักตบชวา

เมื่อทดลองบ่มผักตบชวาที่ได้รับการปรับสภาพด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กับเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคซิเดสที่ความเข้มข้น 20 หน่วย ต่อกรัมผักตบชวาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยแปรผันชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ พบว่า การเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองในการย่อยสลายผักตบชวา โดยบัฟเฟอร์ที่ช่วยให้เกิดการย่อยสลายที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือซิเตรทบัฟเฟอร์ รองลงมาคือ อะซีเตรทบัฟเฟอร์ ในขณะที่ซิเตรทฟอสเฟต–บัฟเฟอร์จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ผลของชนิดบัฟเฟอร์ต่อการย่อยสลายเอนไซม์

ชนิดของบัฟเฟอร์	6 ชั่วโมง		24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง	
	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	% การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	% การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	% การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
ซิเตรท	28.56	25.7	58.11	52.3	61.78	55.6
อะซีเตรท	22.44	20.2	53.34	48.0	56.67	51.0
ซิเตรทฟอสเฟต	17.78	16.0	23.89	21.5	24.78	22.3

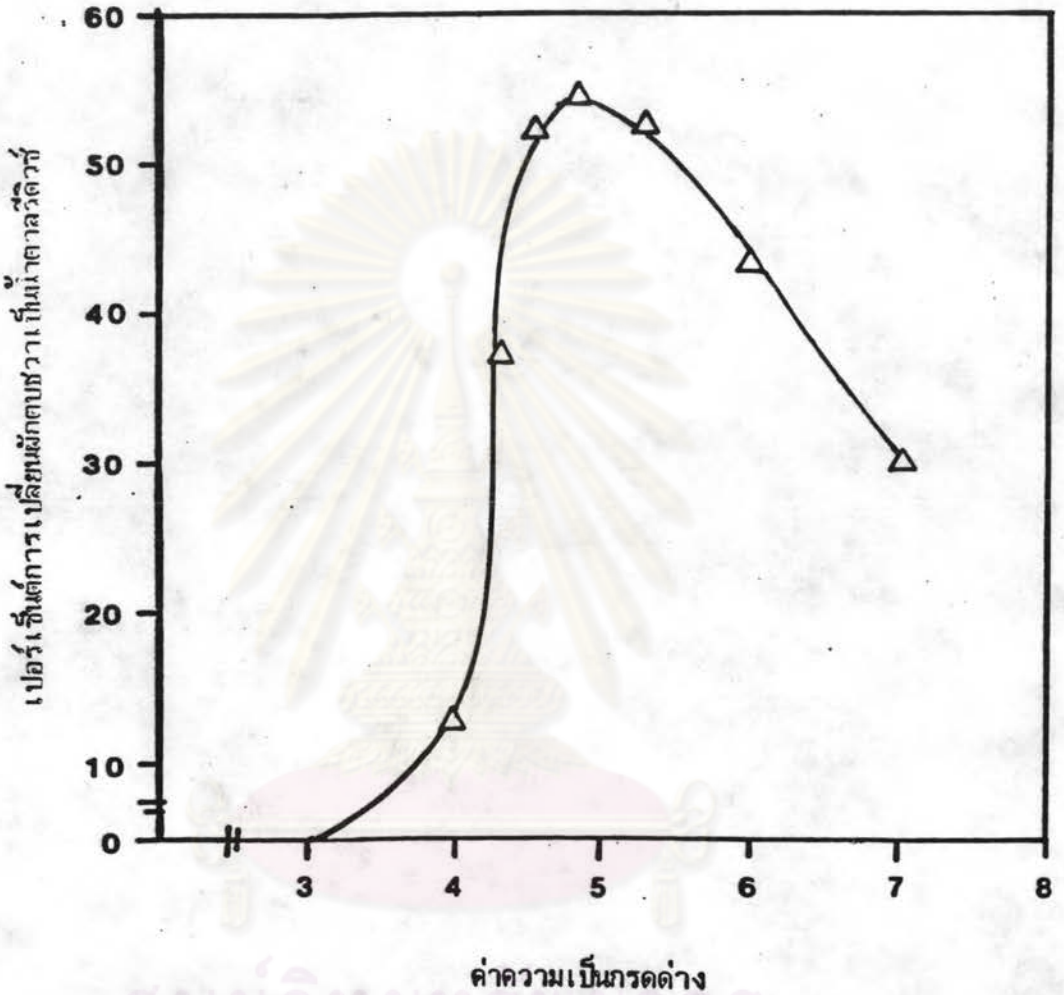
2.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคซิเดส

เมื่อทดลองปรับค่าความเป็นกรดด่างของซิเตรทบัฟเฟอร์ตั้งแต่ 3.0-6.0 พบว่าที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 การย่อยสลายผักตบชวาโดยเอนไซม์ทั้งสองจะเกิดโดยมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ 61.78 กรัมต่อลิตร หรือได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 55.6 ที่ชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในรูปที่ 19

2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคสซิเดส

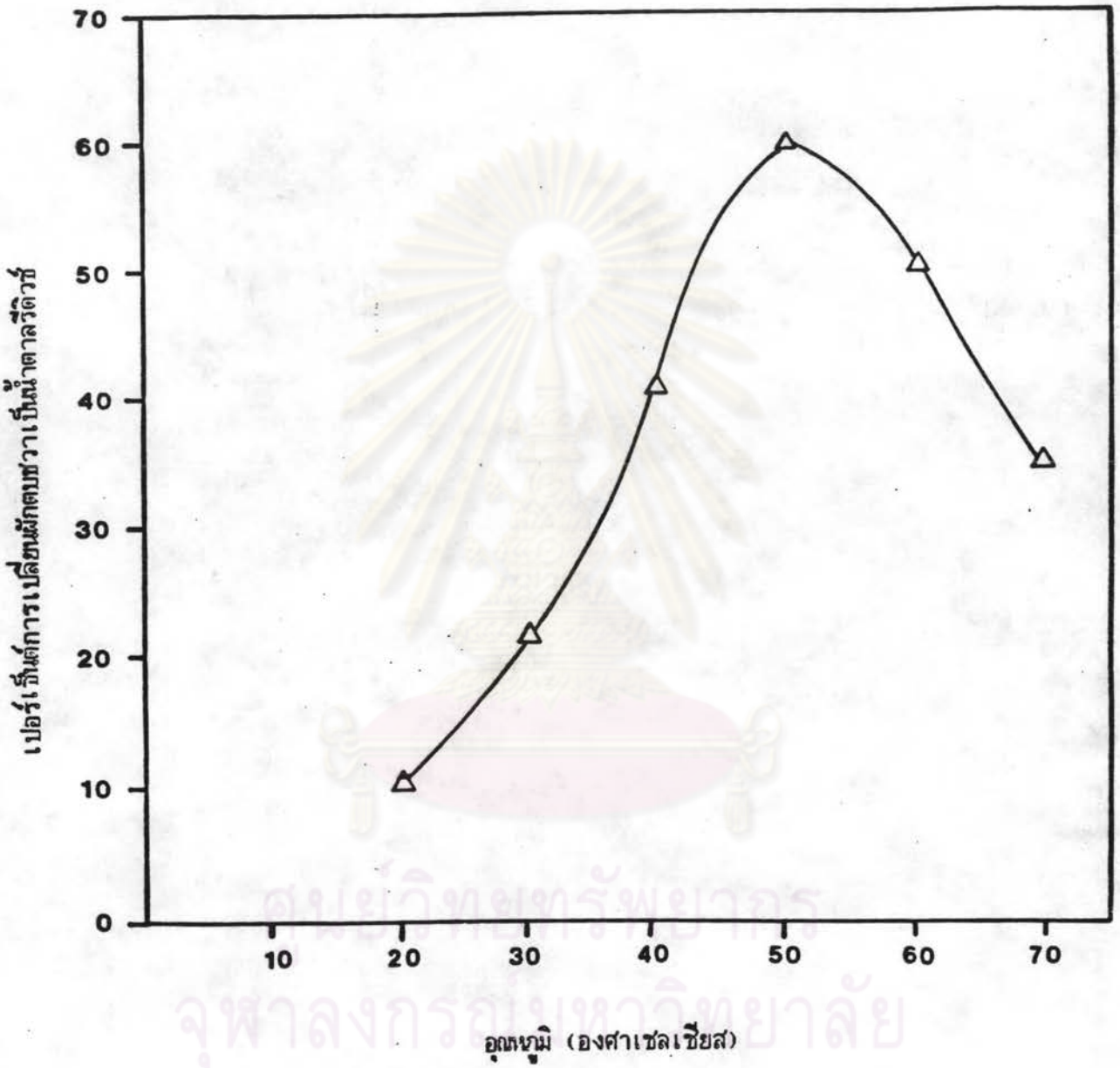
ผลการทดลองเมื่อดำเนินการวิจัยเช่นเดียวกับข้อ 2.2 โดยใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.8 แต่ผันแปรอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตั้งแต่ 20-70 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์จะทำการย่อยสลายผักตบชวาให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ จนถึง 50 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านพ้นอุณหภูมินี้แล้ว ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากที่อุณหภูมิเกิน 50 องศาเซลเซียส อาจมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ดี ดังแสดงในรูปที่ 20

ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไป จะทำการย่อยสลายผักตบชวาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใน 0.05 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.8 ในเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 19 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการย่อยสลายผักตบชวา เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเบต้า-กลูโคซิเดส 20 หน่วย เอนไซม์ต่อกรัมผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใน 0.05 โมลาร์ซิเตร์บัฟเฟอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



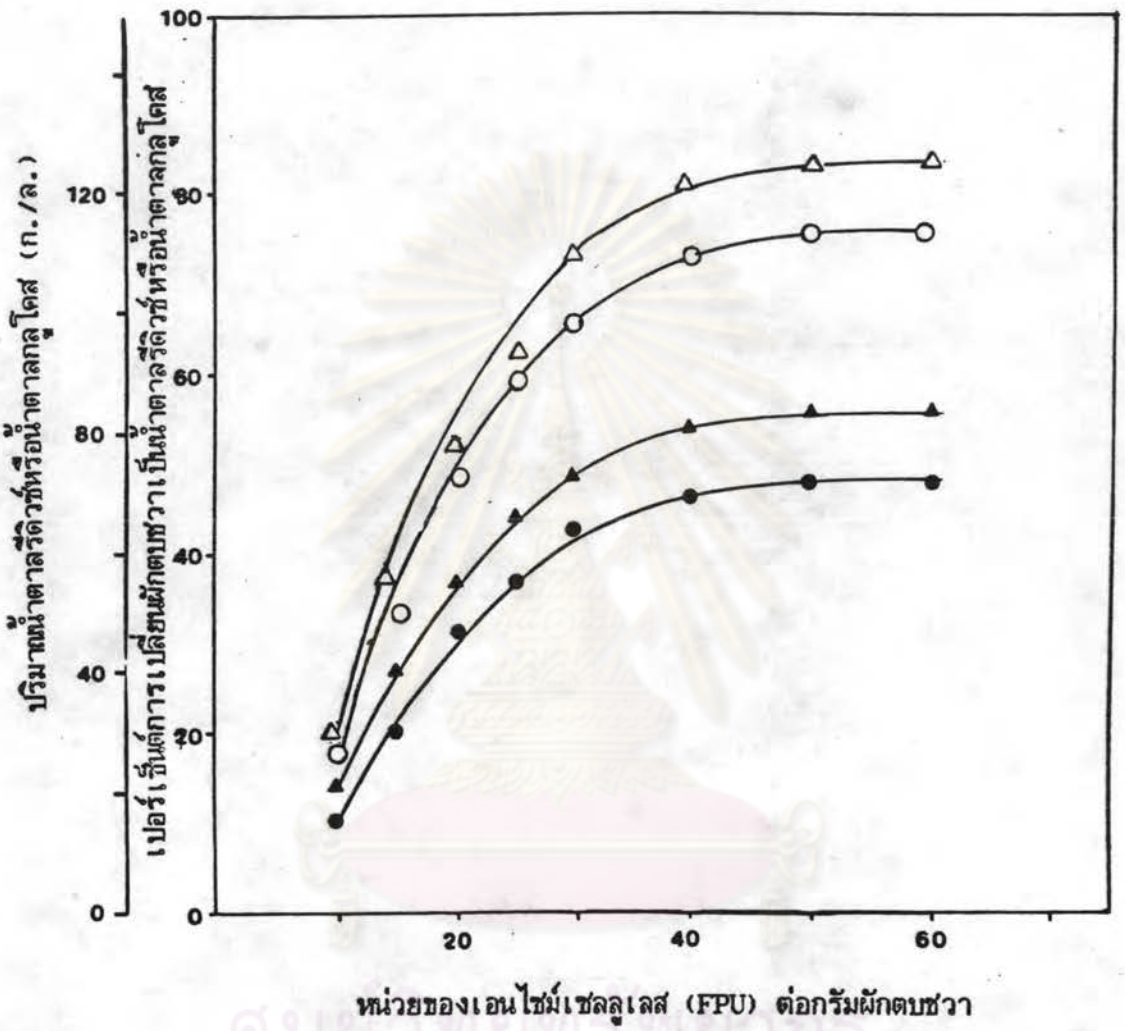
รูปที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายผักตบชวา เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเบต้า-กลูโคซิเดส 20 หน่วยเอนไซม์ต่อกรัมผักตบชวา ใน 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดด่าง 4.8

3. ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคสซิเดสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายผักตบชวา

เมื่อทดลองย่อยสลายผักตบชวาที่ได้รับการปรับสภาพแล้วด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ภายใต้สภาวะมาตรฐานจากข้อ 2.2 คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใน 0.05 โมลาร์ซิเตรท บัฟเฟอร์ ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่าง 4.8 โดยแปรผันปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลสระหว่าง 10-60 หน่วยเอนไซม์ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น การย่อยสลายผักตบชวาก็เพิ่มขึ้นด้วย แต่หากความเข้มข้นของเอนไซม์มากกว่า 45 หน่วย แล้วอัตราการย่อยสภาพผักตบชวาจะไม่เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ ซึ่งแสดงว่าผลการย่อยสลายมีน้ำตาลในรูปโอลิโกแซคคาไรด์เหลืออยู่ด้วย ทำให้มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส แสดงผลในรูปที่ 21

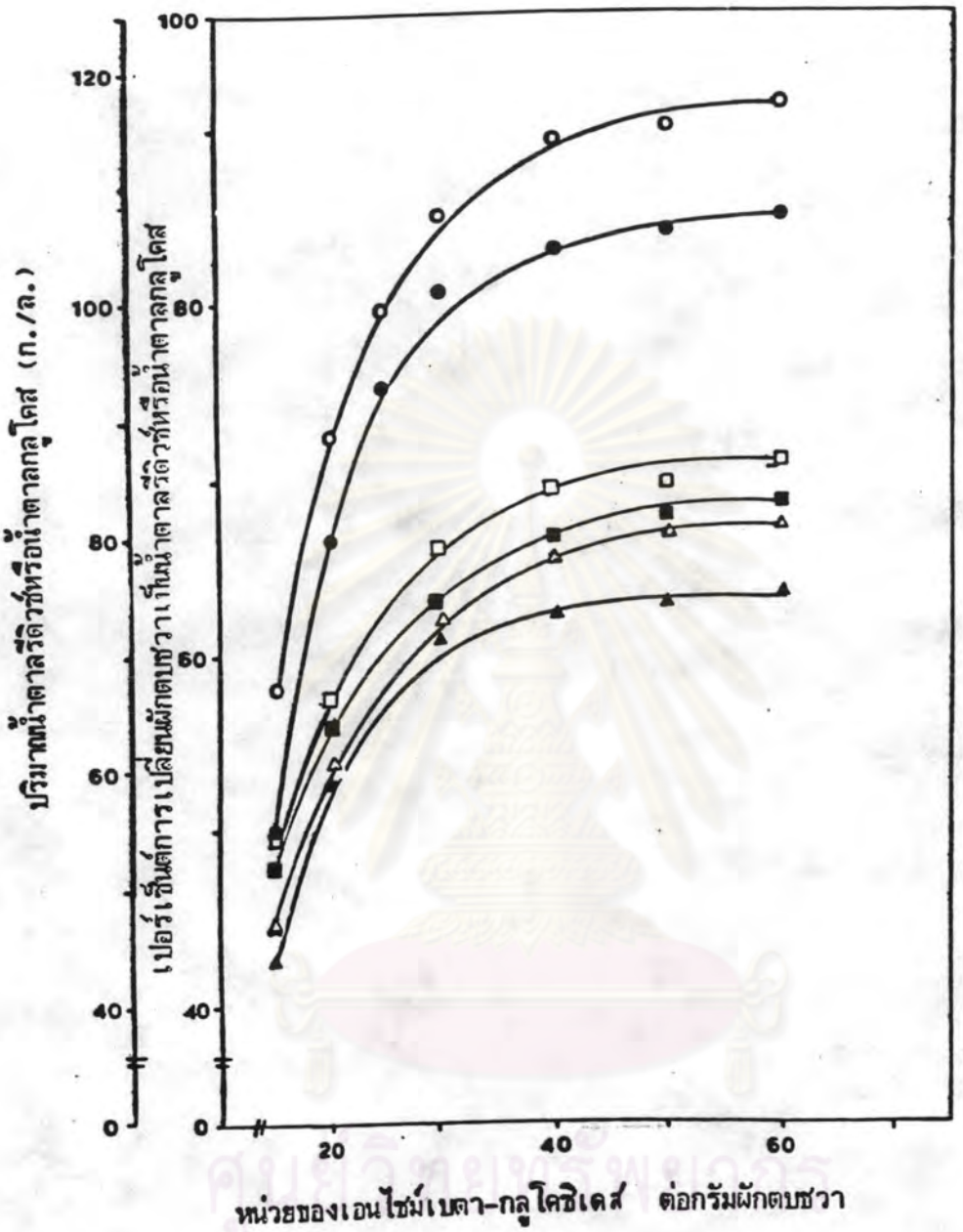
ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน การย่อยสลายผักตบชวาโดยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส พบว่า ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 30 หน่วยเอนไซม์ (FPU) ต่อกรัมผักตบชวา โดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้า-กลูโคสซิเดรตนั้น การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์นี้จะมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีค่าสูงขึ้น และมีปริมาณใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวซ์ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์นี้จะไปย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ ที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลกลูโคส) การเพิ่มปริมาณเอนไซม์นี้จะเพิ่มปริมาณน้ำตาลให้สูงขึ้นตาม แต่ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้า-กลูโคสซิเดสสูงกว่า 25 หน่วยเอนไซม์ อัตราการย่อยสลายจะมีค่าลดลง สาเหตุเนื่องมาจากน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นนี้ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ทำให้การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไม่มีผล ดังในรูปที่ 22

