บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การปรับสภาพฟางข้าว

1. การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ฟางข้าวที่ปรับสภาพ ด้วยการนำฟางมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายสูงขึ้น สามารถแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกได้มากขึ้น (ตารางที่ 4.1) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 2.0 โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่ให้ผลการปรับสภาพดีที่สุดในวิธีนี้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Doneffer (1969) ที่พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม สำหรับการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ควรมีค่าอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 2.5 โมลาร์ แต่จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายสูงขึ้น จะมีน้ำหนักฟางที่หายไปในระหว่างการปรับสภาพสูงขึ้นด้วย เมื่อนำฟางที่แช่ครบ 24 ชั่วโมง ไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้ความเข้มข้นเดียวกับที่แช่ ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 90 นาที พบว่าประสิทธิภาพการปรับสภาพจะสูงขึ้น ตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3) พิจารณาผลการปรับสภาพที่ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 2.0 โมลาร์ (ตารางที่ 4.2) เมื่ออุณหภูมิของการต้มสูงขึ้น สามารถแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกได้มากขึ้น ที่อุณหภูมิการต้มเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณส่วนประกอบในตะกอนฟาง หลังการปรับสภาพ เป็นเปอร์เซนต์ต่อกรัมน้ำหนักฟางแห้ง ดังนี้ คือ เซลลูโลส 94.46 เปอร์เซนต์ เฮมิเซลลูโลส 1.24 เปอร์เซนต์ และลิกนิน 2.16 เปอร์เซนต์ เมื่ออุณหภูมิของการต้มสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส พบว่า ประสิทธิภาพในการปรับสภาพค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.4) โดยมีปริมาณส่วนประกอบโดยประมาณ คือ เซลลูโลส 95 เปอร์เซนต์ เฮมิเซลลูโลส 1 เปอร์เซนต์ และลิกนิน 2 เปอร์เซนต์ ดังนั้น การต้มที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส จึงไม่เพิ่มประสิทธิภาพให้กับการปรับสภาพเท่าใดนัก และยังมีน้ำหนักฟางที่หายไป ในระหว่างการปรับสภาพสูงกว่า

(ภาคผนวก ฎ) ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ คือ ใช้ความเข้มข้นของสารละลายในการแช่ และต้มเท่ากับ 2.0 โมลาร์ โดยต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

2. <u>การปรับสภาพด้วยการต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส</u>

การนำฟางข้าวไปต้มในสาระลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่เวลาการต้มต่างๆ พบว่าเมื่อความเข้มข้นและเวลาเพิ่มขึ้น สามารถแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ออกจากเซลลูโลสได้มากขึ้น (ตารางที่ 4.3) โดยที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 โมลาร์ ต้มเป็นเวลา 45 นาที ให้ผลการปรับสภาพดีที่สุด โดยมีปริมาณส่วนประกอบในตะกอนฟางหลังการปรับสภาพเป็นเปอร์เซนต์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ดังนี้ คือ เซลลูโลส 91.88 เปอร์เซนต์ เฮมิเซลลูโลส 2.26 เปอร์เซนต์ และลิกนิน 2.72 เปอร์เซนต์ แม้ว่าการปรับสภาพด้วยวิธีนี้จะให้ผลการปรับสภาพที่ดี คือมีปริมาณเซลลูโลสเหลืออยู่สูง โดยมีเฮมิเซลลูโลส และลิกนินต่ำ แต่เนื่องจากเป็นการต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้ความเข้มข้นสูง ที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน จึงมีโอกาสที่ส่วนประกอบในฟางจะเกิดการเสียสภาพ หรือเปลี่ยนเป็นสารอื่นที่เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลส (สุภาพร ชาติวรพงศา, 2536) และเมื่อพิจารณาน้ำหนักฟางที่หายไปในระหว่างการปรับสภาพ (ตารางที่ 4.3 และภาคผนวก ฎ) พบว่ามีค่าสูงกว่าวิธีแรก ดังนั้นวิธีการนี้ จึงไม่เหมาะสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

3. <u>การปรับสภาพด้วยสารละลายเอทานอล</u>

การทดลองในส่วนนี้ เป็นการทำเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลที่เหมาะสมในการแยกลิกนินออกจากฟางข้าวได้ดีที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการปรับสภาพร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในส่วนต่อไป พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลที่แยกลิกนินได้ดีที่สุด คือที่ความเข้มข้นเท่ากับ 95 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร โดยสามารถลดปริมาณลิกนินลงเหลือ 13.53 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 4.4) ดังนั้นจึงเลือกค่าความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกลิกนินส่วนหนึ่งออกจากฟางข้าว