จากการเพิ่มเวลาในการย่อยสลายผักตบชวาในช่วง 24 และ 48 ชั่วโมงนั้น พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ ของการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคสที่ไม่แตกต่างกันนัก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกใช้ช่วงเวลาการย่อยสลายเป็น 24 ชั่วโมง



รูปที่ 21 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูระหว่าง 10-60 หน่วย FPU ต่อกรัมผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยด่าง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใน 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.8

- ● ปริมาณน้ำตาลกลูโคส
- ▲ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
- △ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสในผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์
- ○ เปอร์เซนต์การเปลี่ยนเซลลูโลสในผักตบชวาเป็นน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 22 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ระหว่าง 10-60 หน่วยต่อกรัมผักตบชวา เมื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส 30 หน่วยเอนไซม์ต่อกรัมผักตบชวา ทำการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใน 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.8

▲ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ 24 ชั่วโมง

△ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ 48 ชั่วโมง

■ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 24 ชั่วโมง

□ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนผักตบชวาเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 48 ชั่วโมง

● เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสในผักตบชวาเป็นน้ำตาลกลูโคสที่ 24 ชั่วโมง

○ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสในผักตบชวาเป็นน้ำตาลกลูโคสที่ 48 ชั่วโมง

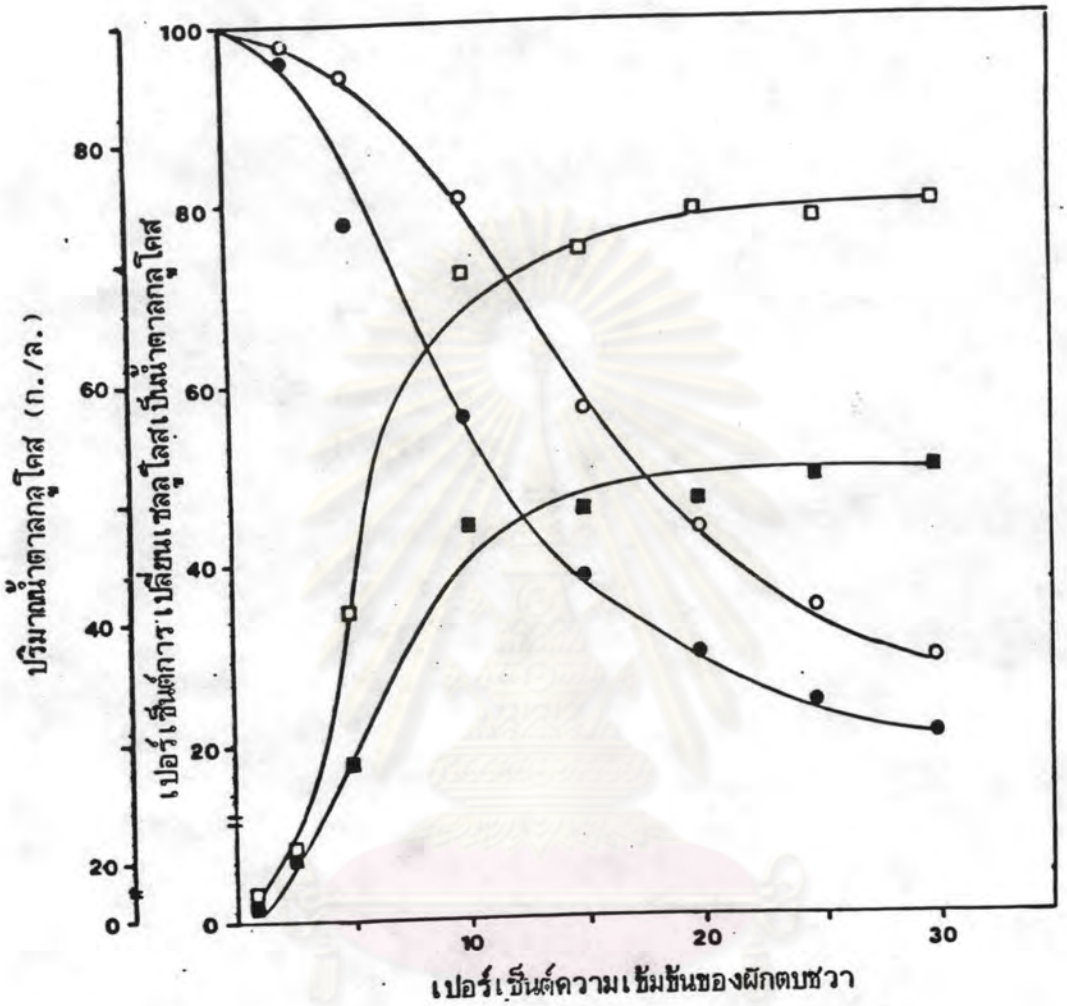
4. ปริมาณผักตบชวาต่อการย่อยสลายร่วมของเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคซิเดส

เมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคซิเดสมาใช้ร่วมกันเพื่อย่อยสลายผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ตามข้อมูลจากข้อ 3 และแปรเปลี่ยนปริมาณของสับสเตรท (ผักตบชวา) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 23

ผลการศึกษาโดยแปรผันปริมาณผักตบชวาที่จะย่อยสลายตั้งแต่ 2.5-30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใน 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 โดยเปรียบเทียบเมื่อใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดรสต่อกรัมผักตบชวาเป็น 20 : 20 และ 30 : 30 ตามลำดับ ทำการย่อยในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของผักตบชวา โดยที่ความเข้มข้นของผักตบชวาสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง

โดยสรุปจะพบว่า หากเพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้นก็จะเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ คือ 45.2 และ 74.17 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเป็น 20:20:กรัมผักตบชวาและ 30:30:กรัมผักตบชวา ที่เปอร์เซ็นต์ผักตบชวาที่ 15 ซึ่งเป็นจุดที่การย่อยสลายถึง Stationary phase แต่ในแง่ของปริมาณผักตบชวาจะพบว่า หากใช้ผักตบชวาเกิน 10 เปอร์เซ็นต์แล้วจะให้น้ำตาลกลูโคสออกมาคงที่คือ ประมาณ 43.33 กรัมต่อลิตร ในกรณีเอนไซม์ 20:20:กรัมผักตบชวา และ 71.67 กรัมต่อลิตร ในกรณีใช้เอนไซม์ 30:30 กรัมผักตบชวา ซึ่งแสดงว่า การเข้าย่อยสลายเกิดได้ลำบาก อาจเนื่องจากความหนาแน่นของสับสเตรทที่ทำให้เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาไม่ได้เต็มที่

และที่ความเข้มข้นของปริมาณผักตบชวา ในช่วง 1-2.5 เปอร์เซ็นต์ จะให้การย่อยสลายที่สมบูรณ์ โดยให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส มีค่าเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในกรณีของการใช้เอนไซม์ 20:20:กรัมผักตบชวา และ 30:30:กรัมผักตบชวา



รูปที่ 23 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ทำการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสใน 0.05 โมลาร์ซิเตรทบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.8 ในเวลา 24 ชั่วโมง

หน่วยเอนไซม์เซลลูเลส : เบต้า-กลูโคซิเดส : กรัม ผักตบชวา ในอัตราส่วน 30:30:1

□ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

○ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสในผักตบชวาเป็นน้ำตาลกลูโคส

หน่วยเอนไซม์เซลลูเลส : เบต้า-กลูโคซิเดส : กรัม ผักตบชวา ในอัตราส่วน 20:20:1

■ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

● เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเซลลูโลสในผักตบชวาเป็นน้ำตาลกลูโคสล

5. ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอน โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่าง ๆ

5.1 ผลของอุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการหมัก

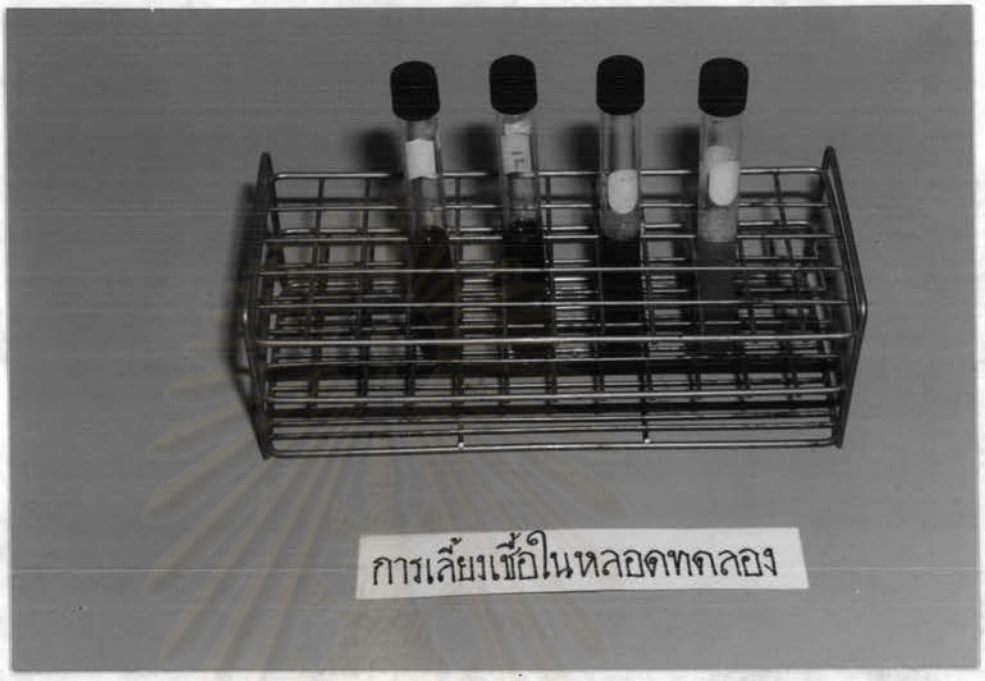
จากการศึกษาการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดยคลอสตริเดียม 3 สายพันธุ์ คือ Cl. acetobutylicum ATCC 824, Cl. butylicum NRRL B592 และ Clostridium สายพันธุ์ 8p-2 ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย โดยการแปรผันอุณหภูมิในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 20-80 กรัมต่อลิตร พบว่า คลอสตริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลิตอาซีโตน-บิวทานอลได้สูงสุด ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตจะแตกต่างกันดังนี้

Cl. butylicum NRRL B592 และ Clostridium สายพันธุ์ 8p-2 ให้ผลิตภัณฑ์สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดย Cl. butylicum NRRL B592 จะผลิตบิวทานอล 6.6209 กรัมต่อลิตร อาซีโตน 3.1857 กรัมต่อลิตร และเอธานอล 0.2064 กรัมต่อลิตร ส่วน Clostridium สายพันธุ์ 8p-2 ให้บิวทานอล 3.6918 กรัมต่อลิตร อาซีโตน 2.1355 กรัมต่อลิตรและเอธานอล 0.1829 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เช่นกัน

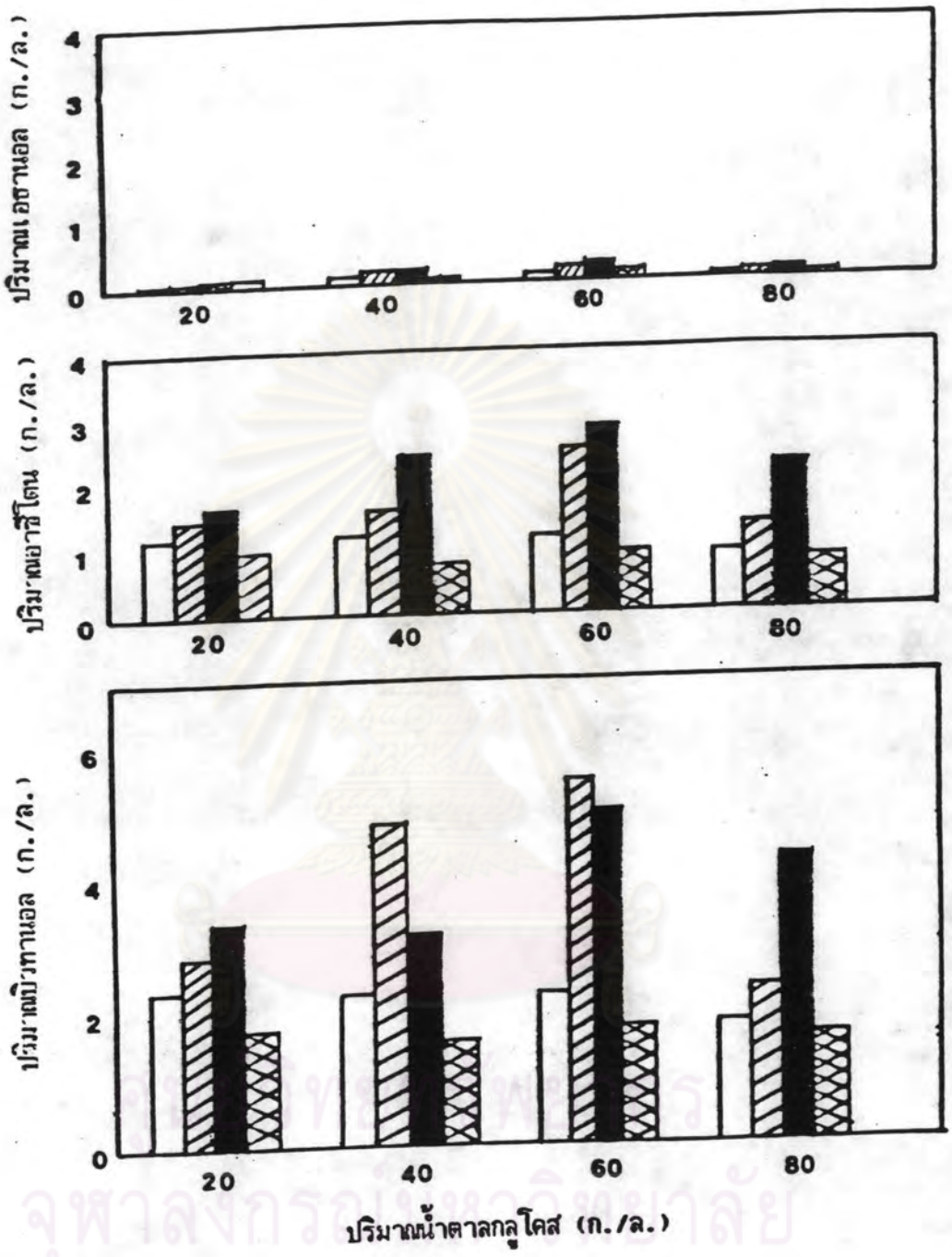
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Cl. acetobutylicum จะผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 5.0564 กรัมต่อลิตร อาซีโตน 2.4971 กรัมต่อลิตร และเอธานอล 0.2025 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 25, 26 และ 27 สรุปผลปริมาณผลิตภัณฑ์อยู่ในตารางที่ 15

5.2 ผลการศึกษาในระดับขวดเขย่า

จากการศึกษาโดยใช้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากข้อ 5.1 คือ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส มาทำการเลี้ยงเชื้อคลอสตริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ในระดับขวดเขย่า ที่ปรับความเร็วรอบ 10 รอบต่อนาที พบว่าคลอสตริเดียมที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายผักตบชวาได้ดี และผลิตบิวทานอลได้สูงสุดคือ Cl. butylicum NRRL B592 ได้ปริมาณตัวทำละลายรวม 11.0269 กรัมต่อลิตร โดยให้บิวทานอล 6.8102 กรัมต่อลิตร อาซีโตน 3.9741 กรัมต่อลิตร และเอธานอล 0.2423 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือเชื้อ Cl. acetobutylicum ATCC 824 ส่วนเชื้อ Clostridium สายพันธุ์ 8p-2 จะผลิตบิวทานอลได้น้อยที่สุด สรุปผลการทดลองแสดงในตารางที่ 16



รูปที่ 24 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อคลอสตริเดียมในระดับหลอดทดลอง และขวดเขย่า