4. การปรับสภาพด้วยสารละลายเอทานอลร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เมื่อนำตะกอนฟางที่แยกลิกนินออกแล้วบางส่วน โดยการต้มในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร มาทำการแช่ และต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ โดยต้มที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที พบว่า ให้ผลการปรับสภาพดีกว่าการใช้สารละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4.5) แต่เมื่อเปรียบเทียบผลกับการปรับสภาพ โดยการแช่และต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์เพียงอย่างเดียว พบว่าให้ผลการปรับสภาพต่ำกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rabinovitch (1981) ที่ว่า การปรับสภาพโดยใช้หลายๆวิธีร่วมกัน อาจไม่ให้ผลดีเท่ากับการใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง ส่วนการนำตะกอนฟาง ที่ต้มในสารละลายเอทานอลแล้วไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จะให้ผลการปรับสภาพดีกว่าการใช้สารละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4.6) แต่ให้ผลใกล้เคียงกับการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพียงอย่างเดียว แม้ว่าจะให้ผลการปรับสภาพที่ดี แต่มีวิธีการที่ยุ่งยากกว่า และเนื่องจากเป็นกระบวนการหลายขั้นตอน จึงมีการหายไปของน้ำหนักฟางในระหว่างกระบวนการปรับสภาพสูงกว่าวิธีอื่น จึงไม่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้

จากการเปรียบเทียบผลการปรับสภาพทั้งหมด พบว่า วิธีการปรับสภาพที่ดีที่สุด คือ การนำฟางข้าวไปแช่ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ความเข้มข้นเดียวกับที่แช่ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ซึ่งการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ มีน้ำหนักฟางที่หายไปในระหว่างการปรับสภาพเท่ากับ 43.48 เปอร์เซนต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีดังกล่าวมาใช้ในการปรับสภาพฟางข้าว เพื่อนำเซลลูโลสในตะกอนฟางไปใช้ในการศึกษาสภาวะการย่อยต่อไป

การย่อย

1. การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าว

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.8 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายโซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส คือที่ค่าเท่ากับ 4.0 เนื่องจากที่สภาวะนี้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ จากการย่อยเซลลูโลสได้สูงสุด คือ 294.80 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลลูโลส จึงเลือกสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย

2. การหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าว

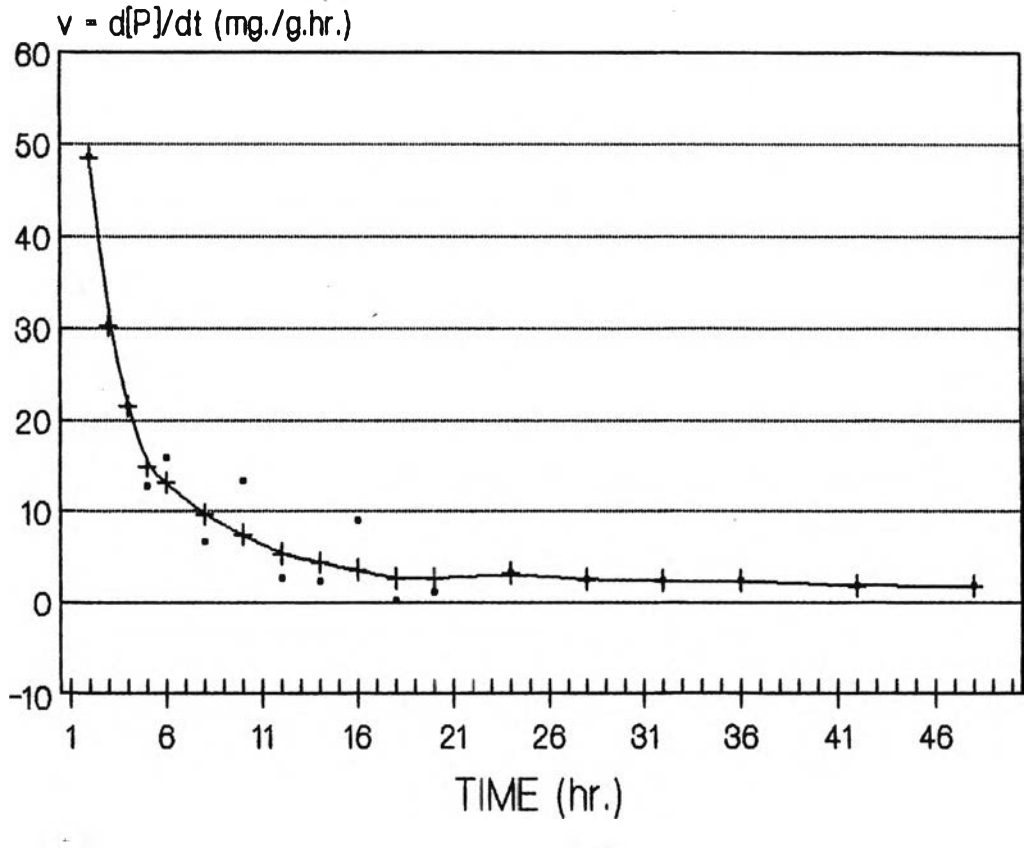
จากตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.9 พบว่าที่อุณหภูมิของเครื่องอังน้ำอุ่นเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าว ที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ได้เท่ากับ 310.35 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลลูโลส ซึ่งเป็นค่าสูงสุด โดยทำปฏิกิริยาการย่อยในสารละลายโซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0 จึงเลือกอุณหภูมิดังกล่าวเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้

3. การหาค่าอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลส ในฟางข้าว

เมื่อนำเซลลูโลสในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพ มาทำปฏิกิริยาการย่อยกับเอนไซม์เซลลูเลส ในสารละลายโซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการย่อยเท่ากับ 24 ชั่วโมง พบว่าที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเซลลูโลส ในช่วง 100 ถึง 500 ไมโครลิตรต่อกรัมเซลลูโลส จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ แปรตามปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น ที่ปริมาณเอนไซม์มากกว่า 500 ไมโครลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าค่อนข้างคงที่ โดยไม่ขึ้นกับปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น อธิบายได้ว่าเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสถูกยับยั้งโดยปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น เมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณมากเกินไป จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จนกระทั่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ปฏิกิริยาจึงหยุด จึงไม่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอีก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ค่าอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเซลลูโลส ที่เหมาะสมในการย่อย เท่ากับ 500 ไมโครลิตรต่อกรัมเซลลูโลส

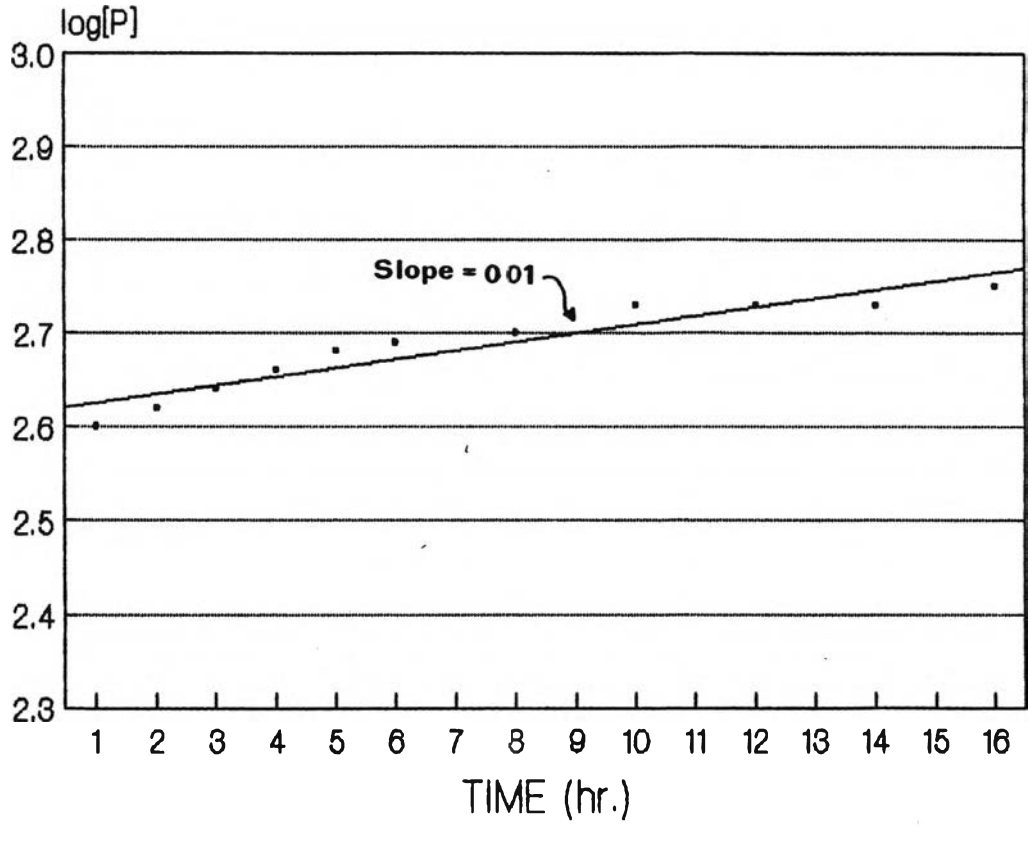
4. การหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าว

ผลการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ในสารละลายโซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 ใช้ปริมาณเอนไซม์ในการย่อยในอัตราส่วน 500 ไมโครลิตรต่อกรัมเซลลูโลส ที่อุณหภูมิของการย่อยเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.11 พบว่า ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการย่อย จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเริ่มช้าลงหลังชั่วโมงที่ 6 ในอัตราที่คงที่ จนถึงชั่วโมงที่ 16 หลังชั่วโมงที่ 16 ของการย่อย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าคงที่ เมื่อนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มาคำนวณอัตราเร็วของปฏิกิริยา (v) (ภาคผนวก ฏ) พบว่าหลังชั่วโมงที่ 16 ของการย่อย อัตราเร็วของปฏิกิริยา มีค่าค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 5.1) หมายความว่า หลังชั่วโมงที่ 16 ของการย่อย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ไม่เพิ่มขึ้นมากนัก ไม่ว่าจะทำปฏิกิริยานานกว่า 16 ชั่วโมง เป็นเวลาเท่าใด จึงยุติปฏิกิริยาลงที่ชั่วโมงที่ 16 ของการย่อย และเลือกค่าดังกล่าวเป็นเวลาที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลสจากฟางข้าว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในงานวิจัยนี้



รูปที่ 5.1 กราฟแสดงอัตราเร็วของปฏิกิริยา (v) ที่เวลาต่างๆ ของการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ จากการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าว ที่เวลาต่างๆ สามารถนำมาสร้างเป็นสมการที่ใช้อธิบาย ความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ ([P]) กับเวลา (t) ที่ใช้ในการย่อย โดยพิจารณาในช่วงที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้แปรตามเวลาที่เพิ่มขึ้น (ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 16 ของการย่อย) นำมาหาค่าลอการิทึม (logarithm) (log[P], ภาคผนวก ฎ) แล้วนำไปเขียนกราฟระหว่างค่า log[P] กับเวลา ได้กราฟแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 กราฟแสดงค่า log[P] ที่เวลาใดๆ ของการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

กราฟที่ได้เป็นเส้นตรง ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ซึ่งสามารถเขียนสมการอัตราเร็วของปฏิกิริยา ได้ว่า

$$v = d[P]/dt = k[P] \qquad (5\text{-}1)$$

k = ค่าคงที่อัตราเร็วของปฏิกิริยา, ชั่วโมง$^{-1}$

จัดรูปสมการ (5-1) $d[P]/[P] = kdt$

อินทิเกรท $$-\int_{[P_o]}^{[P]} d[P]/[P] = k\int_{0}^{t} dt$$

เมื่อ P_o = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ที่เวลาเริ่มต้น, มิลลิกรัม (ที่ t= 0)

จะได้ $\ln([P]/[P_o]) = kt$

หรือ $2.303 \log ([P]/[P_o]) = kt$

จัดรูป $$\log [P] = (k/2.303)t + \log[P_o] \qquad (5\text{-}2)$$

ค่า (k/2.303) คือ ค่าความชันของกราฟ ที่เขียนระหว่าง log[P] กับ เวลา และ ค่า log $[P_o]$ คือจุดตัดบนแกน log [P] กราฟที่ได้จากผลการทดลอง ในช่วง 16 ชั่วโมงแรกของการย่อย มีค่าความชันเท่ากับ 0.01 และตัดแกน log [P] ที่จุด 2.62 นั่นคือ