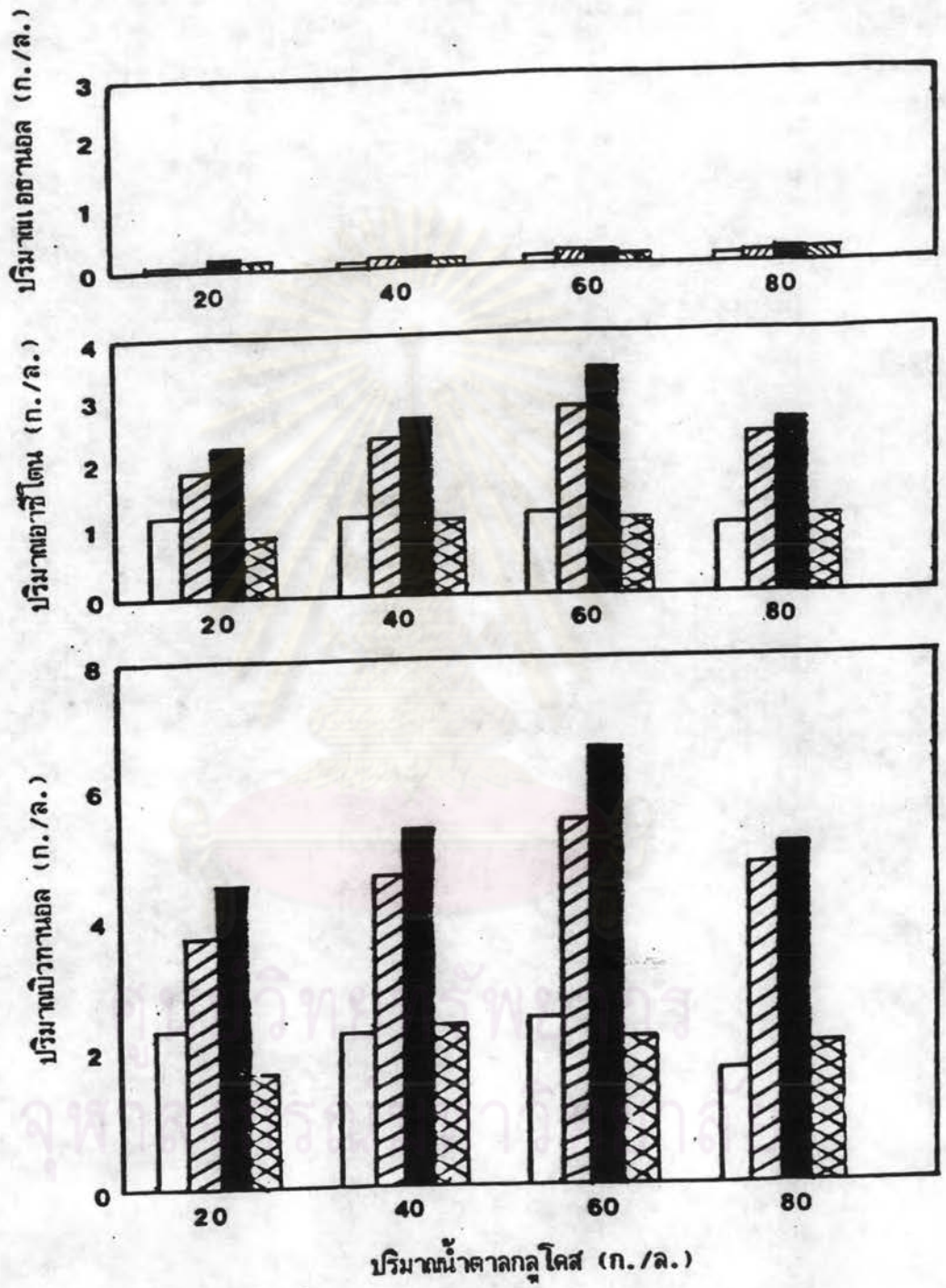
รูปที่ 25 ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ต่อการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล โดยเชื้อ Cl. acetobutylicum ATCC 824

□ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

▨ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

■ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

⊠ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



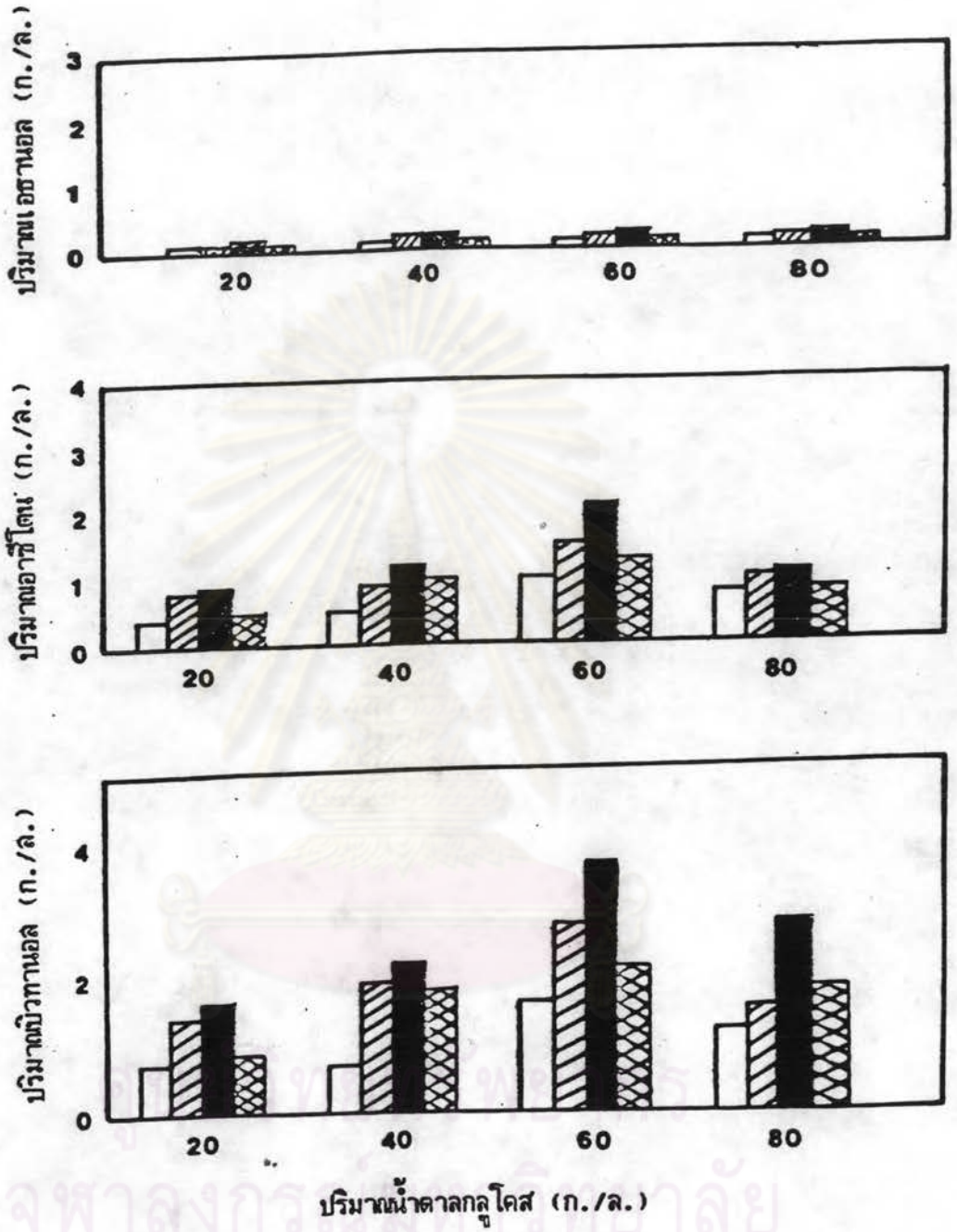
รูปที่ 26 ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดย Cl. butylicum NRRL B592

□ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

▨ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

■ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

⊠ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 27 ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดย Clostridium สายพันธุ์ 8P-2

- □ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- ▨ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- ■ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
- ⊠ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลจากการย่อยสลายผักตบชวา
ของคลอสตริเดียม 3 สายพันธุ์ในระดับหลอดทดลอง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Cl. acetobutylicum ATCC 824				Cl. butylicum NRRL B592				Clostridium สายพันธุ์ 8P-2			
	ความเข้มข้นน้ำตาล (ก./ล.)				ความเข้มข้นน้ำตาล (ก./ล.)				ความเข้มข้นน้ำตาล (ก./ล.)			
	20	40	60	80	20	40	60	80	20	40	60	80
25	3.6473	4.9788	3.6316	7.8833	4.5038	3.5687	3.7610	3.4018	1.2860	1.2907	2.6977	2.217
30	4.5352	5.0375	7.7560	5.308	5.9603	7.4405	8.6189	7.356	2.398	2.8477	4.517	2.8735
35	5.3294	7.4710	7.036	6.7658	7.864	8.3759	10.013	7.9088	2.6695	3.5194	5.8293	3.5234
40	3.0189	2.4909	2.7585	2.6474	2.9616	3.701	3.520	3.350	2.9747	3.0536	3.6258	2.7451

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงผลการหมักคลอสตริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ในระดับขวดเขย่า

จุลินทรีย์	ภาวะการหมัก	ปริมาณตัวทำละลาย (กรัม/ลิตร)			ตัวทำละลายรวม (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)	
		อาซีโตน	บิวทานอล	เอธานอล		กรดบิวทีริค	กรดอะเซติก
Cl. butylicum NRRL B592	ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัม/ลิตร 35 องศาเซลเซียส	3.9741	6.8102	0.2426	11.0269	0.6329	0.8542
Cl. acetobutylicum ATCC S 824	ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัม/ลิตร 30 องศาเซลเซียส	3.1290	5.984	0.2513	9.3643	0.7644	0.5117
Clostridium สายพันธุ์ 8p-2	ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัม/ลิตร 35 องศาเซลเซียส	2.0812	4.1265	0.7361	6.9438	0.7865	0.8405

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้น จึงได้เลือก Cl. butylicum NRRL B592 นี้มาศึกษาการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ในระดับถังหมักต่อไป

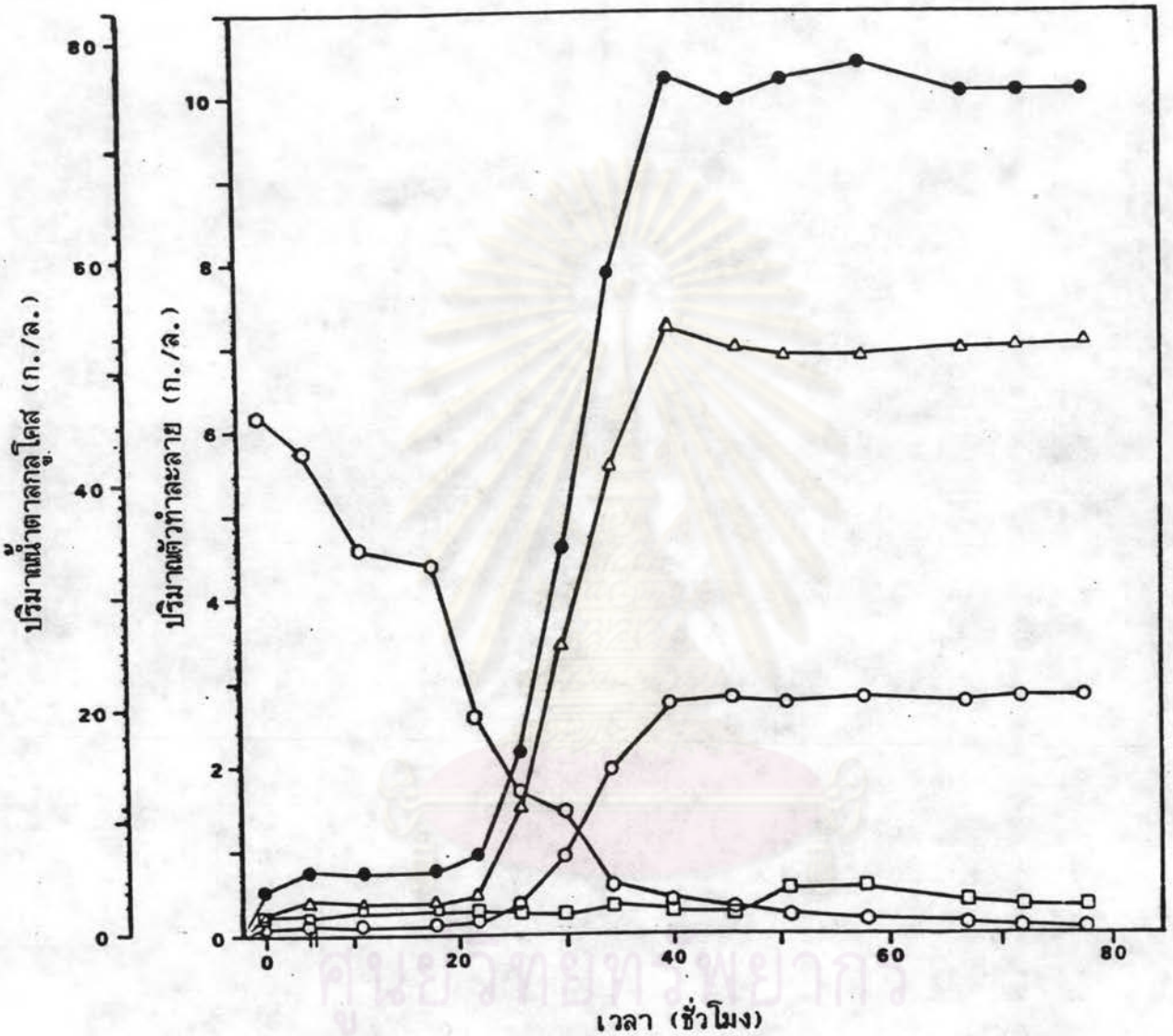
6. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา โดย Cl. butylicum NRRL B952 ในระดับถังหมัก

6.1 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

จากผลการทดลองในข้อ 5.2 Cl. butylicun NRRL B592 สามารถผลิตอาซีโตน-บิวทานอลได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในการทดลองนี้จึงศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ควบคุมความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.5 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 28-33 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 17

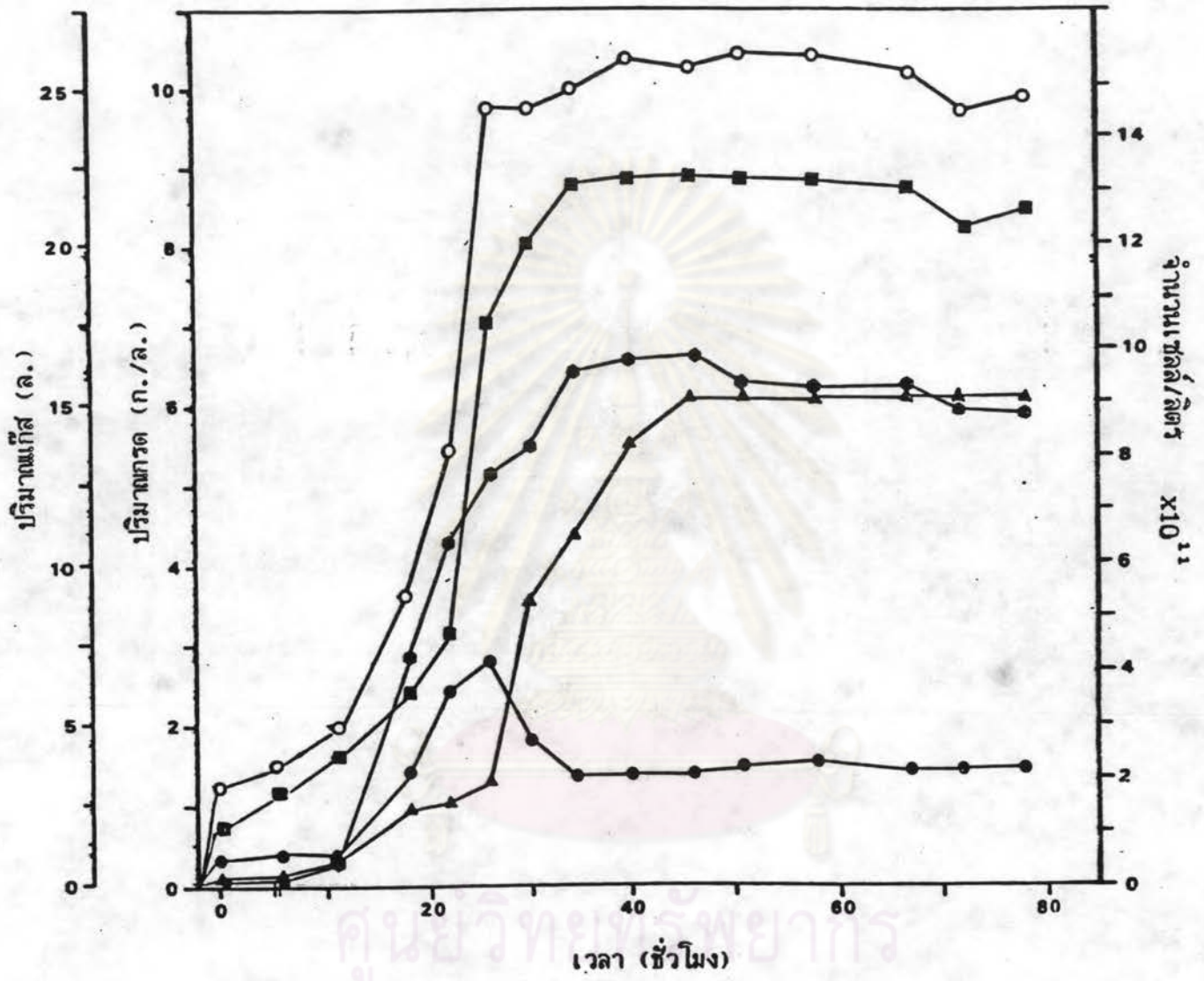
จากผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณตัวทำละลายรวม (บิวทานอล อาซีโตน เอธานอล) คือ 10.97882, 13.9421 และ 11.2334 กรัมต่อลิตร ตามลำดับโดยที่อุณหภูมิ 35 องศงเซลเซียส จะให้ผลผลิตสูงสุดคือให้ปริมาณบิวทานอล 8.6047 กรัมต่อลิตร อาซีโตน 4.8523 กรัมต่อลิตร และเอธานอล 0.4851 กรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่า 29.93