$$(k/2.303) = 0.01$$

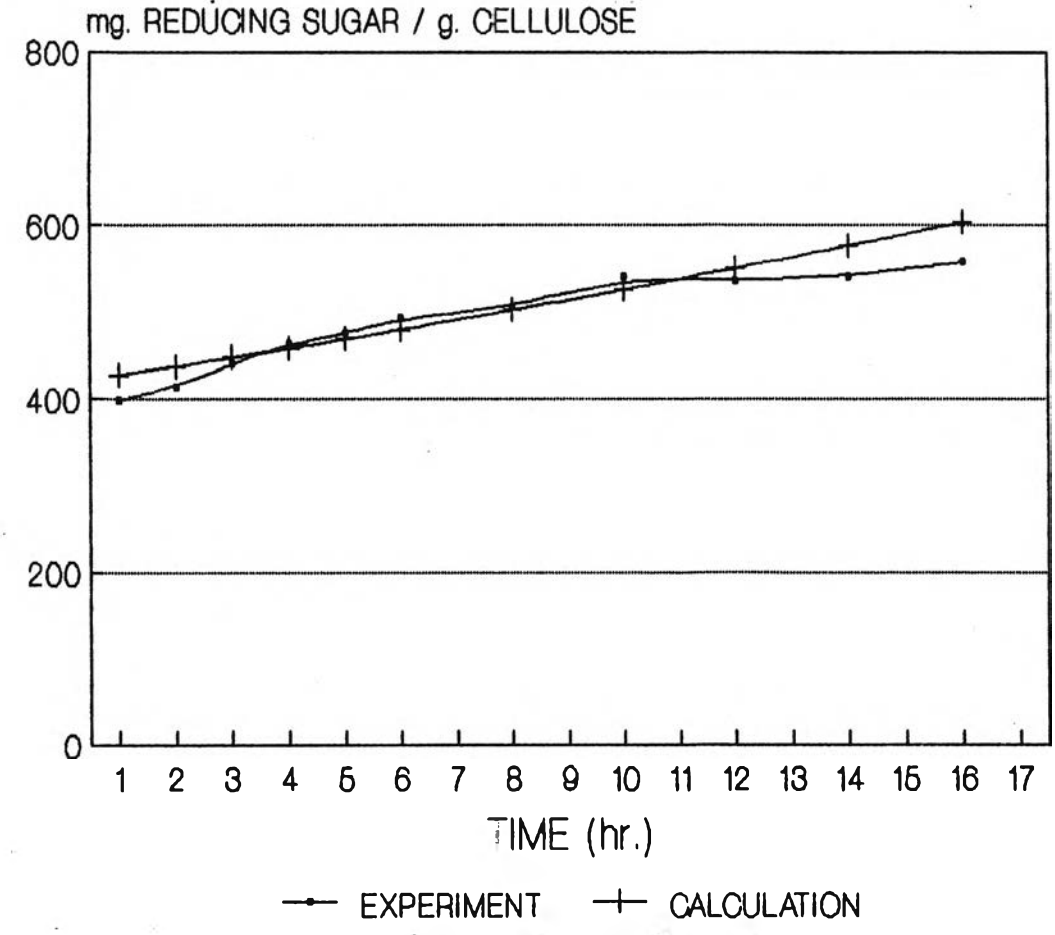
และ $\log [P_o] = 2.62$

แทนค่า (k/2.303) เท่ากับ 0.01 และค่า log $[P_o]$ เท่ากับ 2.62 ในสมการ (5-2) จะได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า log [P] กับ t คือ

$$\log [P] = 0.01\ t + 2.62$$

หรือ $$[P] = (416.87) \times 10^{0.01\ t} \qquad (5\text{-}3)$$

เมื่อนำค่า [P] ที่ได้จากผลการทดลอง ในช่วงชั่วโมงที่ 1 ถึง 16 ของการย่อย มาเขียนกราฟเปรียบเทียบกับค่า [P] ที่ได้จากการคำนวณจากสมการ (5-3) (ภาคผนวก ฐ) แสดงได้ดังรูปที่ 5.3 กราฟที่ได้มีความแตกต่างกันในบางช่วง เนื่องมาจากข้อผิดพลาดในการทดลอง และการคำนวณหาสมการ



รูปที่ 5.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 1 ถึง 16 ของการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการคำนวณตามสมการ (5-3)

การผลิตเอทานอล

เมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสในฟางข้าว ในสภาวะที่เหมาะสมมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ และทำการถ่ายเชื้อยีสต์ลงไปในปริมาณ 5 เปอร์เซนต์โดยปริมาตรของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ นำไปหมักที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ พบว่าในวันแรกของการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่4.12) ถึง 95 เปอร์เซนต์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น แต่ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น คิดเป็น 55 เปอร์เซนต์ ของปริมาณที่ควรผลิตได้ตามทฤษฎีเท่านั้น (ภาคผนวก ฒ) สามารถอธิบายได้ว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ส่วนหนึ่ง ถูกใช้ไปในระหว่างการปรับตัวของยีสต์ให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม แล้วจึงเริ่มผลิตเอทานอลในปริมาณเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่ในวันที่ 4 ของการหมัก (รูปที่ 4.13) โดยมีปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 1.3056 กรัม คิดเป็นค่าการเปลี่ยน เทียบกับปริมาณเอทานอลที่ควรผลิตได้ตามทฤษฎี เท่ากับ 95 เปอร์เซนต์ หลังจากวันที่ 4 ของการหมักไปแล้ว ปริมาณเอทานอลจะไม่เพิ่มขึ้นมากนัก และถ้าใช้เวลานานมากๆ จะเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้เวลาในการหมักเท่ากับ 4 วัน