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ), อัตราสร้างกรดจำเพาะ (ν_{pc}) และอัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะ (ν_{po}) ที่มีค่าสูงในแต่ละการทดลองมาเปรียบเทียบดังแสดงในรูปที่ 34 และสรุปผลการคำนวณในตารางที่ 18



รูปที่ 28 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 โดย Cl. butylicum NRRL B592

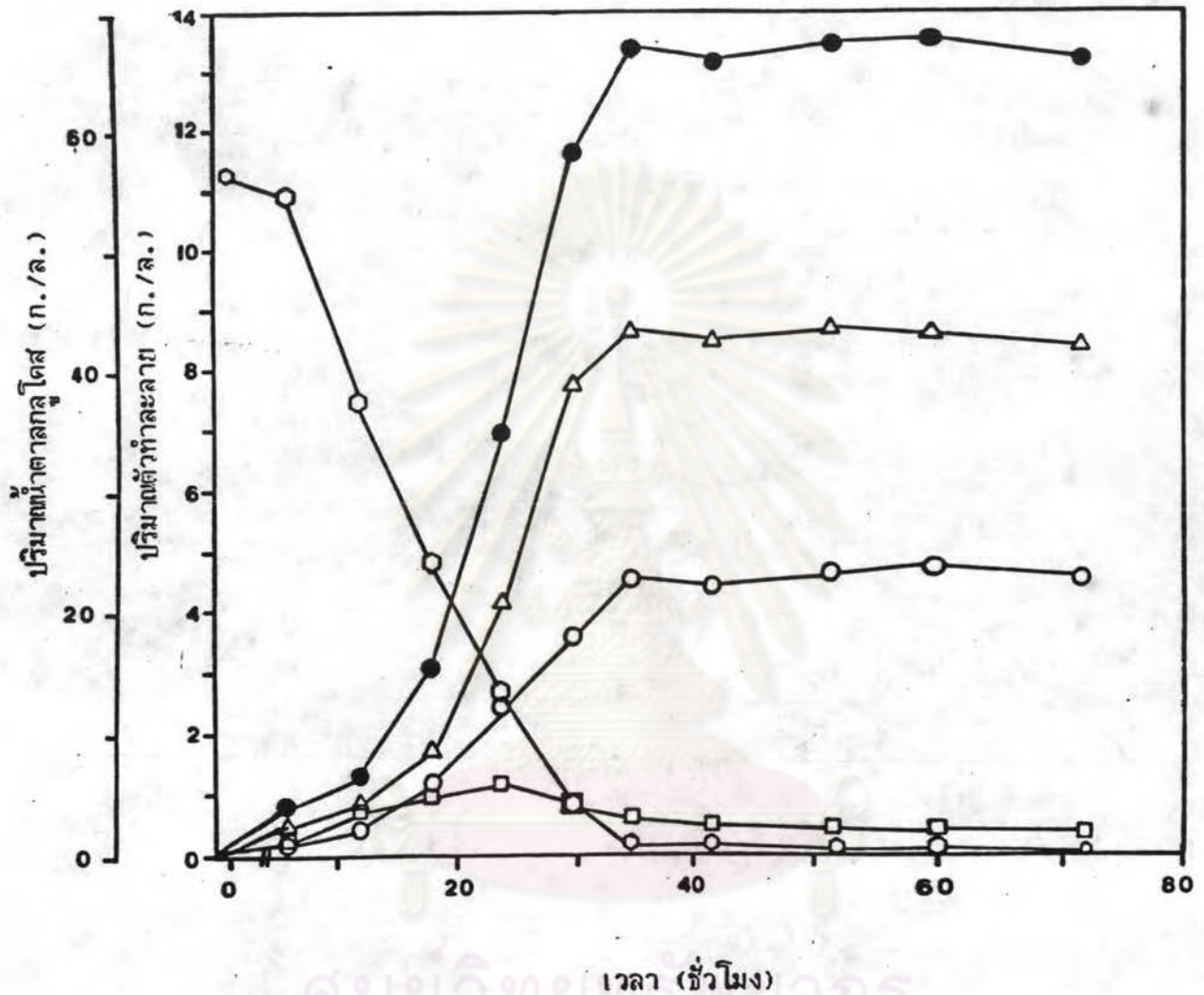
△ บิวทานอล
○ อาซีโตน
□ เอธานอล
● ตัวทำละลายรวม
⬡ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 29 ปริมาณกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 โดย Cl. butylicum NRRL B592

● กรดบิวทีริค
■ กรดอะเซติก
○ ปริมาณกรดรวม
▲ ปริมาตรแก๊ส
⬢ จำนวนเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

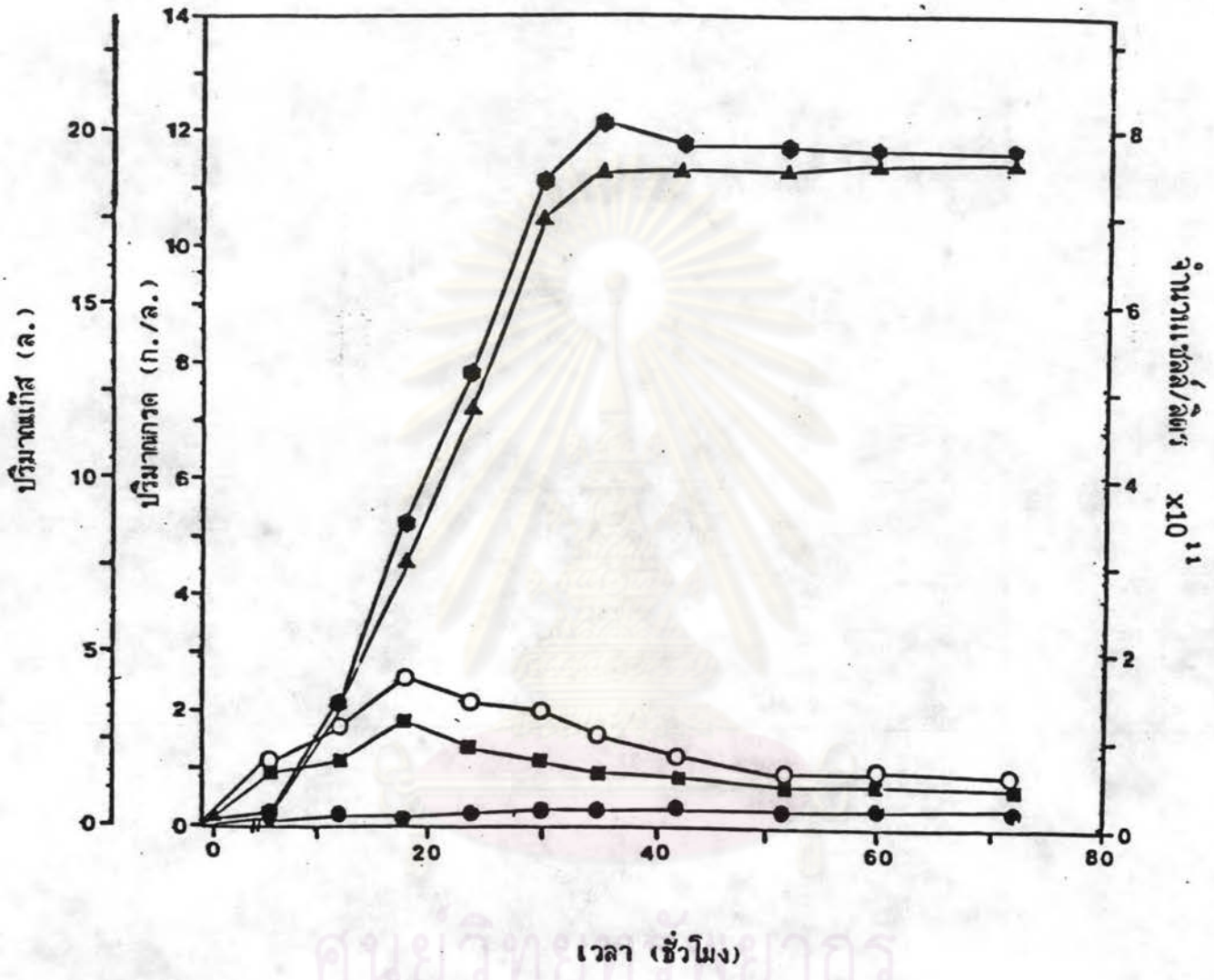


รูปที่ 30 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 โดย Cl. butylicum NRRL B592

△ บิวทานอล ● ตัวทำละลายรวม

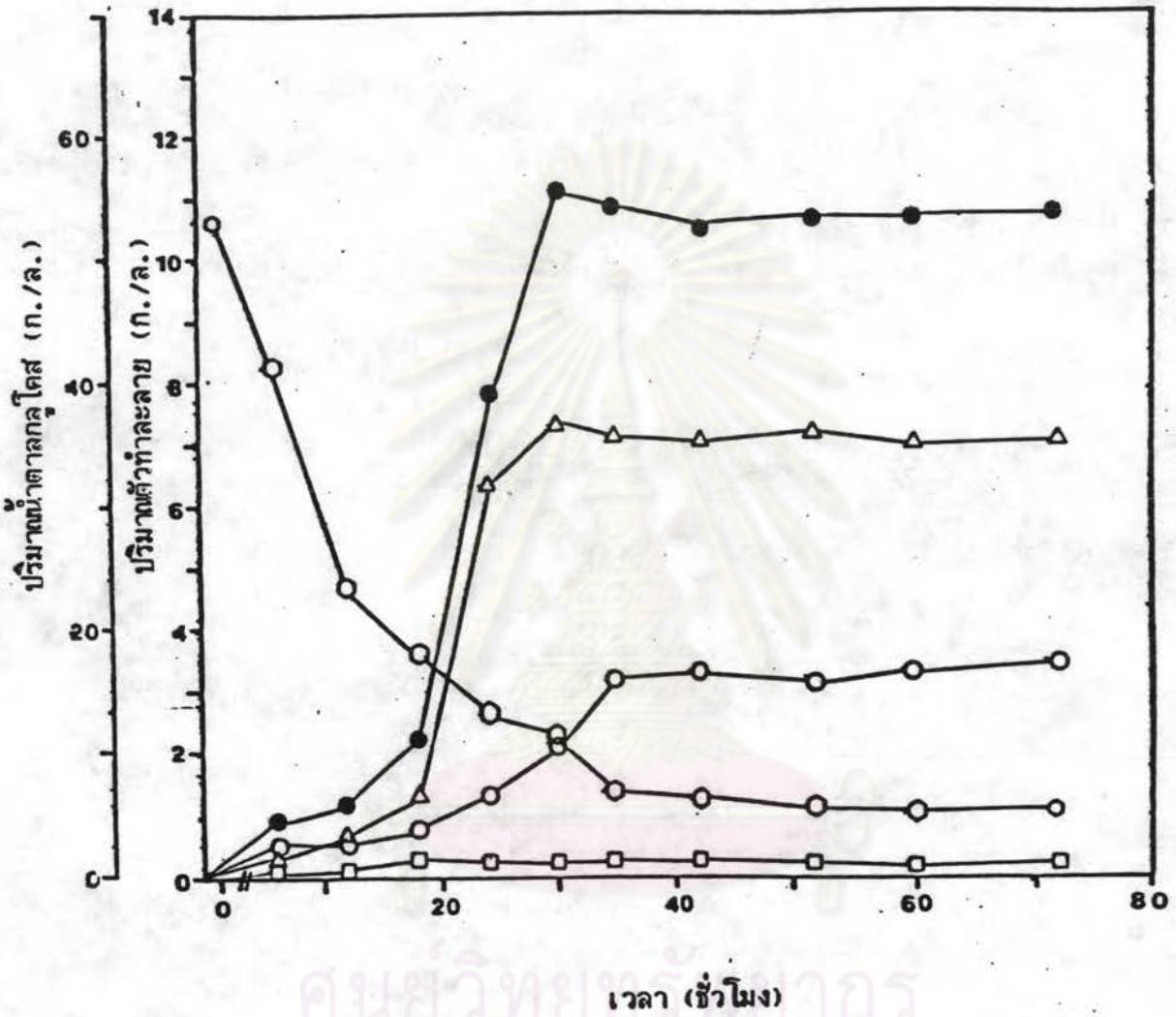
○ อาซีโตน ⬡ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

□ เอธานอล



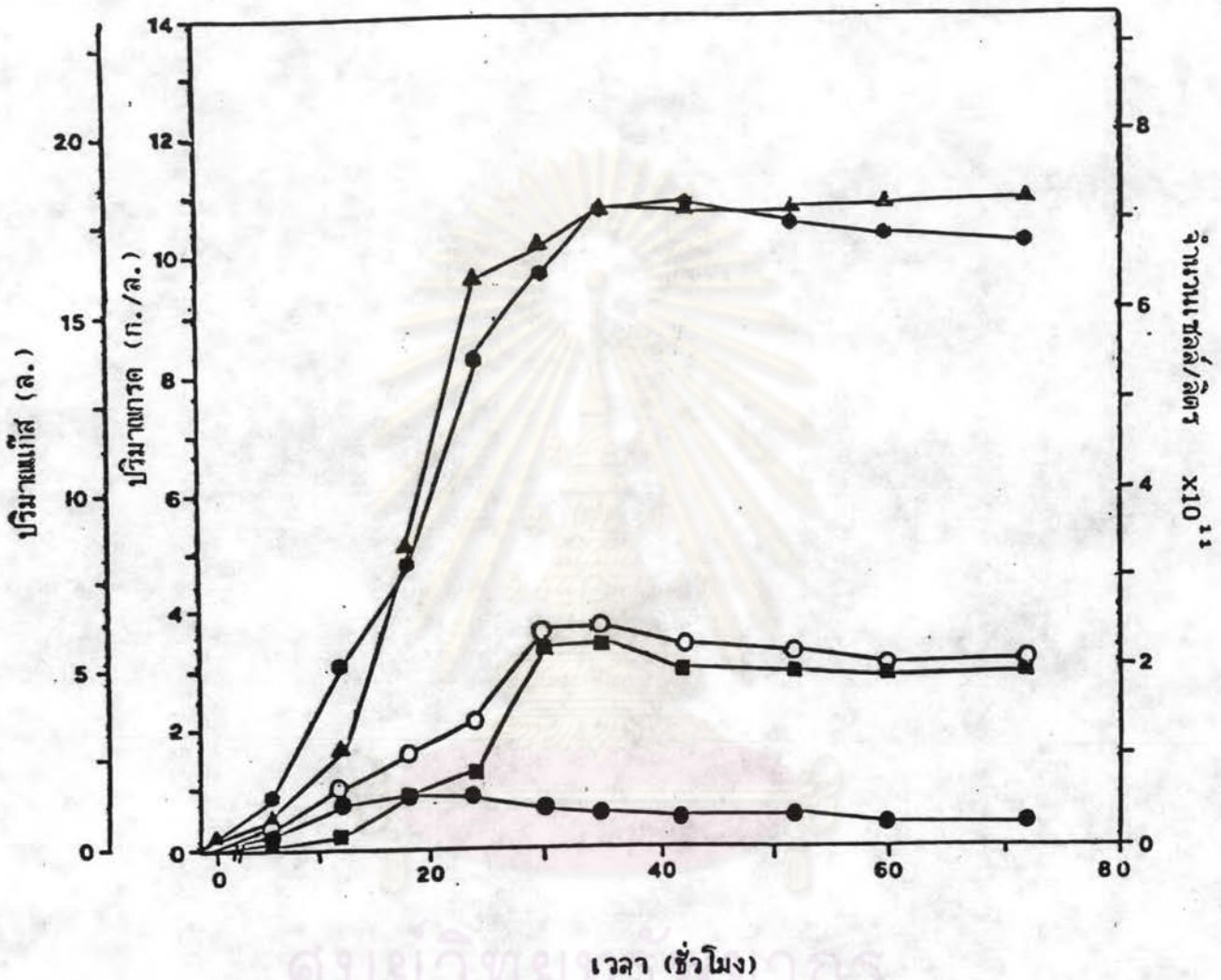
รูปที่ 31 ปริมาณกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 โดย Cl. butylicum NRRL B592

- ● กรดบิวทีริค
- ■ กรดอะเซติก
- ○ ปริมาณกรดรวม
- ▲ ปริมาตรแก๊ส
- ⬢ จำนวนเซลล์



รูปที่ 32 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 โดย Cl. butylicum NRRL B592

△ บิวทานอล
● ตัวทำละลายรวม
○ อาซีโตน
⬡ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส
□ เอธานอล



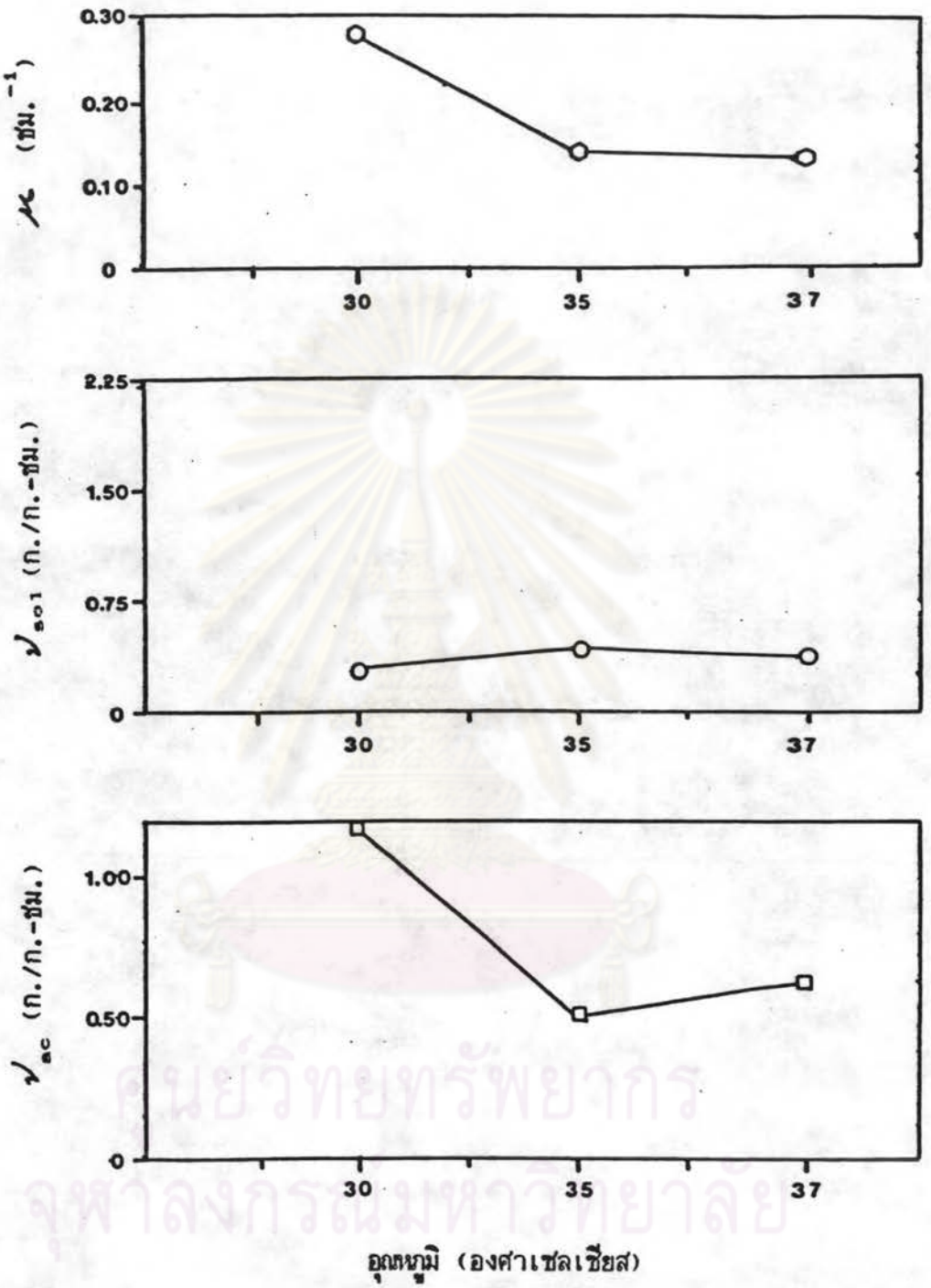
รูปที่ 33 ปริมาณกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.5 โดย Cl. butylicum NRRL B592

- ● กรดบิวทีริค
- ▲ ปริมาตรแก๊ส
- ■ กรดอะเซติก
- ⬢ จำนวนเซลล์
- ○ ปริมาณกรดรวม

ตารางที่ 17 แสดงผลการผลิตอาซิโตน-บิวทานอลที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์สูงสุด (เซลล์/ลิตร)	ปริมาณแก๊สทั้งหมด (ลิตร)	ปริมาณตัวทำละลาย (กรัม/ลิตร)			ปริมาณตัวทำละลาย (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)		% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต
				อาซิโตน	บิวทานอล	เอธานอล		กรดบิวทีริค	กรดอะเซติก	
30	49.5	$6.3x10^{11}$	15.2	2.8067	7.1998	0.9717	10.9782	1.1497	8.9392	22.2
35	46.57	$8.8x10^{11}$	19.0	4.8523	8.6047	0.4851	13.9421	1.8890	3.4669	29.93
37	46.57	$7.4x10^{11}$	18.0	3.7252	7.2612	0.2470	11.2334	0.9672	3.843	24.12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 34 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ

- ⬡ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)
- □ อัตราการสร้างกรดจำเพาะ (ν_{ac})
- ○ อัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะ (ν_{sol})

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลที่อุณหภูมิต่าง ๆ

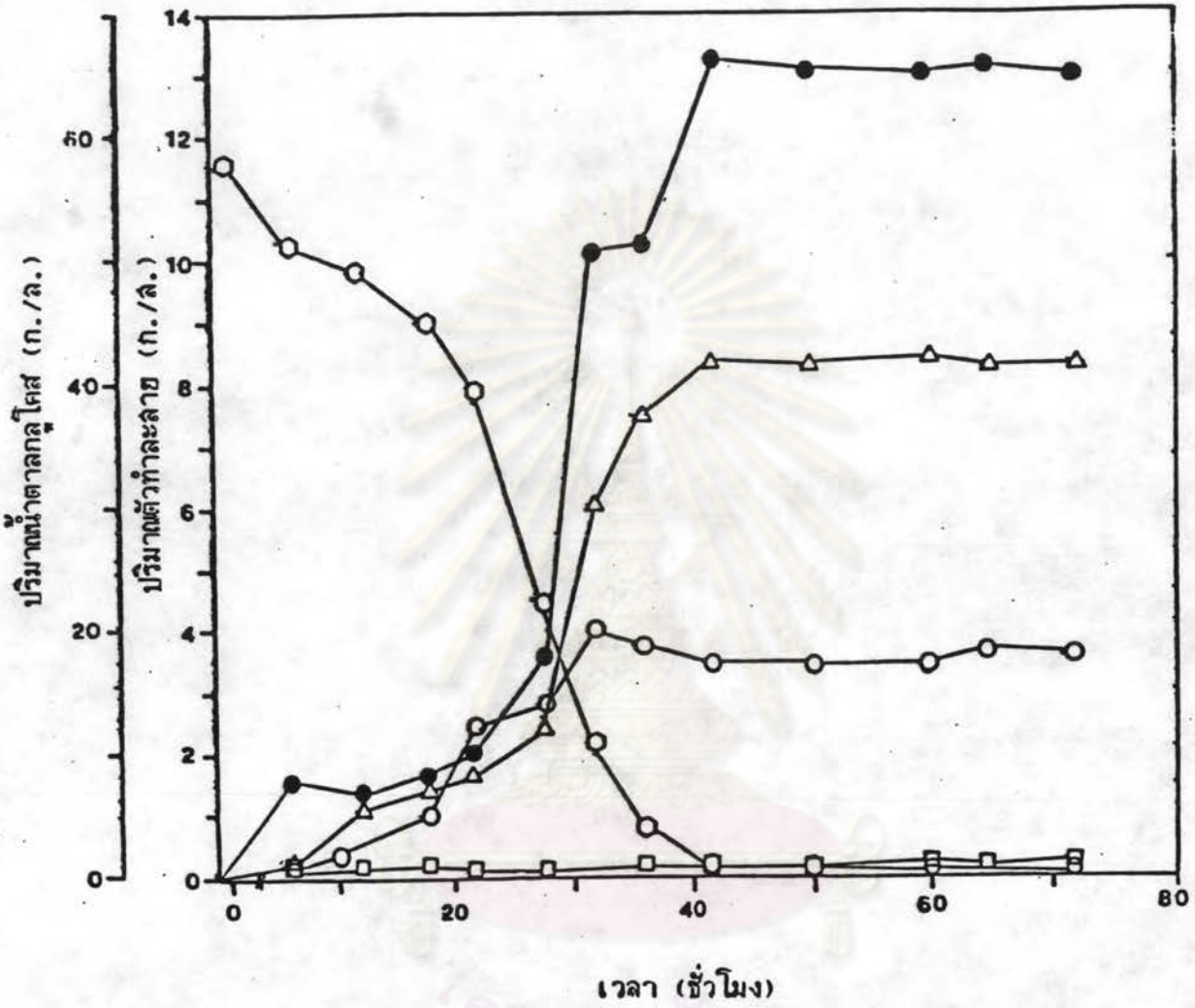
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	μ สูงสุด (ชม.$^{-1}$)	ν_{sc} สูงสุด (ก./ก. ชม.)	ν_{sol} สูงสุด (ก./ก. ชม.)
30	0.2857	1.1858	0.3014
35	0.14054	0.5082	0.4175
37	0.1341	0.6145	0.3823

6.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

เมื่อทดลองผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลจากการย่อยสลายผักตบชวา 60 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมการเป็นกรดด่างที่ 5.5, 6.0, 6.5 และไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง เพื่อดูผลของความเป็นกรดด่างต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณตัวทำละลายรวมที่ได้จากการหมักที่ความเป็นกรดด่าง 5.5, 6.0, 6.5 และไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง มีค่าเป็น 12.5613, 13.9883, 13.9421 และ 16.3811 กรัมต่อลิตร ตามลำดับรูปที่ 29, 30 และ 35-38 และตารางที่ 19 โดยเฉพาะที่สภาพไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างจะให้ปริมาณบิวทานอลสูงสุด คือ 10.3426 กรัมต่อลิตร โดยมีการผันแปรค่าความเป็นกรดด่าง ตลอดการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่า 34.38

ในช่วงแรกของการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเชื้อมีค่า 6.5 ต่อมาเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น พร้อมทั้งผลิตแก๊สจำนวนมากออกมา ค่าความเป็นกรดด่างจะค่อย ๆ ลดลง เนื่องจากปริมาณกรดอะเซติกและกรดบิวทีริคที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นโดยค่าความเป็นกรดด่างจะลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 12 (มีค่า 4.75) หลังจากนั้นเชื้อจะหยุดเจริญเติบโตและเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ มีการเปลี่ยนกรดที่สร้างให้เป็นตัวทำละลาย ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และคงที่ ปริมาณบิวทานอลสูงสุดจะเกิดในชั่วโมงที่ 36 ค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเป็น 5.03

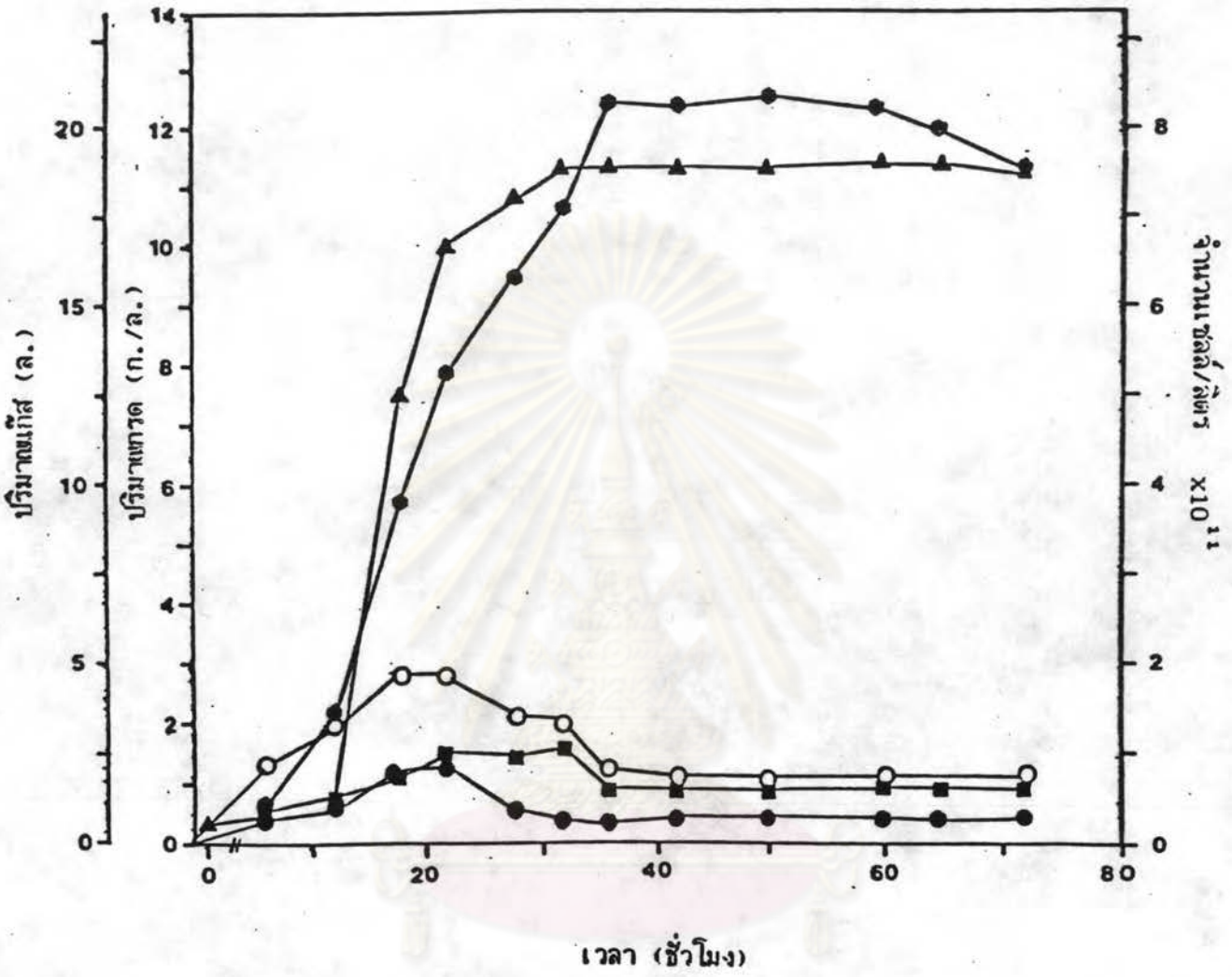


รูปที่ 35 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5.5 โดย Cl. butylicum NRRL B592

△ บิวทานอล ● ตัวทำละลายรวม

○ อาซีโตน ○ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

□ เอธานอล

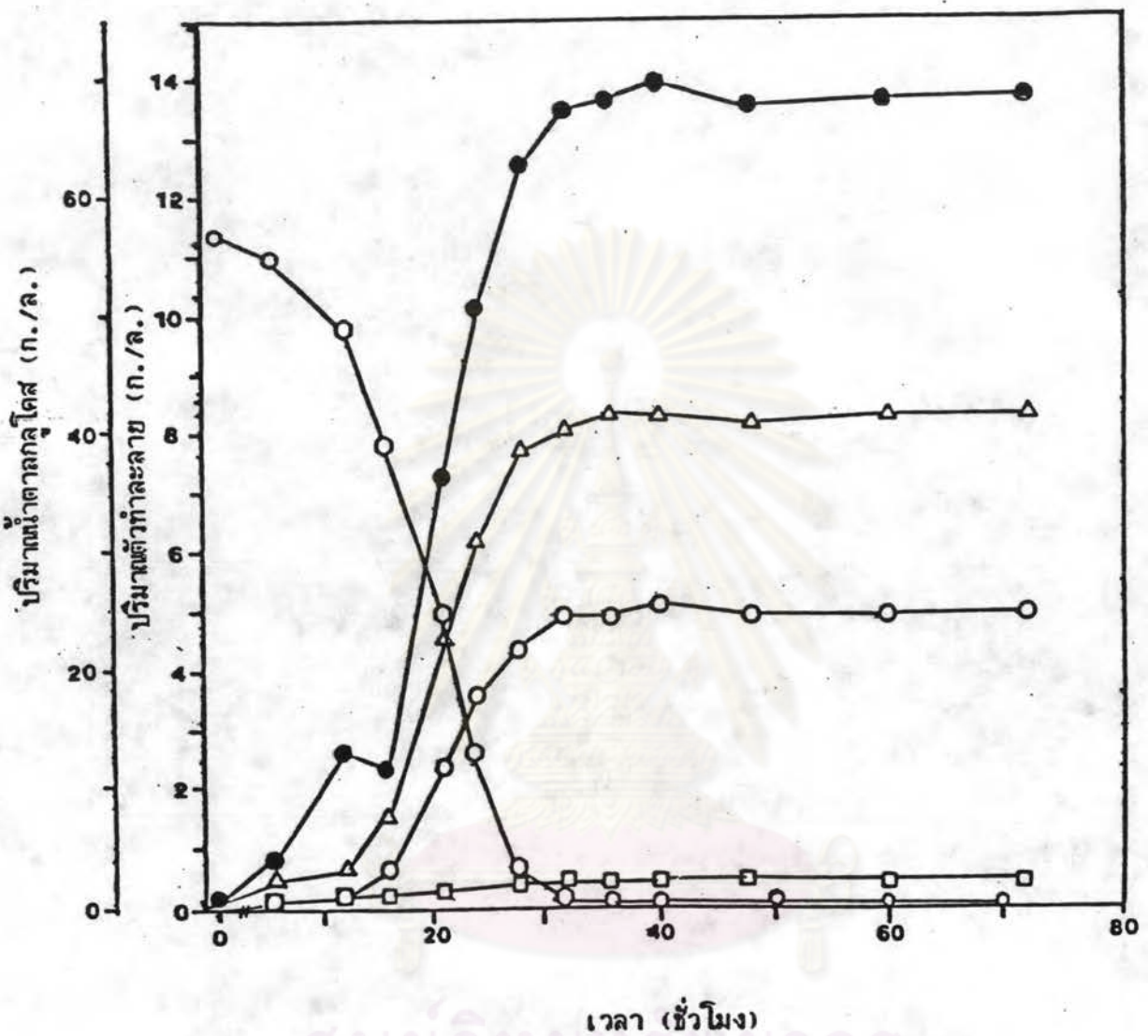


รูปที่ 36 ปริมาณกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5.5 โดย Cl. butylicum NRRL B592

● กรดบิวทีริค ▲ ปริมาตรแก๊ส

■ กรดอะเซติก ⬢ จำนวนเซลล์

○ ปริมาณกรดรวม

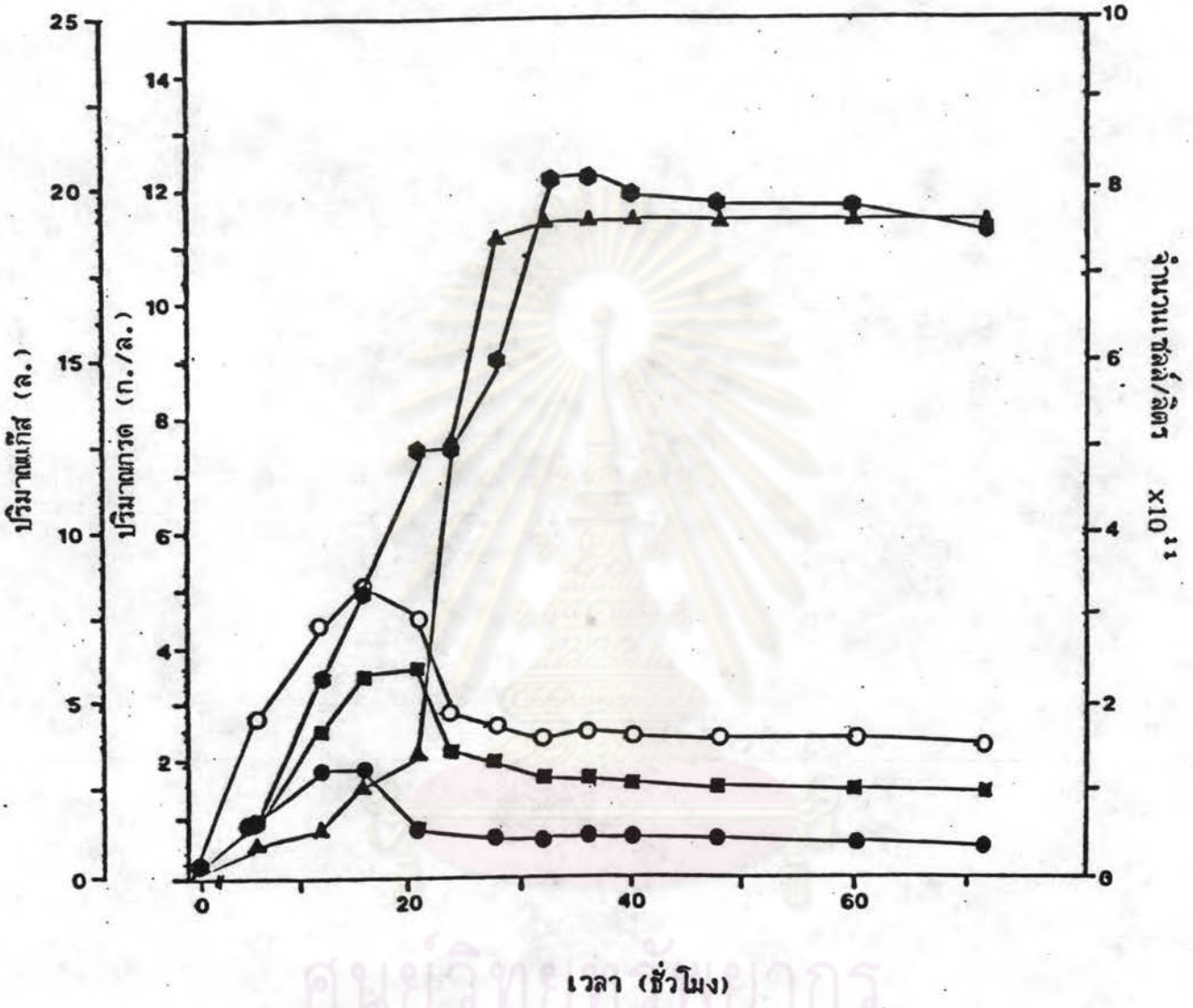


รูปที่ 37 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0 โดย Cl. butylicum NRRL B592

△ บิวทานอล ● ตัวทำละลายรวม

○ อาซีโตน ○ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

□ เอธานอล

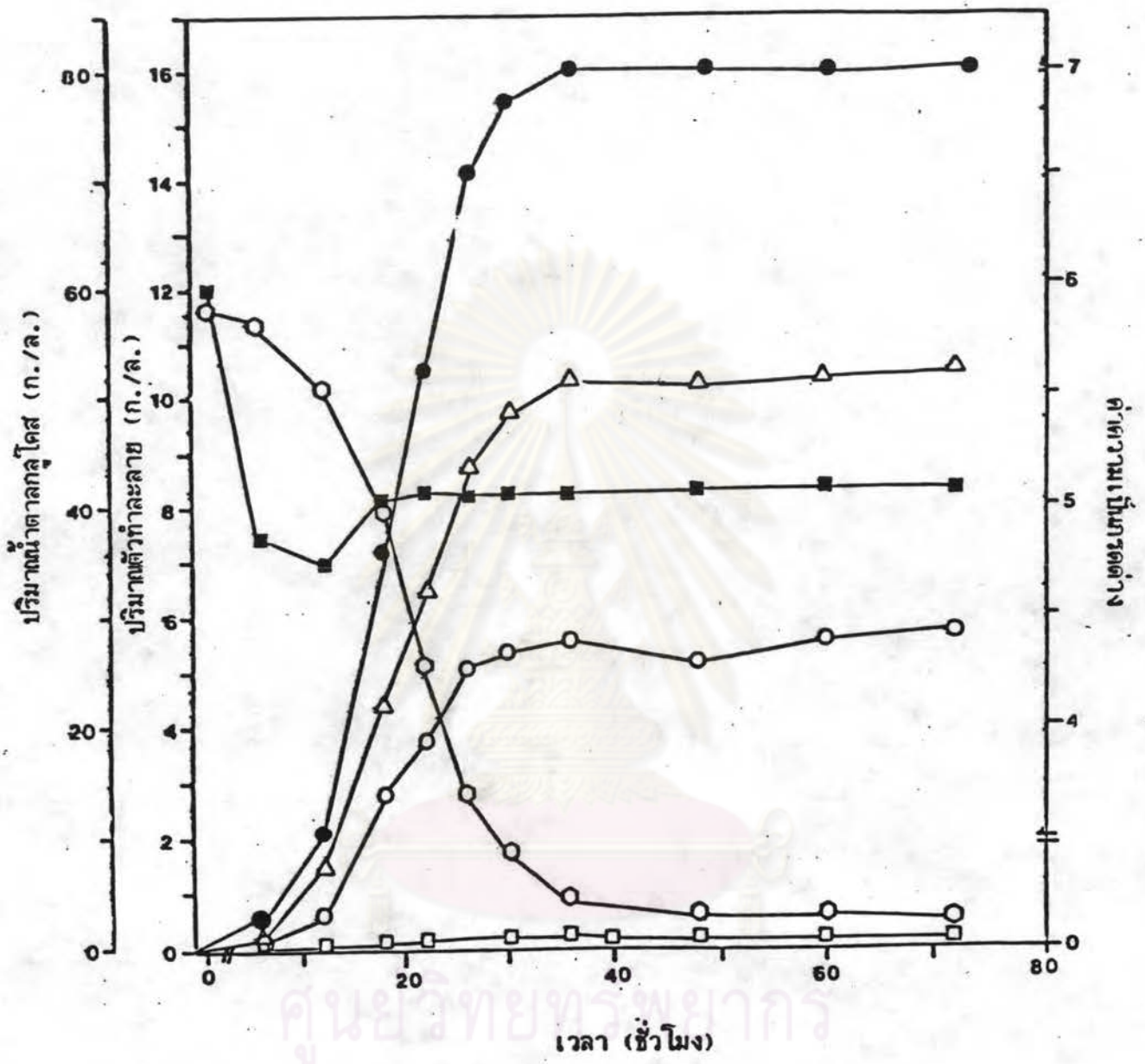


รูปที่ 38 ปริมาณกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ผักตบชวาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 6.0 โดย Cl. butylicum NRRL B592

● กรดบิวทีริค ▲ ปริมาตรแก๊ส

■ กรดอะเซติก ● จำนวนเซลล์

○ ปริมาณกรดรวม



รูปที่ 39 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดย Cl. butylicum NRRL B592

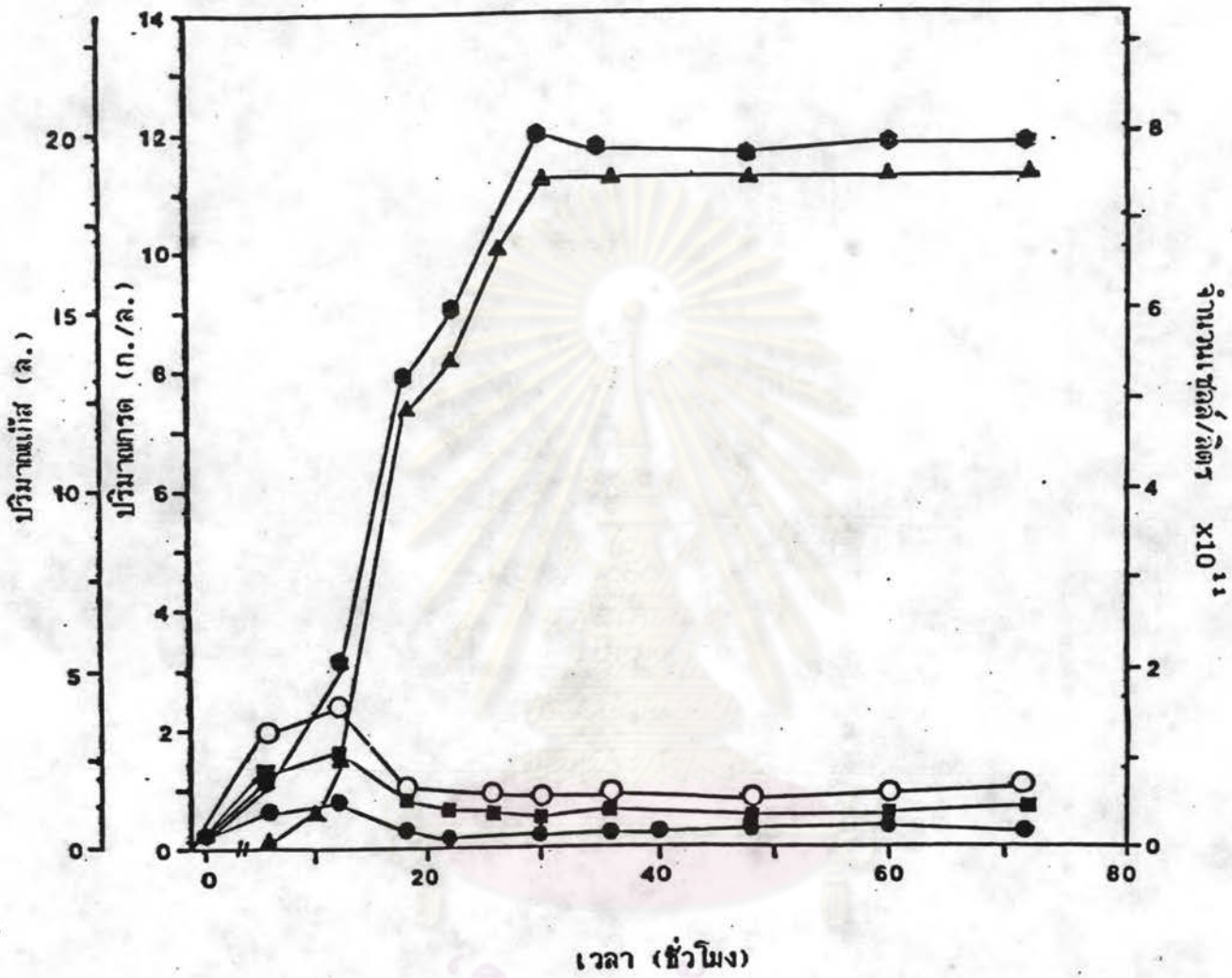
△ บิวทานอล ● ตัวทำละลายรวม

○ อาซีโตน ⬡ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

□ เอธานอล ■ ค่าความเป็นกรดด่าง

หมายเหตุ : ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 40 ปริมาณกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยโดย Cl. butylicum NRRL B592

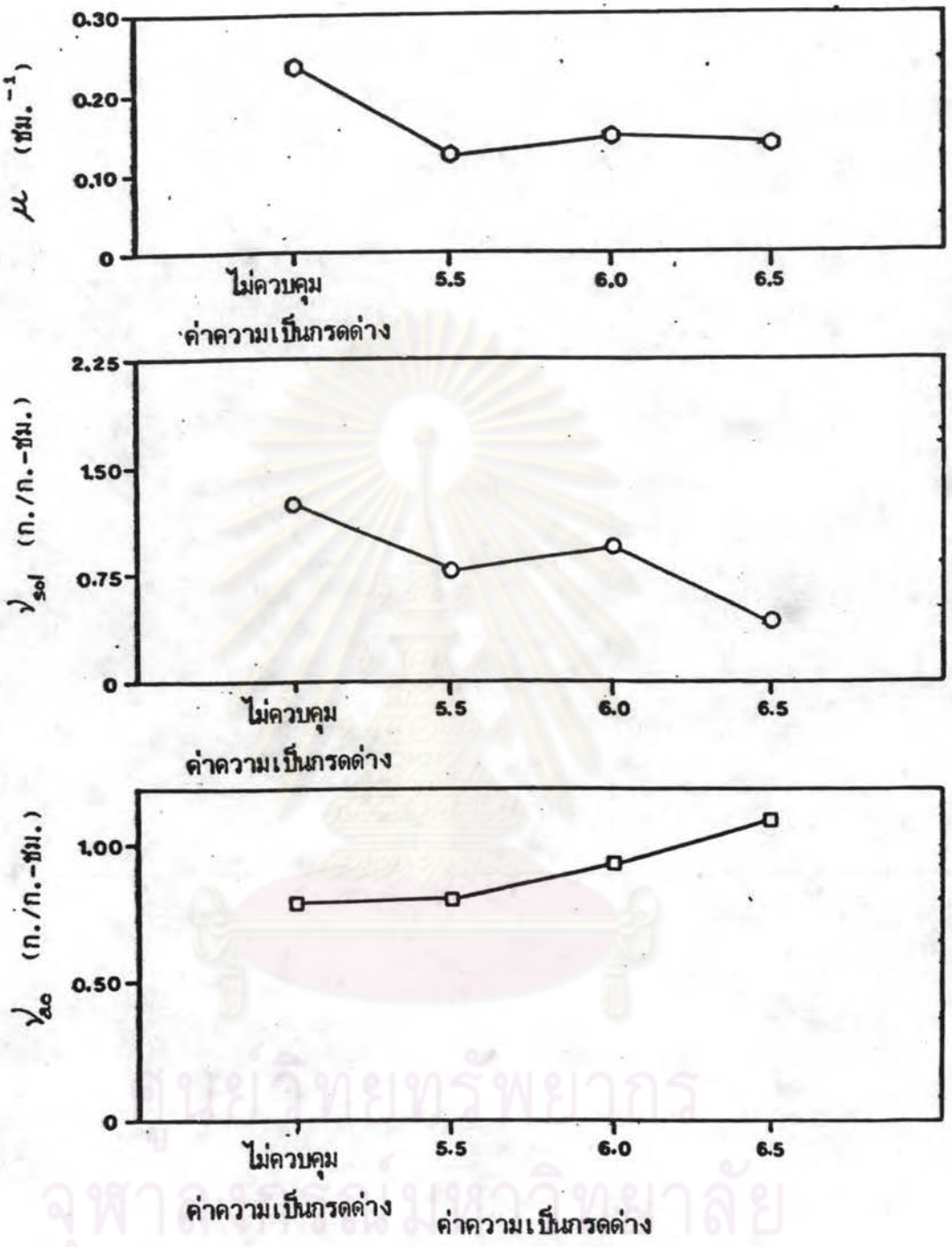
- ● กรดบิวทีริค
- ■ กรดอะเซติก
- ○ ปริมาณกรดรวม
- ▲ ปริมาตรแก๊ส
- ⬢ จำนวนเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 แสดงผลของความเป็นกรดด่างต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

ความเป็นกรดด่าง	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์สูงสุด (เซลล์/ลิตร)	ปริมาณแก๊สทั้งหมด (ลิตร)	ปริมาณตัวทำละลาย (กรัม/ลิตร)			ปริมาณตัวทำละลาย (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)		% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต
				อาซีโตน	บิวทานอล	เอธานอล		กรดบิวทีริค	กรดอะเซติก	
5.5	59.90	$8.3x10^{11}$	18.90	4.0387	8.2810	0.2416	12.5613	1.3064	1.5416	22.60
6.0	57.84	$8.1x10^{11}$	18.85	5.1301	8.3167	0.5420	13.9883	1.890	3.644	24.14
6.5	46.57	$8.8x10^{11}$	19.0	4.8523	8.6047	0.4851	13.9421	1.8890	3.4669	29.93
ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง	47.65	$8.2x10^{11}$	18.70	5.7369	10.3426	0.3016	16.3811	0.8027	1.5825	34.38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 41 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักที่ค่าความเป็นกรดด่างต่าง ๆ

- ○ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)
- □ อัตราการสร้างกรดจำเพาะ ($\gamma_{s/c}$)
- ○ อัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะ ($\gamma_{s/l}$)

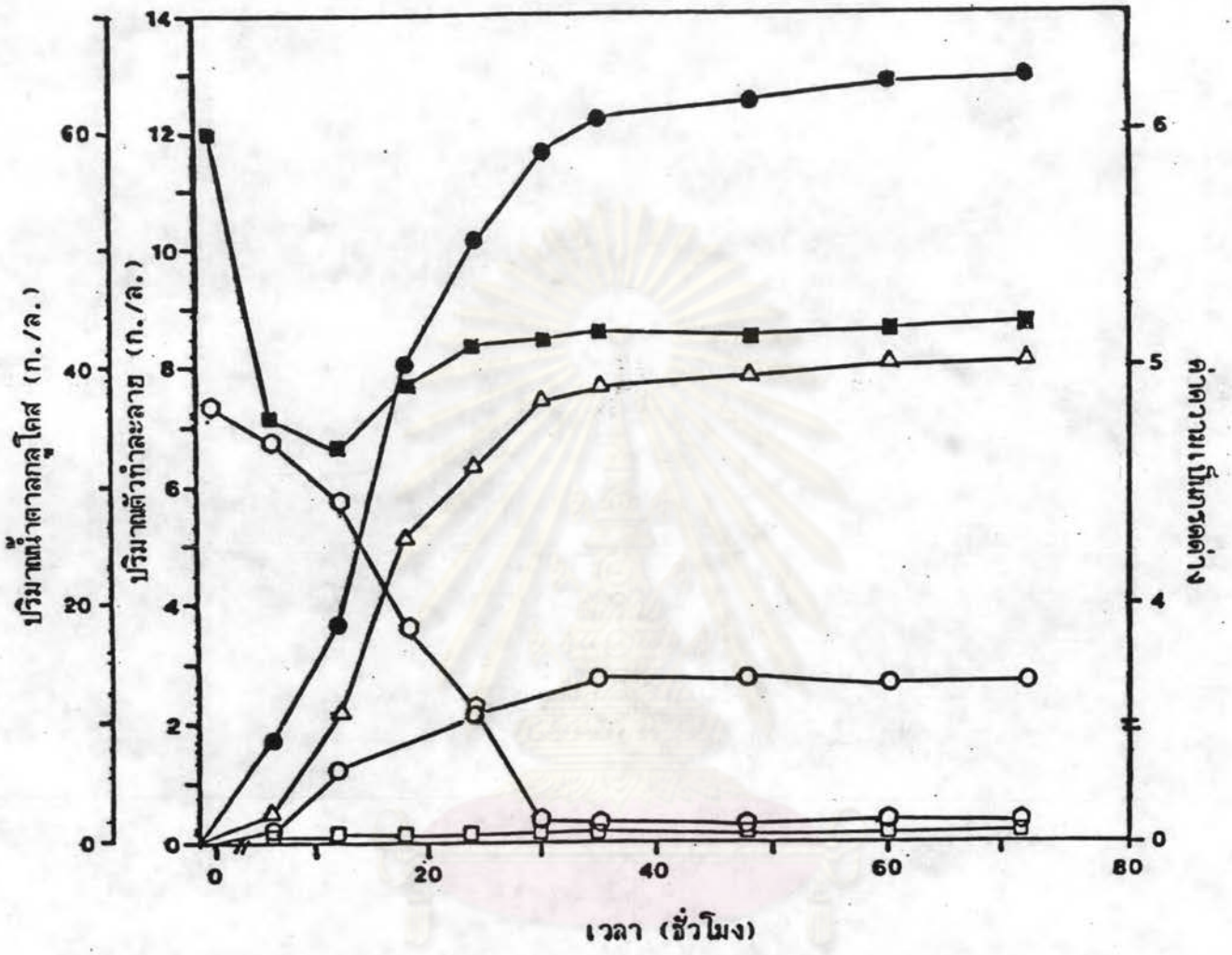
เมื่อนำข้อมูลจากรูปที่ 38 มาคำนวณเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักที่ภาวะความเป็นกรดด่างต่าง ๆ จะได้ค่าจลน์ศาสตร์ที่ออกมาดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ที่สภาวะความเป็นกรดด่างต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	μ สูงสุด ($ชม.^{-1}$)	Y_{pc} สูงสุด (ก./ก. ชม.)	Y_{po1} สูงสุด (ก./ก. ชม.)
ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง	0.23636	0.7875	1.0799
5.5	0.1350	0.8146	0.7635
6.0	0.14815	0.9307	0.6142
6.5	0.1405	1.0854	0.4175

6.3 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

จากผลการทดลองในข้อ 5.2 เชื้อ Cl. butylicum NRRL B592 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลาย 60 กรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาถึงความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในถังหมัก โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยใช้ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.5 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 39, 40 และ 42-45 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 21



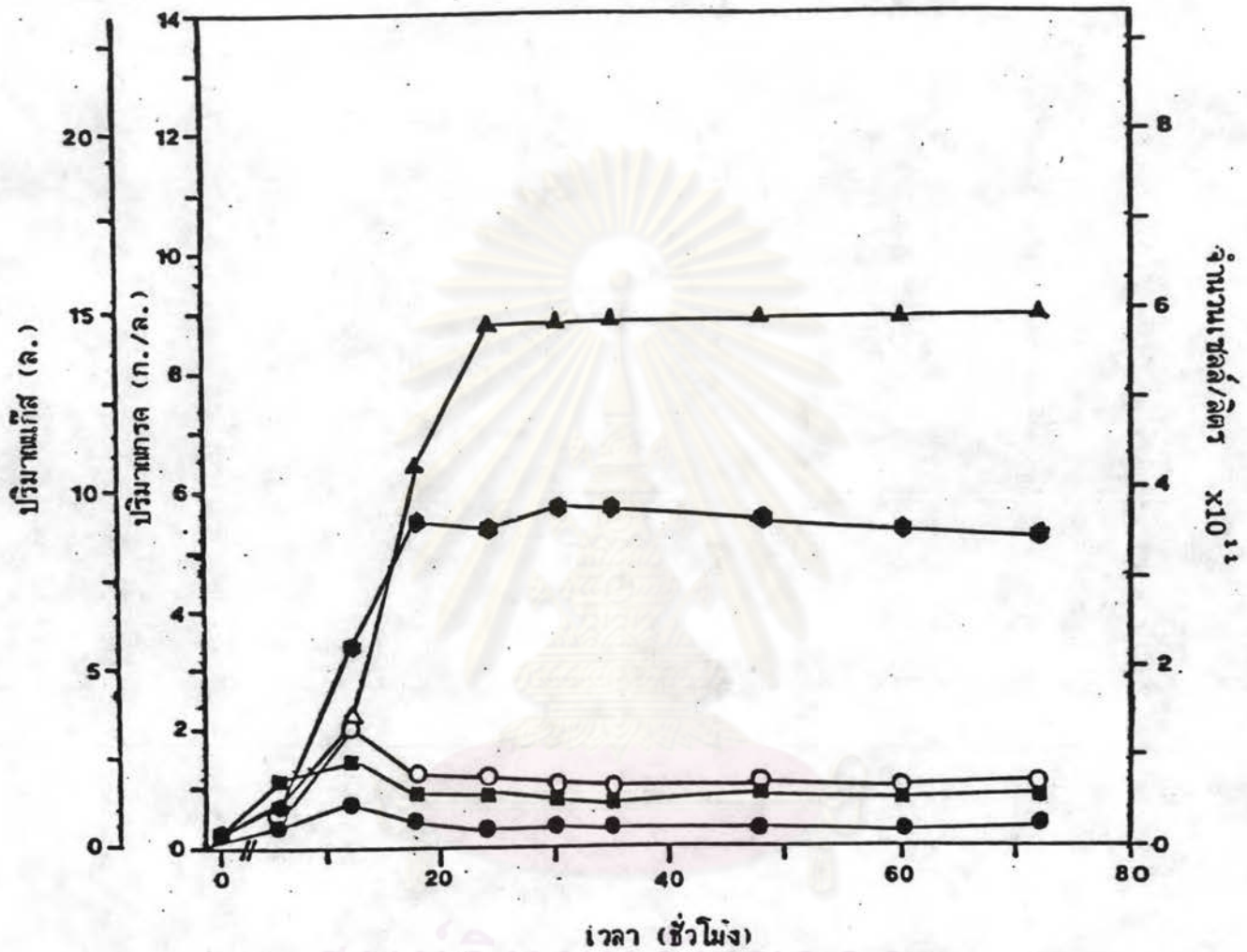
รูปที่ 42 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดย Cl. butylicum NRRL B592

△ บิวทานอล ● ตัวทำละลายรวม

○ อาซีโตน ○ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

□ เอธานอล ■ ค่าความเป็นกรดด่าง

หมายเหตุ : ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.5

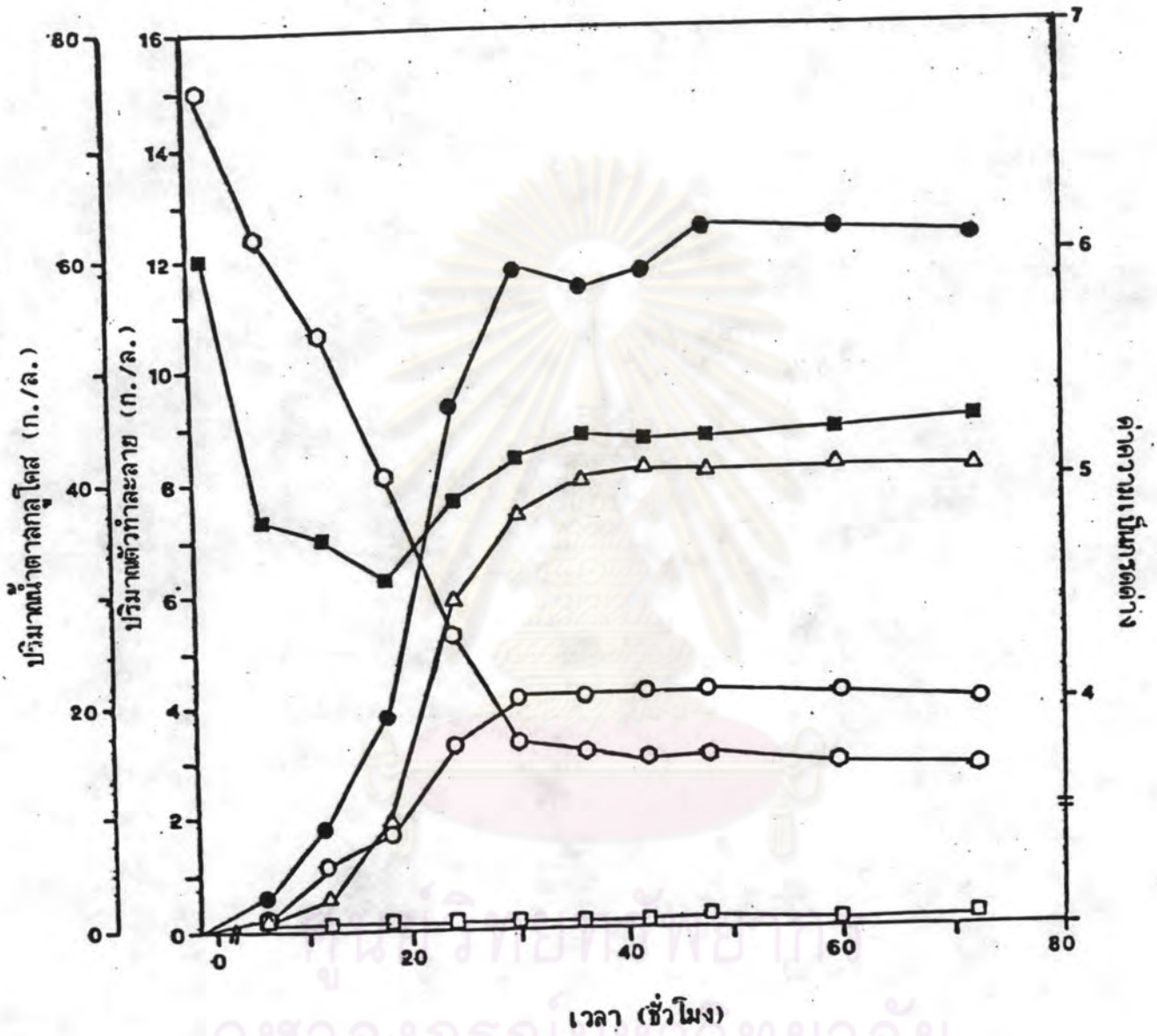


รูปที่ 43 ปริมาณกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดย Cl. butylicum NRRL B592

● กรดบิวทีริค ▲ ปริมาตรแก๊ส

■ กรดอะเซติก ⬢ จำนวนเซลล์

○ ปริมาณกรดรวม



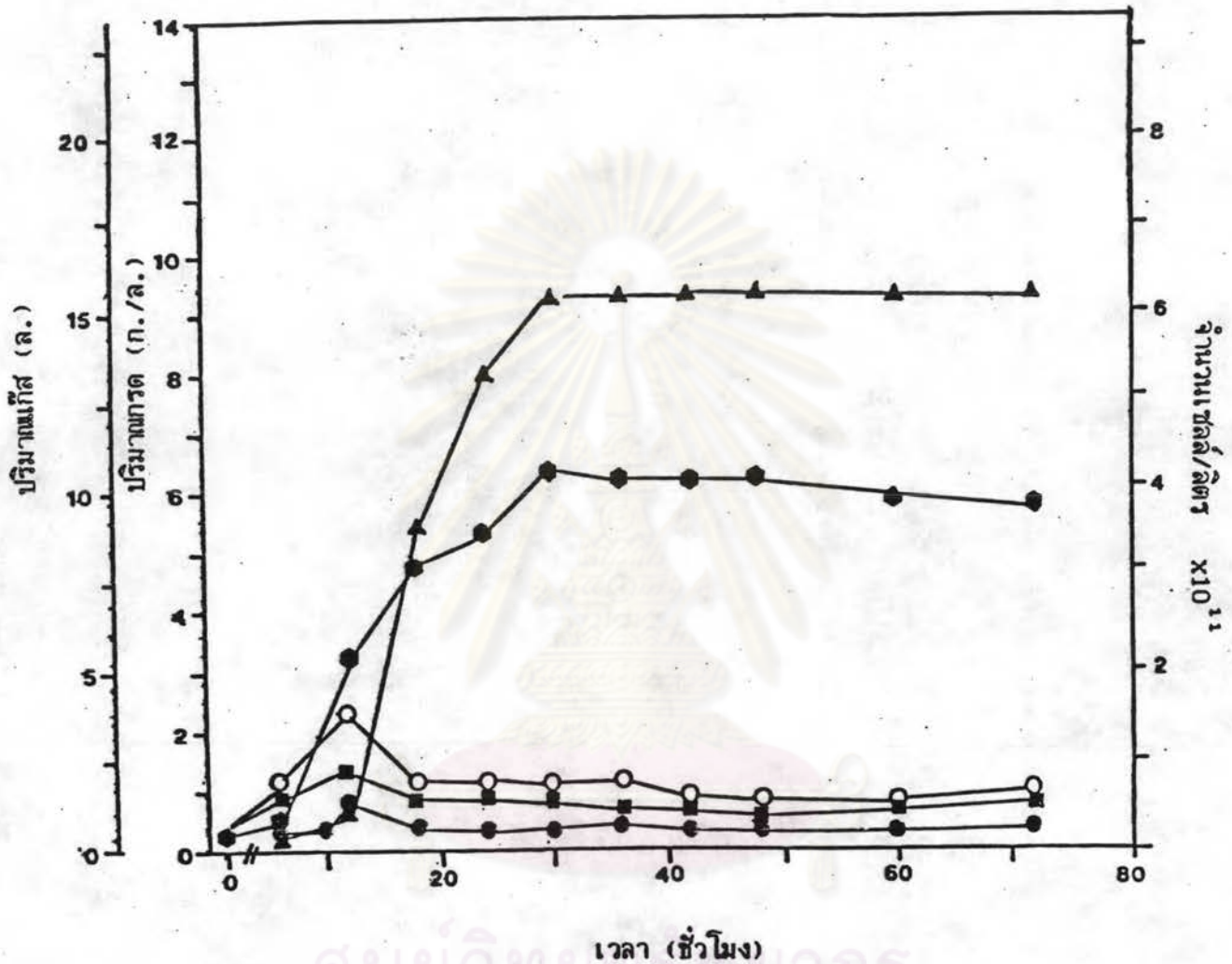
รูปที่ 44 ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดย Cl. butylicum NRRL B592

△ บิวทานอล ● ตัวทำละลายรวม

○ อาซีโตน ○ ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

□ เอธานอล ■ ค่าความเป็นกรดด่าง

หมายเหตุ : ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.5



รูปที่ 45 ปริมาณกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดย Cl. butylicum NRRL B592

● กรดบิวทีริค ▲ ปริมาตรแก๊ส

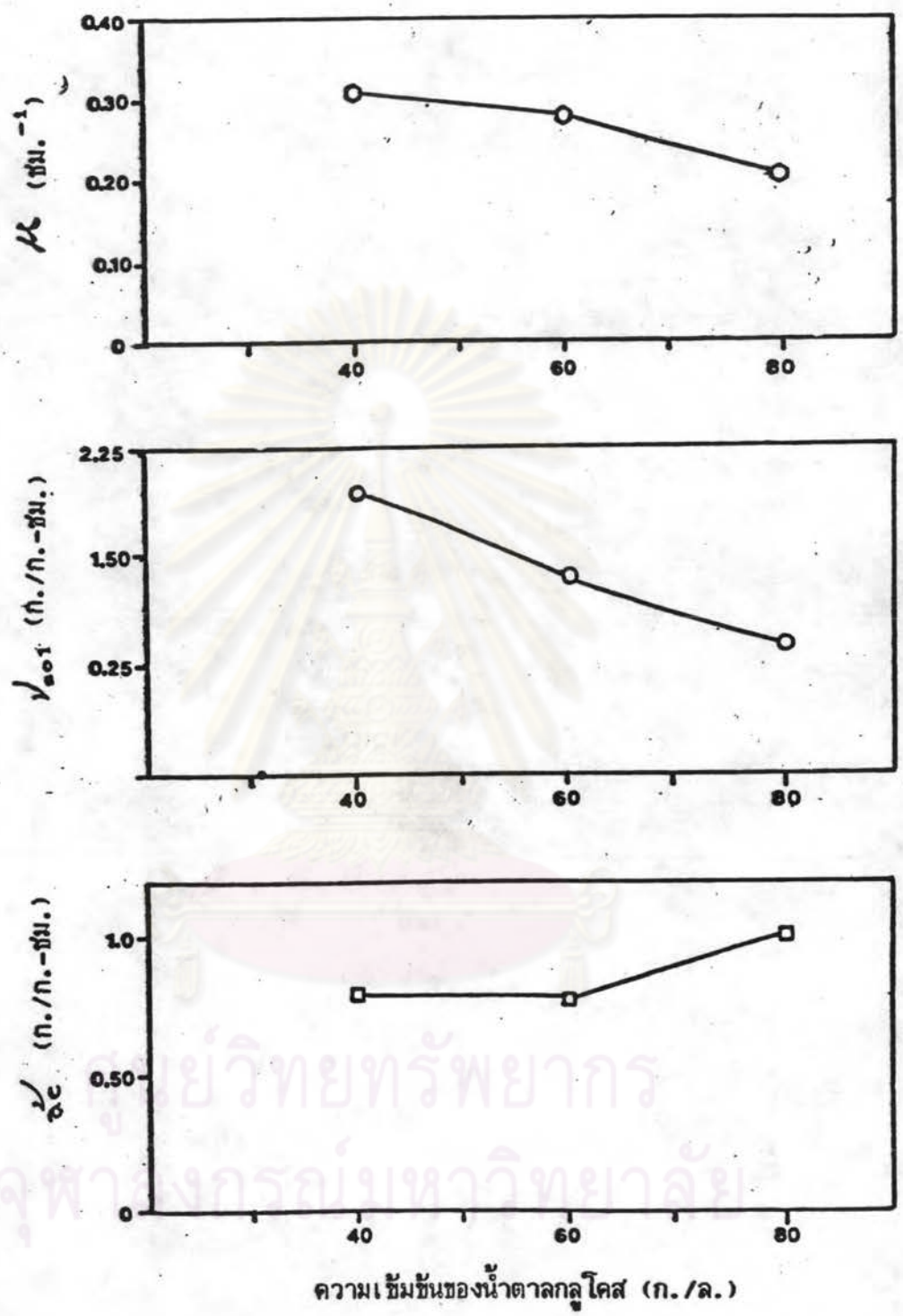
■ กรดอะเซติก ⬢ จำนวนเซลล์

○ ปริมาณกรดรวม

ตารางที่ 21 แสดงผลของความเข้มข้นน้ำตาลต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลที่ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง

ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเซลล์สูงสุด (เซลล์/ลิตร)	ปริมาณแก๊สทั้งหมด (ลิตร)	ปริมาณตัวทำละลาย (กรัม/ลิตร)			ปริมาณตัวทำละลาย (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรด (กรัม/ลิตร)		% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต
				อาซีโตน	บิวทานอล	เอธานอล		กรดบิวทีริค	กรดอะเซติก	
40	36.1	3.8×10^{11}	14.60	2.6862	8.0622	0.297	10.4581	0.4307	1.1797	30.35
60	47.64	8.2×10^{11}	18.70	5.7369	10.3426	0.3016	16.3811	0.8027	1.5825	34.38
80	60.2	4.2×10^{11}	15.45	4.3061	8.2926	0.1923	12.791	0.8556	1.2240	21.25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 46 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ

- ○ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)
- □ อัตราการสร้างกรดจำเพาะ (ν_{sc})
- ○ อัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะ (ν_{sol})

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองจะเห็นว่า ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมคือ 60 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณตัวทำลายสูงสุด คือ บิวทานอล 10.3426 อาซิโตน 5.7367 และเอธานอล 0.3016 กรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลผลิตเท่ากับ 34.38

เมื่อหมักในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณตัวทำละลายรวม 10.8081 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลหมดภายใน 30 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่าเท่ากับ 30.58

เมื่อทำการหมักในอาหารที่มีความของเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร คลอสตริเดียมจะผลิตตัวทำลายในปริมาณไม่สูงมาก เมื่อเทียบกับการหมักในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลผลิตมีค่าเป็น 21.25 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือภายหลังการหมัก 16.1 กรัมต่อลิตร

ตลอดช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแตกต่างกันนี้ ค่าความเป็นกรดค่างของอาหารมีค่าเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกัน โดยเชื้อจะมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 4.65, 4.73 และ 4.62 ตามลำดับ

จากรูปที่ 47 แสดงผลของค่าจลน์ศาสตร์เมื่อทำการหมักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่าง ๆ กัน และสรุปผลการทดลองในตารางที่ 22

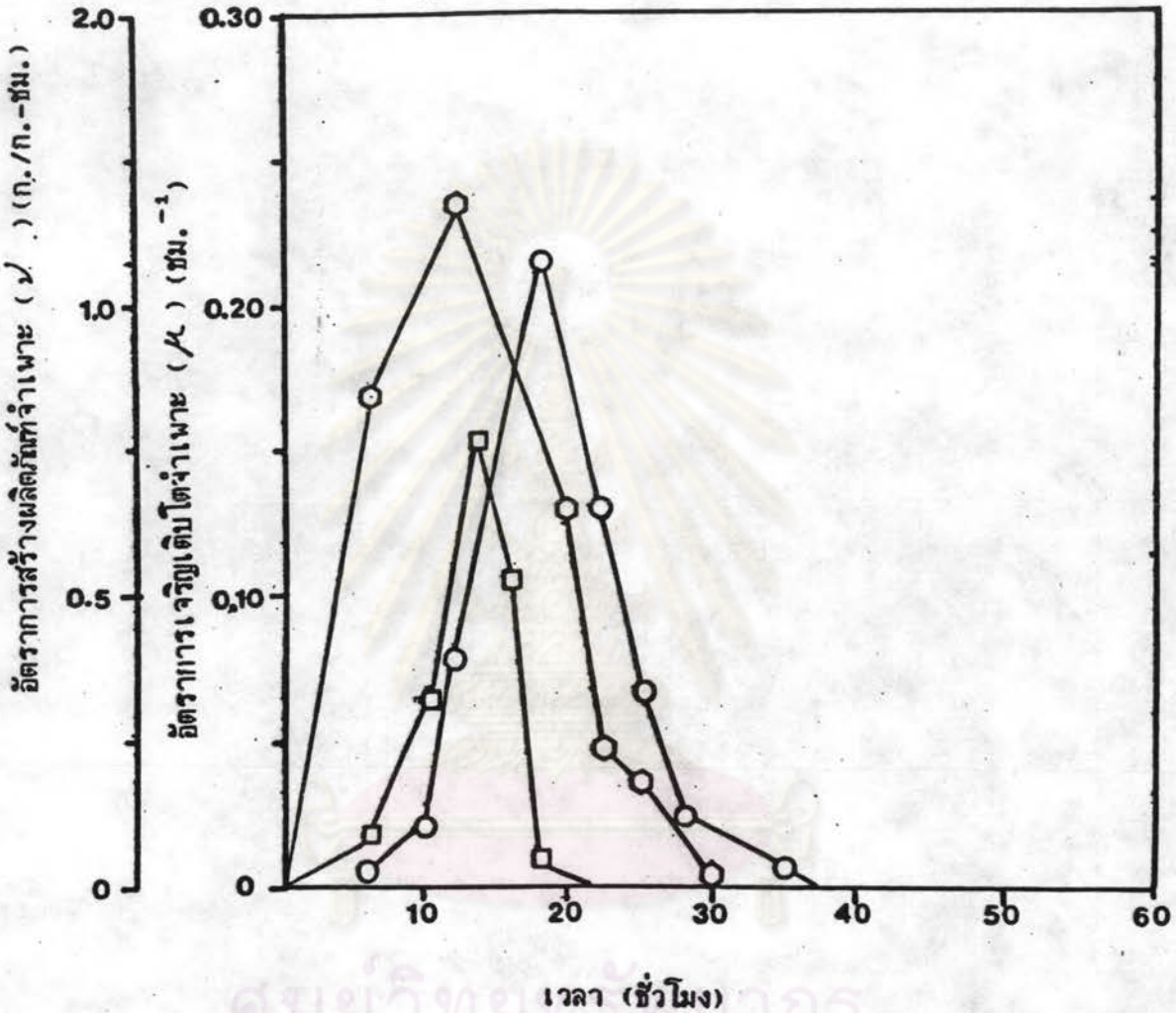
ตารางที่ 22 แสดงผลของค่าจลน์ศาสตร์เมื่อทำการหมักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (ก./ล.)	μ สูงสุด ($ชม.^{-1}$)	ν_{ac} สูงสุด (ก./ก. ชม.)	ν_{sol} สูงสุด (ก./ก. ชม.)
40	0.3077	0.8067	1.9387
60	0.23636	0.7875	1.0799
80	0.2133	1.0231	0.8892

เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) อัตราการสร้างกรดจำเพาะ (ν_{pc}) และอัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะ (ν_{s01}) ต่อเวลาของการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ Cl. butylicum NRRL B592 แสดงในรูปที่ 45 จะเห็นได้ว่าค่า μ นี้ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 6 ชั่วโมงแรกของการหมักและมีค่าสูงสุดเมื่อดำเนินการหมักถึงชั่วโมงที่ 12 ส่วนอัตราการสร้างกรดจำเพาะ (ν_{pc}) เริ่มต้นในช่วงเวลาที่สัมพันธ์กับการเพิ่มของค่า μ และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 14 ในชั่วโมงที่ 12-18 อัตราการการเจริญเติบโตของเชื้อเริ่มลดลง โดยค่า μ เริ่มมีค่าน้อยลง ในระยะนี้คลอสตริเดียมมีการสร้างตัวทำละลายอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่า ν_{s01} มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยที่ชั่วโมงที่ 18 ให้ค่าสูงสุด ขณะเดียวกันการสร้างกรดมีอัตราลดลงที่ชั่วโมง 22 ของการหมัก ปริมาณกรดที่ลดลงเริ่มคงที่ (ν_{pc} มีค่าเป็นศูนย์) ส่วนค่า ν_{s01} มีค่าลดลงตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 30 เชื้อหยุดการเจริญเติบโต (จำนวนเซลล์คงที่) โดยมีค่า μ มีค่าเป็นศูนย์ ส่วนอัตราการสร้างตัวทำละลาย (ν_{s01}) มีค่าเป็นศูนย์ที่ชั่วโมง 36

ในรูปที่ 48 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และปริมาณบิวทานอลที่ผลิตขึ้นตลอดการหมัก ปรากฏว่าที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ของบิวทานอล จะไม่มีผลกระทบต่อค่า μ แต่เมื่อเวลาของการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณบิวทานอลที่ผลิตถูกสะสมในน้ำหมักที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.3 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ค่า μ ลดลง และความเข้มข้นของบิวทานอล 9.7 กรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยสมบูรณ์ (μ มีค่าเป็นศูนย์)

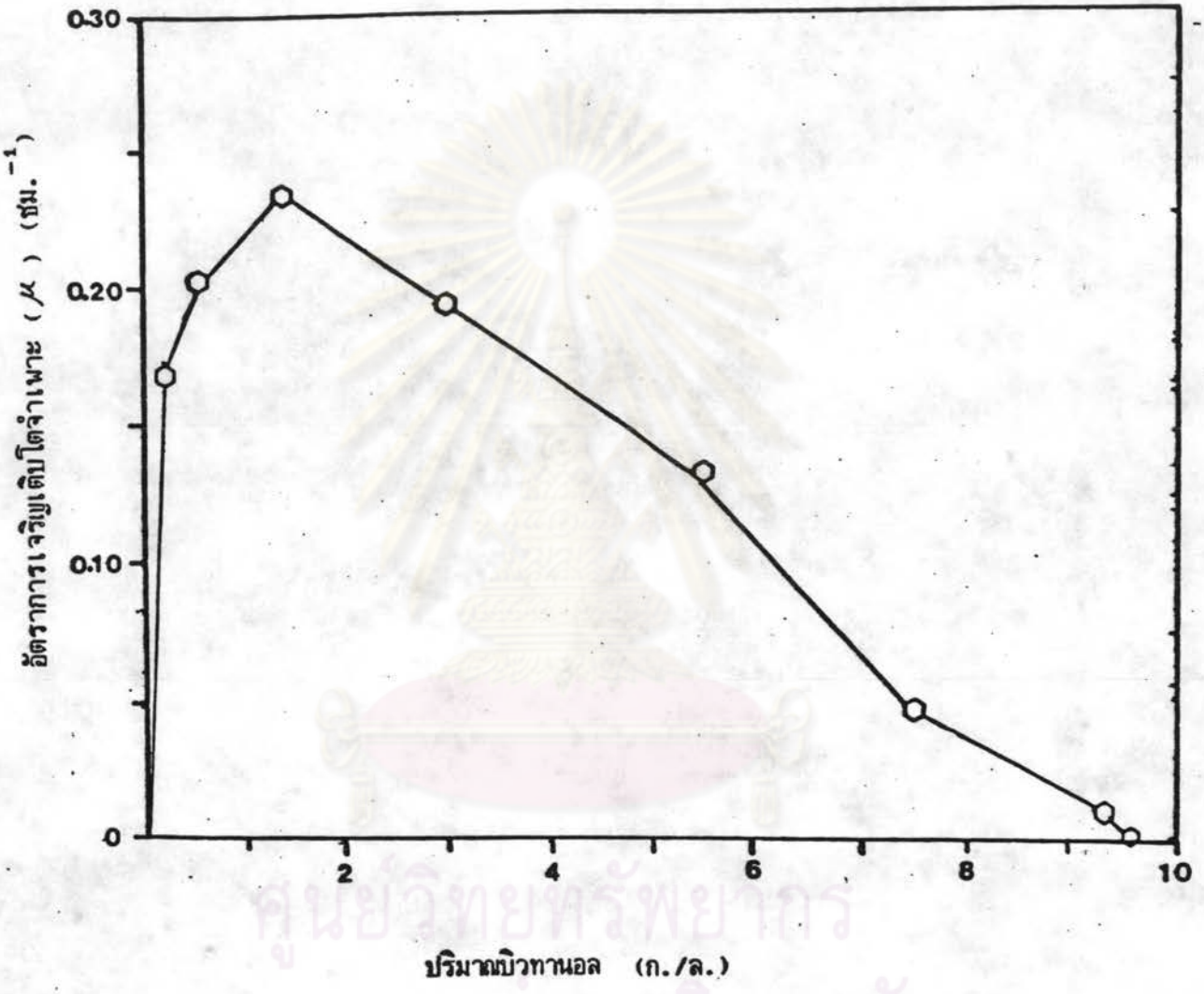
การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของการหมักที่สภาวะนี้ โดยเชื้อ Cl. butylicum NRRL B592 พบว่าเชื้อนี้สามารถสร้างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 23



รูปที่ 47 แสดงความสัมพันธ์ของค่าจลน์ศาสตร์ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

- ○ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)
- □ อัตราการสร้างกรดจำเพาะ (ν_{ac})
- ○ อัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะ (ν_{sol})

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 48 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และปริมาณบิวทานอล ที่ผลิตขึ้นตลอดการหมัก

ตารางที่ 23 แสดงสัดส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้ภายหลังการหมัก

ชนิดของผลิตภัณฑ์	น้ำหนักผลิตภัณฑ์	%การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์	อัตราส่วนตัวทำละลาย	องค์ประกอบของแก๊ส (98)
บิวทานอล, อาซีโตน เอธานอล	16.3811	34.3852	บิวทานอล64.14% อาซีโตน 35.02% เอธานอล 1.84%	คาร์บอนไดออกไซด์60% ไฮโดรเจน 40%
กรดบิวทีริค, กรดอะเซติค	2.3852	5.0067		
ชีวมวล	2.7660	5.8060		
คาร์บอนไดออกไซด์	25.3547	53.2215		
ไฮโดรเจน	0.7530	1.5806		

หมายเหตุ : ไม่รวมสารอื่น ๆ เช่น อะเซทิลเมธิลคาร์บินอล, เยลโลว์ออยส์ และวิตามิน เนื่องจากผลิตในปริมาณน้อยมาก (98)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย