



การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สชีวภาพ
จากกากมันสำปะหลัง

ISOLATION OF MICROBIAL CONSORTIUM AND OPTIMAL CONDITIONS
FOR BIOGAS PRODUCTION FROM CASSAVA PULP

รวีพร รุณจักร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สชีวภาพ
จากกากมันสำปะหลัง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ISOLATION OF MICROBIAL CONSORTIUM AND OPTIMAL CONDITIONS
FOR BIOGAS PRODUCTION FROM CASSAVA PULP



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF EDUCATION
(Biology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สชีวภาพ
จากกากมันสำปะหลัง
ของ
รวิพร รุณจักร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ) (รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ศรีอริยนันท์)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ประภากร ตันตโยทัย) (รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งศิริจุ)

ชื่อเรื่อง	การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สชีวภาพ จากกากมันสำปะหลัง
ผู้วิจัย	รวีพร รุณจักร
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ประภากร ตันตโยทัย

ปัญหาสำคัญของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง คือ การสูญเสียกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายและผลิตแก๊สชีวภาพจากการระบายน้ำออกจากระบบ อัตราการผลิตแก๊สชีวภาพจากระบบจึงต่ำลง ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลังและผลิตแก๊สชีวภาพได้ ตลอดจนหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือก โดยคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลังและน้ำเสียจากบ่อบำบัดมาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ได้กลุ่มจุลินทรีย์ 32 กลุ่ม จากนั้นคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์โดยประเมินจากความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 32 กลุ่ม สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลังให้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ และกลุ่มจุลินทรีย์ Br-8 และ Pc-8 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงที่สุดที่ 215.71 mL/g-VS และ 357.37 mL/g-VS ตามลำดับ จึงคัดเลือกมาทดลองหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ 25, 50 และ 75% v/v พบว่าเมื่อใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ในปริมาณ 25% v/v ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถผลิตแก๊สชีวภาพสะสม 28 วัน ได้สูงที่สุดที่ 448.82 mL/g-VS จากผลการวิจัยทำให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากระบบบำบัดของโรงงานซึ่งสามารถใช้ทดแทนจุลินทรีย์ที่เสียไป และภาวะการทำงานที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สชีวภาพ ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพจากระบบบำบัดของเสียในโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังได้

คำสำคัญ : การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์, ภาวะที่เหมาะสม, การผลิตแก๊สชีวภาพ, กากมันสำปะหลัง

Title	ISOLATION OF MICROBIAL CONSORTIUM AND OPTIMAL CONDITIONS FOR BIOGAS PRODUCTION FROM CASSAVA PULP
Author	RAVIPORN RUNAJAK
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Somkiat Phonphisutthimas , Ph.D.
Co Advisor	Prapakorn Tantayotai , Ph.D.

A significant issue in wastewater treatment of cassava industry is the loss of microbial consortium in biodegradation and biogas production processes via the effluent which decreases the biogas production performance. This research aimed to isolate and select microbial consortium which can degrade cassava pulp and produce biogas, and to investigate the optimal conditions for biogas production. The microbial consortia were isolated by re-cultivation of microbial consortia obtained from cassava pulp and digester wastewater at different temperatures and cultural media. Thirty-two consortia were obtained and evaluated on cassava pulp degradation and biogas production. All isolated consortia hydrolyzed cassava pulp and released reducing sugars. After 14 days of incubation, consortia Br-8 and Pc-8 showed the highest biogas yield at 215.71 and 357.37 mL/g-VS, respectively and then were selected to find optimal condition for biogas production at 30, 40 and 50°C and with 25, 50 and 75% v/v of microbial load. The highest biogas yield after 28 days at 448.82 mL/g-VS was obtained from Pc-8 at 25% microbial load and 50°C. In conclusion, the endemic microbial consortium was obtained and could be used to remunerate the washout loss. Moreover, the optimal conditions for biogas production could be applied to increase the efficiency of wastewater treatment.

Keyword : Microbial consortium isolation, Optimal conditions, Biogas production,
Cassava pulp



กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ประภากร ตันตโยทัย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ร่วม ที่คอยช่วยเหลือ ให้ความรู้ คำปรึกษา และข้อคิดที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้ง 2 ท่านเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ศรีอริยพันธ์ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมทั้งให้ความรู้ คำแนะนำสำหรับการเป็นนักวิจัยที่ดี นอกจากนี้ได้ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งษิรุจิ ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์ และกรุณาให้คำแนะนำสำหรับการปรับปรุงปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้อง และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปริญญาานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) สำหรับทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์ และคณิตศาสตร์ (สควค.) ตลอดระยะเวลาการศึกษา

รวีพร รุณจักร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ข
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพประกอบ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	4
สมมติฐานงานวิจัย.....	4
ระยะเวลาในการทำวิจัย	4
สถานที่ในการทำวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
กากมันสำปะหลัง	5
อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง	5
องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง.....	7
การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลัง	8
การจัดการของเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง	8
แก๊สชีวภาพ	9

องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ	9
กระบวนการเกิดแก๊สชีวภาพ	10
การผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง	13
กลุ่มจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ	14
ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ	16
ดัชนีบ่งชี้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ.....	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	19
วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ	19
วัสดุอุปกรณ์.....	19
เครื่องมือ	19
สารเคมี และวัตถุดิบ	20
สารเคมี	20
วัตถุดิบ.....	22
วิธีการทดลอง	22
การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	23
การเตรียมกลุ่มจุลินทรีย์.....	24
การศึกษาคุณสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพ	24
การหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์.....	27
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	28
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	29
องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	29
ปริมาณแป้ง.....	29
อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	29

ปริมาณของแข็ง	29
ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	30
การเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อเก็บเกี่ยวเอนไซม์	30
ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์อย่างหยาบจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง	33
การสร้างกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นโปรตีน.....	33
ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) จากกลุ่มจุลินทรีย์.....	35
การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารตั้งต้น ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	35
การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส.....	35
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ.....	37
การวิเคราะห์ SDS-PAGE และ CMC-zymogram analysis	40
การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแก๊สเบื้องต้น	41
ภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพ	42
ปริมาณแก๊สสะสมตลอดระยะเวลา 28 วัน	44
ความสัมพันธ์ของดัชนีบ่งชี้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ.....	45
ปริมาณชีวมวลที่หายไป (biomass weight loss)	50
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	51
สรุปผลการวิจัย.....	51
อภิปรายผลการวิจัย	51
ข้อเสนอแนะ	56
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก.....	65
ประวัติผู้เขียน.....	78

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง (ร้อยละน้ำหนักแห้ง).....	8
ตาราง 2 องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ.....	10
ตาราง 3 ข้อดี – ข้อเสียของกระบวนการปรับสภาพเบื้องต้น.....	13
ตาราง 4 การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ	15
ตาราง 5 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	30
ตาราง 6 กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากบ่อบำบัดน้ำเสียและกากมันสำปะหลัง	31
ตาราง 7 กลุ่มจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในภาวะแตกต่างกันเพื่อใช้ในการทดลอง.....	32
ตาราง 8 ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลาย Bovine Serum Albumin ที่ 595 nm	34
ตาราง 9 ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ 540 nm	36
ตาราง 10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ.....	38
ตาราง 11 ปริมาณแก๊สสะสมตลอดระยะเวลา 14 วัน จากการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในการหมักแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง	41
ตาราง 12 ภาวะการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพ	43

สารบัญภาพประกอบ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง.....	6
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของลิกโนเซลลูโลส	7
ภาพประกอบ 3 กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน.....	11
ภาพประกอบ 4 แผนผังขั้นตอนการวิจัย	22
ภาพประกอบ 5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 0.15 – 0.75 mg/mL และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm.....	34
ภาพประกอบ 6 ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์อย่างหยาบจากกลุ่มจุลินทรีย์	35
ภาพประกอบ 7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.20 – 1.00 mg/mL และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm.....	36
ภาพประกอบ 8 การวิเคราะห์ SDS-PAGE และ CMC-zymogram analysis ของเอนไซม์อย่างหยาบจากกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6	40
ภาพประกอบ 9 ปริมาณแก๊สสะสมของภาวะการทำงานต่าง ๆ ตลอดระยะเวลา 28 วัน.....	44
ภาพประกอบ 10 ความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณแก๊สรายวัน ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)	45
ภาพประกอบ 11 ความสัมพันธ์ของค่าซีไอดี และปริมาณแก๊สรายวัน ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)	46
ภาพประกอบ 12 ความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย และปริมาณแก๊สรายวัน ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)	47
ภาพประกอบ 13 ความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-เบส และค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)	48
ภาพประกอบ 14 ความสัมพันธ์ของปริมาณแก๊สสะสม และปริมาณแก๊สรายวัน ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)	49

ภาพประกอบ 15 ร้อยละของปริมาณชีวมวลที่หายไปของภาวะการทำงานต่าง ๆ..... 50



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมมันสำปะหลัง เป็นอุตสาหกรรมแปรรูปพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมเกิดน้ำเสียปริมาณมากในขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งเป็นน้ำเสียที่มีค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี (chemical oxygen demand, COD) สูง กรมโรงงานอุตสาหกรรมรายงานว่าน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่เกิดขึ้นจะมีปริมาณ 5 – 10 เท่าของปริมาณวัตถุดิบ หรือ 30 – 50 เท่าของผลผลิตที่ผลิตได้ นอกจากน้ำเสียแล้ว กากมันสำปะหลัง เปลือกมันสำปะหลัง ยังพบเป็นจำนวนมาก โดยกากมันสำปะหลัง มีลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นส่วนประกอบสำคัญ เส้นใยที่พบเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) จากองค์ประกอบดังกล่าวส่งผลให้การย่อยสลายตามธรรมชาติเป็นไปได้ช้า (Andlar et al., 2018) ซึ่งกากของเสียเหล่านี้โดยทั่วไป จะทำการตากแห้งเพื่อนำไปขายให้กับผู้ผลิตอาหารสัตว์ ผลิตปุ๋ยชีวภาพ หรือเพาะเลี้ยงเห็ด แต่มีข้อจำกัดในบางฤดูกาลซึ่งไม่สามารถตากแห้งกากมันสำปะหลังได้ (Mathong, 2011) ดังนั้นโรงงานจึงต้องหาวิธีกำจัด หรือนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ และเพิ่มมูลค่าให้มากขึ้น โดยการติดตั้งระบบจัดการวัสดุเหลือทิ้ง และระบบบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยออกสู่ธรรมชาติ ซึ่งระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic biological wastewater treatment) ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากเป็นวิธีการกำจัดวัสดุเหลือทิ้งที่ใช้พลังงานต่ำ และมีค่าใช้จ่ายในการติดตั้งระบบน้อย นอกจากนี้พบว่าแก๊สชีวภาพซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียสามารถนำไปใช้ประโยชน์ เช่น เป็นเชื้อเพลิงในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้า ใช้ทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิล

ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ อาศัยการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิดในกระบวนการย่อยสลายสารและการผลิตแก๊สชีวภาพ เนื่องจากแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพมีภาวะที่แตกต่างกัน และจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีภาวะการทำงานที่จำเพาะ เช่น จุลินทรีย์ในกระบวนการสร้างมีเทน สามารถทำงานได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6.7 – 7.4 (Balat & Balat, 2009; Rabii, Aldin, Dahman, & Elbeshbishy, 2019) จุลินทรีย์ประเภท mesophilic ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในขณะที่จุลินทรีย์ประเภท thermophilic ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 – 55 องศาเซลเซียส (Khalid, Arshad, Anjum, Mahmood, & Dawson,

2011) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ (Ali Shah, Mahmood, Maroof Shah, Pervez, & Ahmad Asad, 2014) ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของภาวะต่าง ๆ ในระบบ เช่น ระดับอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณวัตถุดิบ การสะสมของสารยับยั้งและสารพิษ ระบบบำบัดน้ำเสียจึงทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ (Drosg, 2013)

แนวทางในการรักษาและเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพมีหลายวิธี เช่น การแยกถังปฏิกรณ์ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการจัดสภาพแวดล้อมการทำงาน ของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม แต่วิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง (Rabii et al., 2019) สำหรับแนวทางอื่นที่ถูกลำเอียงมาใช้ คือ การซื้อหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการจากบริษัทผู้ขาย (Okudoh, Trois, Workneh, & Schmidt, 2014) ซึ่งวิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายสูงเช่นเดียวกัน

แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการรักษาและเพิ่มประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสีย และมีค่าใช้จ่ายที่ถูกลงกว่าวิธีการที่ได้กล่าวไป คือ การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เป็นวัสดุที่ต้องการกำจัด สำหรับโรงงานแป้งมันสำปะหลัง ได้แก่ แป้งและลิกโนเซลลูโลส ซึ่งสามารถถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และกลุ่มจุลินทรีย์ที่ควรมีคุณสมบัติในการปรับตัว และเจริญได้ในสภาพแวดล้อมของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน นอกจากนี้การควบคุมอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณวัตถุดิบ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ตลอดจนปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ให้เหมาะสม สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ และกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ ของระบบบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้งานวิจัยของ Kovacs et al. (2013) รายงานว่าการเลือกใช้กลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีในพื้นที่นั้น (indigenous) เป็นการลดต้นทุน และค่าใช้จ่ายในการซื้อหัวเชื้อใหม่ และช่วยให้การผลิตแก๊สชีวภาพมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเป็นภาวะการทำงานที่กลุ่มจุลินทรีย์เจริญอยู่ นอกจากนี้ยังมีความยั่งยืนในการทำงานของระบบผลิตแก๊สชีวภาพ

จากการศึกษาเอกสาร ผู้วิจัยจึงสนใจทำการคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลัง และน้ำเสียจากบ่อบำบัด โดยคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง และการผลิตแก๊สชีวภาพ ตลอดจนหาภาวะการทำงานของของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ เพื่อเป็นแนวทางการจัดการระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกจากกากมันสำปะหลังและน้ำเสียจากบ่อบำบัด ที่สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลัง และสามารถผลิตแก๊สชีวภาพ
2. เพื่อค้นหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

ความสำคัญของการวิจัย

โรงงานอุตสาหกรรมการเกษตร เป็นแหล่งผลิตสินค้าและบริการ ซึ่งในกระบวนการผลิตย่อมเกิดของเสีย วัสดุเหลือทิ้ง และน้ำเสียปริมาณมาก โรงงานแต่ละแห่งถูกควบคุมด้วยมาตรฐานจากกรมโรงงานอุตสาหกรรมในหลายด้าน มาตรฐานหนึ่งที่มีความสำคัญคือ มาตรฐานควบคุมการระบายน้ำเสียจากโรงงาน ดังนั้นโรงงานแต่ละแห่งจึงมีความจำเป็นในการจัดตั้งระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อให้ได้น้ำที่มีคุณสมบัติเหมาะสมก่อนปล่อยออกสู่แหล่งธรรมชาติ โดยรูปแบบการบำบัดน้ำเสียที่ได้รับความนิยมรูปแบบหนึ่ง คือ ระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ เนื่องจากต้องการพลังงานในการเดินระบบต่ำ เกิดตะกอนเหลือทิ้งที่ต้องกำจัดในปริมาณน้อย และได้แก๊สชีวภาพเป็นแหล่งพลังงานในโรงงาน แต่การบำบัดน้ำเสียรูปแบบนี้ไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณน้ำทิ้งเนื่องการทำงานขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิต คือ กลุ่มจุลินทรีย์ภายในระบบ นอกจากนี้ปัญหาอื่นที่พบคือ การลดลงอย่างรวดเร็วของจุลินทรีย์ในระบบ จากรายงานของกรมโรงงานอุตสาหกรรมพบว่าปัญหาเชื้อจุลินทรีย์ในระบบลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดจากอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ช้ากว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่หลุดออกจากระบบไปกับน้ำเสียขาออก (Fannin & Biljetina, 1987; Kappell, Carey, Zitomer, & McNamara, 2020) ซึ่งการซื้อหัวเชื้อมาเติมมีค่าใช้จ่ายที่สูง และไม่ยั่งยืนด้วยเหตุนี้การค้นหากลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพ และสามารถเจริญได้ดีในบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงาน จะสามารถช่วยแก้ปัญหานี้ได้ ตลอดจนการทราบภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพและการผลิตแก๊สชีวภาพ และมีประโยชน์ต่อการพัฒนาในการต่อยอดงานวิจัย เพื่อให้สามารถพัฒนาจากระดับปฏิบัติการในห้องทดลองไปสู่การผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้กากมันสำปะหลัง มาวิเคราะห์ ปริมาณแป้ง และปริมาณเส้นใย สำหรับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคัดแยกจากกากมัน สำปะหลัง และน้ำเสียจากบ่อบำบัดของโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังแห่งหนึ่งในจังหวัดสุโขทัย ทำการศึกษาคุณสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์ จากประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยสารตั้งต้น 3 ชนิด ได้แก่ carboxymethyl cellulose (CMC) ฟางข้าว และกากมันสำปะหลัง และปริมาณแก๊ส ชีวภาพที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก เพื่อคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแก๊ส ชีวภาพ และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือก โดยการทดสอบปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ และปริมาณ เชื้อจุลินทรีย์ ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ และชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ โดยประเมินประสิทธิภาพของกลุ่ม จุลินทรีย์ด้วยค่าความเป็นกรด-เบส, ค่าซีไอดี, ค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile fatty acid, VFA), ปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ และปริมาณการย่อยสลายชีวมวล (biomass)

สมมติฐานงานวิจัย

1. กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากกากมันสำปะหลังสามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลัง เพื่อผลิตแก๊สชีวภาพได้
2. ภาวะการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่เหมาะสมจะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ การทำงานของระบบผลิตแก๊สชีวภาพได้

ระยะเวลาในการทำวิจัย

การทำวิจัยเริ่มดำเนินการตั้งแต่เดือนมกราคม 2562 – พฤษภาคม 2563

สถานที่ในการทำวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการ อาคารบัณฑิตวิทยาลัยวิศวกรรมศาสตร์นานาชาติสิรินธรไทย-เยอรมัน ชั้น 10 ห้อง 1010 ภาควิชาวิศวกรรมเคมีและกระบวนการ บัณฑิตวิทยาลัยวิศวกรรมศาสตร์ นานาชาติสิรินธร ไทย-เยอรมัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา อาคาร 19 ชั้น 11 ห้อง 1101 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของการผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลังด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ โดยผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. กากมันสำปะหลัง

- 1.1 อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง
- 1.2 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง
- 1.3 การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลัง
- 1.4 การจัดการของเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง

2. แก๊สชีวภาพ

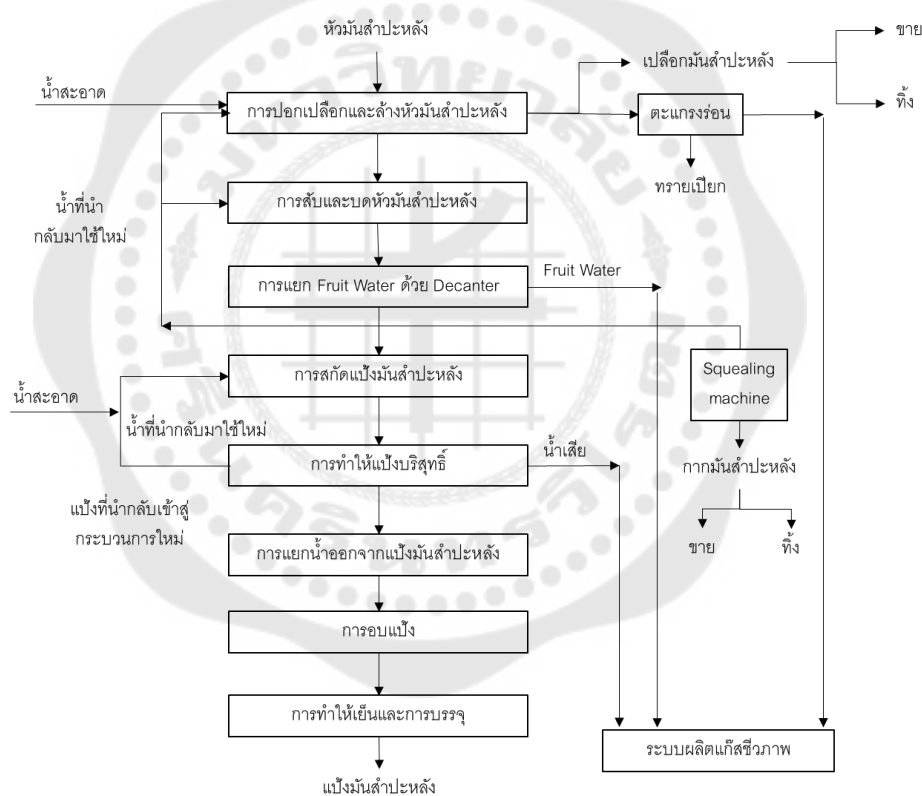
- 2.1 องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ
 - 2.2 กระบวนการเกิดแก๊สชีวภาพ
 - 2.3 การผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง
3. กลุ่มจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ
 4. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ
 5. ดัชนีในการบ่งชี้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ

กากมันสำปะหลัง

อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีรากสะสมอาหาร โดยองค์ประกอบหลักที่พบในหัวมันสำปะหลัง คือ แป้ง Rattanachomsri, Tanapongpipat, Eurwilaichitr, and Champreda (2009) รายงานว่ามันสำปะหลังเป็นพืชอาหารสำคัญ อยู่ในลำดับที่ 6 ของโลก ดังนั้นอุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลัง จึงเป็นอุตสาหกรรมเกษตรที่มีความสำคัญ สำหรับกระบวนการผลิตเริ่มต้นจากเกษตรกรขายหัวมันสำปะหลังสด ให้แก่โรงงานอุตสาหกรรม จากนั้นโรงงานจะนำหัวมันสำปะหลังไปแปรรูปใน 3 อุตสาหกรรมหลัก ได้แก่ 1) อุตสาหกรรมมันเส้น 2) อุตสาหกรรมมันอัดเม็ด และ 3) อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

ในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ต้องใช้น้ำเป็นตัวสกัดแป้งจากหัวมันสำปะหลังและแยกส่วนของโปรตีนตลอดจนถึงเจือปนออกจากแป้งมันสำปะหลัง ก่อให้เกิดน้ำเสียเป็นปริมาณมาก Mathong (2011) รายงานว่าในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง 1 ตัน ก่อให้เกิดน้ำเสียที่มีค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (Biological Oxygen Demand, BOD) และค่าความต้องการออกซิเจนทางเคมี (Chemical Oxygen Demand, COD) สูงถึง 20 – 35 ลูกบาศก์เมตร นอกจากนี้ น้ำเสียที่เกิดขึ้น ในกระบวนการผลิตยังก่อให้เกิดของเสียปริมาณมาก ไม่ว่าจะเป็นเปลือก หรือกากมันสำปะหลัง ดังภาพประกอบ 1 ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่นและของเสียตกค้างภายในโรงงาน ปัญหานี้จึงจำเป็นต้องได้รับการแก้ไข

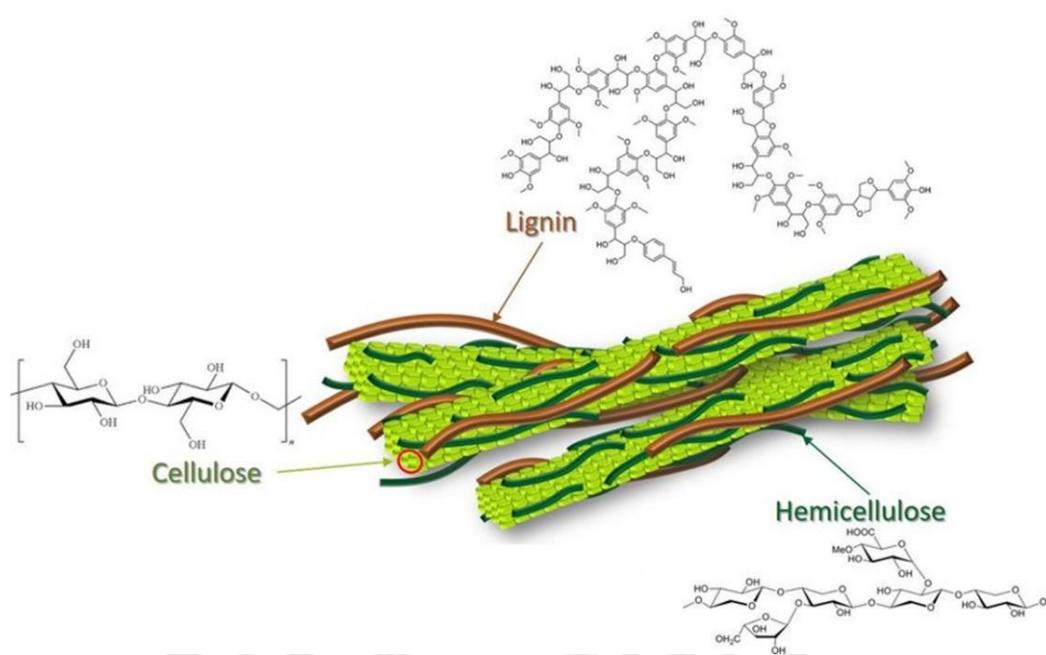


ภาพประกอบ 1 กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง

ดัดแปลงจาก : Mathong, Y. (2011). *Utilization of cassava peel and pulp for biogas production*. (Doctoral dissertation, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand). Retrieved from <https://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/55736>

องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบหลักที่พบในกากมันสำปะหลัง คือ แป้ง (Djuma'ali, Soewarno, Sumarno, Primarini, & Sumaryono, 2012) พบความชื้นสูง และมีส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (ตาราง 1) โดยเส้นใยทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นองค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งพบได้ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : Jensen, C. U., Rodriguez Guerrero, J. K., Karatzos, S., Olofsson, G., & Iversen, S. B. (2017). Fundamentals of Hydrofaction™: Renewable crude oil from woody biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7(4), 495-509.

ตาราง 1 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง (ร้อยละน้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบ	งานวิจัยที่ปรากฏ		
	Kosugi et al. (2009)	Rattanachomsri et al. (2009)	Djuma'ali et al. (2012)
แป้ง (starch)	60.6	60.1 ± 0.09	65.5 ± 1.6
เส้นใย (fiber)	28.1	23.0	20.1
เซลลูโลส (cellulose)	–	15.6	8.1 ± 1.1
เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)	–	4.6	2.8 ± 0.1
ลิกนิน (lignin)	2.2	2.8 ± 0.06	2.2 ± 0.2

การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังสามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น อาหารสัตว์ ปุ๋ยชีวภาพ เพาะเห็ด (Mathong, 2011) ซึ่งเป็นวิธีการช่วยลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้งที่เกิดจากอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง แต่แนวทางที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน คือ การนำมาเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทน ไม่ว่าจะเป็นไบโอเอทานอล (bioethanol) ไบโอดีเซล (biodiesel) และไบโอแก๊ส หรือแก๊สชีวภาพ (biogas) (Okudoh et al., 2014)

การจัดการของเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง

น้ำเสีย กากมันสำปะหลัง และเปลือกมันสำปะหลัง เป็นของเสียที่ได้จากขั้นตอนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง สำหรับน้ำเสียพบในปริมาณมาก เนื่องจากน้ำถูกใช้ในทุกระยะ เช่น การทำความสะอาดหัวมันสำปะหลัง การทำแป้งให้บริสุทธิ์ ซึ่งน้ำเสียที่เกิดขึ้นต้องบำบัดก่อนปล่อยออกจากโรงงาน

วิธีการบำบัดน้ำเสียแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่ วิธีการบำบัดทางกายภาพ (physical treatment) วิธีการบำบัดทางเคมี (chemical treatment) และวิธีการบำบัดทางชีวภาพ (biological treatment) ซึ่งวิธีการบำบัดทางชีวภาพอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ สามารถบำบัดน้ำเสียได้ในปริมาณมาก และได้แก๊สชีวภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานในโรงงานได้อีกด้วย Mathong (2011) กล่าวว่าน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 1 ลูกบาศก์เมตร สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ 7 ลูกบาศก์เมตร

นอกจากนี้พบข้อมูลว่าน้ำเสียที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิต จะมีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้วิธีการบำบัดทางชีวภาพ เกิดประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จึงมีการแยกบ่อบำบัดและใช้จุลินทรีย์ที่สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิของบ่อบำบัดนั้น โดยบ่อบำบัดที่มีน้ำเสียอุณหภูมิ 30 – 38 องศาเซลเซียส จะใช้จุลินทรีย์ประเภท mesophilic ในขณะที่บ่อบำบัดที่มีน้ำเสียอุณหภูมิ 50 – 55 องศาเซลเซียส จะใช้จุลินทรีย์ประเภท thermophilic

โดยทั่วไประบบจัดการวัสดุเหลือทิ้ง และระบบบำบัดน้ำเสียที่ได้รับความนิยมในโรงงานอุตสาหกรรม คือระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพแบบไร้ออกซิเจน เนื่องจากอาศัยพลังงานต่ำในการวัสดุเหลือทิ้งและเสียค่าใช้จ่ายในการเดินระบบน้อย อีกทั้งได้แก๊สชีวภาพเป็นผลผลิตซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้ในโรงงานอุตสาหกรรม (Suntronsopa, 2008) สำหรับระบบบำบัดน้ำเสียที่นิยมใช้ คือ ระบบยูเอเอสบี (Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket, UASB) ซึ่งภายในถังหมักเป็นการทำงานของจุลินทรีย์หลายชนิด และมีปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกี่ยวข้องอยู่หลายขั้นตอน โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องทำงานสัมพันธ์กัน เพื่อให้ระบบสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่กระบวนการเหล่านี้มักประสบปัญหาประสิทธิภาพลดลงจากการสูญเสียจุลินทรีย์ไปกับการระบายน้ำออก เนื่องจากการสูญเสียไปกับการทิ้งน้ำเสียมากเกินไป และการใส่จุลินทรีย์กลุ่มใหม่เข้าไปทำงานในระบบอาศัยระยะเวลาในนานในการเริ่มต้นทำงาน ดังนั้นแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว คือ การค้นหากลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำงานได้ดีในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน และจัดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์

แก๊สชีวภาพ

องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ

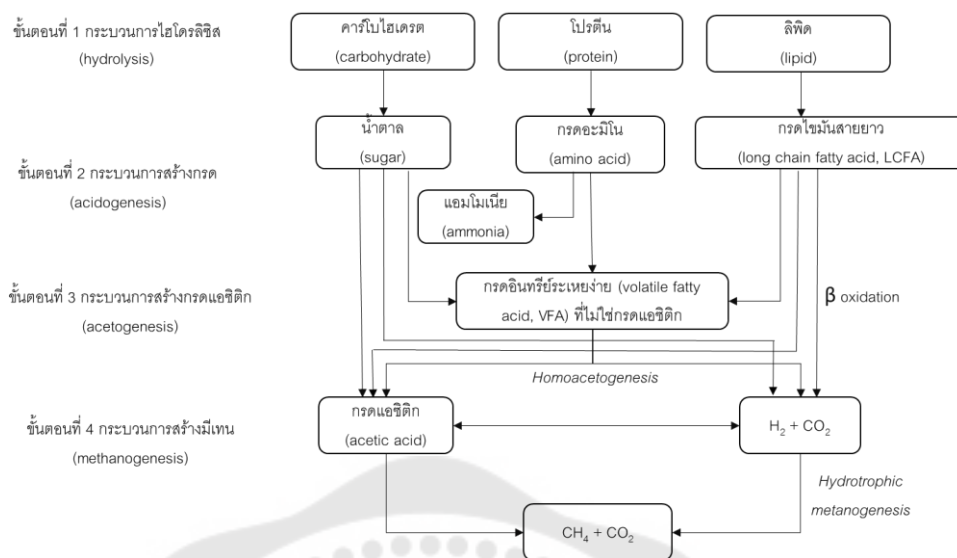
แก๊สชีวภาพ (biogas) เป็นแก๊สที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ของจุลินทรีย์ โดยองค์ประกอบหลักของแก๊สชีวภาพ คือ แก๊สมีเทน รองลงมา คือ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สอื่น ๆ เช่น ไฮโดรเจน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไนโตรเจน แอมโมเนีย ดังตาราง 2 (Anukam, Mohammadi, Naqvi, & Granström, 2019; Balat & Balat, 2009; Rabii et al., 2019) โดยแก๊สมีเทนเป็นแก๊สที่จุดติดไฟได้จึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ดี และเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้แก๊สชีวภาพสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิล

ตาราง 2 องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ

องค์ประกอบ	งานวิจัยที่ปรากฏ		
	Balat and Balat (2009)	Anukam et al. (2019)	Rabii et al. (2019)
มีเทน (CH ₄)	55 – 65	50 – 57	50 – 75
คาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂)	35 – 45	25 – 50	19 – 34
ไนโตรเจน (N ₂)	0 – 3	0 – 10	0 – 1
ไฮโดรเจน (H ₂)	0 – 1	0 – 1	0 – 1
ออกซิเจน (O ₂)	0 – 2	0 – 2	0 – 1
แอมโมเนีย (NH ₃)	0 – 1	–	0 – 1
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H ₂ S)	0 – 1	0 – 3	0 – 1

กระบวนการเกิดแก๊สชีวภาพ

กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ อาศัยการทำงานของจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ปฏิกริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นต้องอาศัยเอนไซม์เพื่อเพิ่มอัตราเร็วในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ กระบวนการไฮโดรลิซิส (hydrolysis), กระบวนการสร้างกรดหรือแอซิโดเจเนซิส (acidogenesis), กระบวนการสร้างกรดแอซิติก (acetogenesis) และ กระบวนการสร้างแก๊สมีเทน (methanogenesis) ดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน

ดัดแปลงจาก: Rabii, A., Aldin, S., Dahman, Y., & Elbeshbishy, E. (2019). A review on anaerobic co-digestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration. *Energies*, 12, 1106.

ขั้นตอนที่ 1 กระบวนการไฮโดรลิซิส (hydrolysis) เกิดจากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารโมเลกุลขนาดใหญ่ ให้มีขนาดเล็กลง เช่น กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ผลิตเอนไซม์มาย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

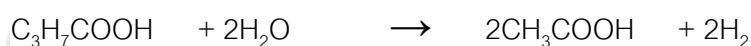
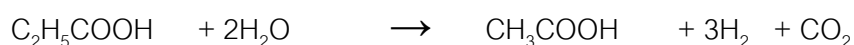
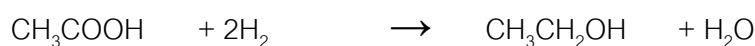
Okudoh et al. (2014) รายงานว่าในขั้นตอนนี้ จุลินทรีย์ย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ โดยผลิตเอนไซม์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์เพื่อย่อยสารอินทรีย์เหล่านั้น เพราะสารโมเลกุลใหญ่ที่มีโครงสร้างซับซ้อน จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่จำเพาะในการย่อยสลาย (Agbor, Cicek, Sparling, Berlin, & Levin, 2011) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนถัดไปของกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ ดังนั้นขั้นตอนนี้จึงเป็นขั้นกำหนดความเร็วของกระบวนการทั้งหมด (rate limiting step) (Okudoh et al., 2014; Rabii et al., 2019)

ขั้นตอนที่ 2 กระบวนการสร้างกรดหรือแอซิโดเจเนซิส (acidogenesis) อาศัยการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มแอซิโดเจนิคแบคทีเรีย (acidogenic bacteria) เช่น *Peptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp. (Krakat, Schmidt, & Scherer, 2010) ในการย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนไฮโดรลิซิสเป็นกรดไขมันระเหยง่าย

(volatile fatty acid, VFA) เช่น กรดแอสिटิก กรดแลกติก กรดโพรพิโอนิก แก๊สไฮโดรเจน แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Mathong, 2011) นอกจากนี้ได้แอลกอฮอล์และคีโตน เช่น เมทานอล เอทานอล กลีเซอรอล

ขั้นตอนที่ 3 กระบวนการสร้างกรดแอสिटิก (acetogenesis) เป็นปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไขมันระเหยง่าย แอลกอฮอล์ และแก๊สจากกระบวนการแอสिटोजีเนซิส เป็นกรดแอสिटิก แก๊สไฮโดรเจน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่พบในขั้นตอนนี้ ได้แก่ *Syntrophobacter* spp., *Desulfovibrio* spp., *Syntrophomonas* spp. (Schink, 1997)

ตัวอย่างปฏิกิริยาที่พบในกระบวนการสร้างกรดแอสिटิก



จากสมการข้างต้นแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้ทำให้มีการสะสมของกรด และแก๊สไฮโดรเจน ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-เบสลดลง ซึ่งอาจยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างแก๊สมีเทนในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากจุลินทรีย์ทำงานได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6.7 – 7.4 (Balat & Balat, 2009; Rabii et al., 2019)

ขั้นตอนที่ 4 กระบวนการสร้างแก๊สมีเทน (methanogenesis) เป็นปฏิกิริยาการสร้างแก๊สมีเทนโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มเมทาโนจิติก หรือเมทาโนเจน (methanogens) สามารถแบ่งจุลินทรีย์ออกเป็น 2 กลุ่ม ตามประเภทของสารตั้งต้นที่ใช้ในการสร้างแก๊สมีเทน (Ahring, 2003) ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ใช้กรดแอสिटิกเป็นสารตั้งต้นในการสร้างแก๊สมีเทน (acetotrophic methanogens) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น *Methanosarcina* spp., *Methanosaeta* spp. (Coulon & Villa, 2011)



และจุลินทรีย์กลุ่ม hydrogenotrophic methanogens ที่ใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้น จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น *Methanobacterium* spp., *Methanobrevibacter* spp. (Coulon & Villa, 2011)



การผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตแก๊สชีวภาพ งานวิจัยของ Zhang et al. (2011) ใช้การหมักกากมันสำปะหลังแบบเติมครั้งเดียว (batch) เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าเกิดแก๊สมีเทนในปริมาณ 158 L/kg-VS แต่เมื่อปรับสภาพกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและสารเคมี เกิดแก๊สมีเทนในปริมาณ 248 L/kg VS เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบในกากมันสำปะหลังย่อยสลายเองได้ยาก กระบวนการปรับสภาพเบื้องต้น (pretreatment) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยแบ่งเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ 1) วิธีทางกายภาพ (physical method) เช่น การบด การให้ความร้อน 2) วิธีทางเคมี (chemical method) เช่น การใช้เบส การใช้กรด และ 3) วิธีทางชีวภาพ (biological method) เช่น การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ (Rodriguez, Alaswad, Benyounis, & Olabi, 2017) ซึ่งแต่ละรูปแบบมีข้อดี ข้อเสียต่อการผลิตแก๊สชีวภาพที่แตกต่างกัน ดังตาราง 3

ตาราง 3 ข้อดี – ข้อเสียของกระบวนการปรับสภาพเบื้องต้น

วิธีการปรับสภาพ	ข้อดี	ข้อเสีย	ปริมาณแก๊สชีวภาพ
กายภาพ (Physical)	1) การทำงานสะดวก รวดเร็ว 2) ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส	1) ใช้พลังงานสูง 2) ค่าใช้จ่ายสูง	25 – 60 %
เคมี (Chemical)	1) ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของลิกโนเซลลูโลส	1) สารเคมีบางชนิด ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสเปลี่ยน 2) สารเคมีบางชนิดเป็นสารยับยั้งกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ	37 %
ชีวภาพ (Biological)	1) ค่าใช้จ่ายน้อย 2) ไม่มีสารยับยั้งกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ	1) เกิดปัญหากลิ่นรบกวน 2) เอนไซม์ราคาสูง 3) ใช้เวลานาน	30 – 50 %

ดัดแปลงจาก: Rodriguez, C., Alaswad, A., Benyounis, K., & Olabi, A. G. (2017). Pretreatment techniques used in biogas production from grass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 1193–1204.

จากข้อมูลในตาราง 3 แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยวิธีทางชีวภาพ ช่วยเพิ่มปริมาณแก๊สชีวภาพได้มากถึง 30 – 50% แต่มีปัญหาเรื่องเอนไซม์ราคาสูง จึงแก้ปัญหาด้วยการใช้จุลินทรีย์แทนการใช้เอนไซม์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและสามารถผลิตเอนไซม์ (Parawira & Tekere, 2011)

นอกจากการปรับสภาพเบื้องต้น กระบวนการหมักร่วม (co-digestion) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพได้ Ofoefule and Uzodinma (2009) ศึกษาการผลิตแก๊สชีวภาพจากเปลือกมันสำปะหลังร่วมกับมูลสัตว์ ได้แก่ มูลวัว มูลไก่ และมูลสุกร ในอัตราส่วน 1:1 เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าการหมักร่วมให้ปริมาณแก๊สชีวภาพมากกว่าการใช้เปลือกมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Adelekan and Bamgboye (2009) ที่หมักแก๊สชีวภาพเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยใช้เปลือกมันสำปะหลังสดหมักร่วมกับมูลไก่ มูลสุกร และมูลวัว ในอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าการหมักร่วมกับมูลสัตว์ ให้ปริมาณแก๊สชีวภาพสูงกว่าการใช้เปลือกมันสำปะหลังสดเพียงอย่างเดียว และอัตราส่วนการผสมที่ดีที่สุดคือ อัตราส่วน 1:1 ดังนั้นกระบวนการหมักร่วมกับมูลสัตว์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ เนื่องจากไนโตรเจนในมูลสัตว์ช่วยปรับปริมาณไนโตรเจนของวัตถุดิบในการหมักแก๊สให้เหมาะสมต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ (Rabii et al., 2019)

นอกจากนี้การคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งอาศัยที่มีสภาพแวดล้อมคล้ายภาวะการทำงานในระบบที่ถูกใส่ลงไป จุลินทรีย์จะทำงานได้ดี จากงานวิจัยของ Promphiphak (2012) ค้นหาหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์จากฟาร์มสุกร ฟาร์มวัว และโรงงานแป้งมันสำปะหลัง พบว่าการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง ให้ปริมาณแก๊สชีวภาพได้มากที่สุด สอดคล้องกับ Kovacs et al. (2013) ที่รายงานว่าการใช้กลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีในพื้นที่นั้น (indigenous) มีความยั่งยืนในการทำงาน และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพ

กลุ่มจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

กลุ่มจุลินทรีย์ หมายถึง การที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ร่วมกัน และมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ (Lee, Show, & Wang, 2013) กลุ่มจุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการสลายตัว (biodegradation) และกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) ของสารอินทรีย์ และสารสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม ในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ จุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์ออกมาออกเซลล์เพื่อย่อยและนำอินทรีย์วัตถุมาใช้

ในการเจริญ และขยายพันธุ์ เมื่อภาวะการทำงานเหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณสารอาหาร จุลินทรีย์จะเพิ่มจำนวนและทำงานได้เต็มประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในอุตสาหกรรม เช่น ระบบบำบัดน้ำเสีย กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ (Parawira, 2011) กลุ่มจุลินทรีย์ทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายของเสีย ภายในถังหมักแก๊สชีวภาพ กลุ่มจุลินทรีย์อาศัยอยู่รวมกันและต้องพึ่งพากัน หากภาวะสมดุลของการอยู่รวมกันถูกทำลาย ประสิทธิภาพในการทำงานของระบบจะลดลง (Sirianuntapiboon, 2014) จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าการใช้กลุ่มจุลินทรีย์สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพได้ ดังตาราง 4

ตาราง 4 การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	วัตถุดิบ	สภาวะการทำงาน	ปริมาณแก๊สชีวภาพ
Zhang et al. (2011)	กากมัน สำปะหลัง	ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ในถังหมักเทอร์โมฟิลิก แบบไร้อากาศ (thermophilic anaerobic reactor)	ปริมาณแก๊สมีเทนเพิ่มขึ้น 96.63% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
Yan et al. (2012)	ฟางข้าว	ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ประเภท mesophilic ทำงานที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	ปริมาณแก๊สชีวภาพเพิ่มขึ้นถึง 9.3%
Tuesorn et al. (2013)	มูลสุกร	ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งสร้างจากจุลินทรีย์ในขานอ้อย	ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพเพิ่มขึ้น 40%
Poszytek, Ciezkowska, Sklodowska, and Drewniak (2016)	ข้าวโพด หมัก	ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม mesophilic ย่อยสลายข้าวโพดหมักในภาวะอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส	เพิ่มผลผลิตแก๊สชีวภาพได้ถึง 38%

Yan et al. (2012) ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ประเภท mesophilic ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 – 45 องศาเซลเซียส เช่น *Bacteroidetes* sp., *Deferribacteres* sp., *Fibrobacteraceae* sp., *Firmicutes* sp., *Lentisphaerae* sp., *Proteobacteria* sp. ในการย่อยสลายฟางข้าว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถย่อยลิกโนเซลลูโลส และเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยให้ปริมาณแก๊สชีวภาพเพิ่มขึ้นถึง 9.3% เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเป็นอุณหภูมิที่จุลินทรีย์ประเภท mesophilic ทำงานได้ดี เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Tuesorn et al. (2013) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพจากมูลสุกร โดยอาศัยการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากขาน้อย โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และช่วยให้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพเพิ่มขึ้น 40% Poszytek et al. (2016) ใช้แบคทีเรียในกลุ่ม mesophilic ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 สกุล ได้แก่ *Bacillus*, *Providencia*, *Ochrobactrum* ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส มาทดสอบการย่อยสลายข้าวโพดหมักในภาวะอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวสามารถช่วยเพิ่มปริมาณแก๊สชีวภาพได้ถึง 38% และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของกลุ่มจุลินทรีย์และเชื้อเดี่ยว โดยอาศัยค่าความเป็นกรด-เบส ค่าซีไอดี ค่าความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย และค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เป็นดัชนีบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงาน พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงกว่า

จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่ามีการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ (microbial consortium) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และจัดภาวะการทำงานให้เหมาะสมต่อกลุ่มจุลินทรีย์ สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพได้ นอกจากนี้การอยู่รวมกันเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง (Brenner, You, & Arnold, 2008; Zuroff, Xiques, & Curtis, 2013)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ

อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพจะเป็นอุณหภูมิในช่วง 35 – 55 องศาเซลเซียส เรียกว่า mesophilic temperature เนื่องจากเป็นช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์สามารถทำงานได้ และมีความต้องการพลังงานต่ำในการรักษาระดับอุณหภูมิให้คงที่ (Ward, Hobbs, Holliman, & Jones, 2008) Pawongrat (2015) ศึกษาอุณหภูมิในช่วง mesophilic ภายในถังหมักแก๊ส พบว่าจุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic เกิดอัตราการย่อยสลายสารอินทรีย์สูงสุดที่ 35 องศาเซลเซียส โดยความสามารถในการทำงาน

ของจุลินทรีย์จะลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อลดอุณหภูมิลงไป 10 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับ Chae, Jang, Yim, and Kim (2008) ที่รายงานว่าอุณหภูมิในการทำงานที่ดีที่สุดของจุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic คือ 35 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้อัตราการย่อยสลายชีวมวลรวดเร็วขึ้น และใช้ระยะเวลาในการผลิตแก๊สชีวภาพน้อยลง เห็นได้จากปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นจากถังหมักอุณหภูมิ thermophilic มีมากกว่าปริมาณแก๊สจากถังหมักอุณหภูมิ mesophilic (Ward et al., 2008; Zhu et al., 2009)

ปัจจัยต่อมา คือ ค่าความเป็นกรด-เบส Promphiphak (2012) ศึกษาภาวะสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพ ที่ โดยทดสอบ 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-เบส โดยกำหนดอุณหภูมิในช่วง 25 – 50 องศาเซลเซียส ทำการทดลองในถังหมัก 2 ชั้นตอน ที่ระดับความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7 พบว่าที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เกิดแก๊ส 7 mL/day ต่อมาทดสอบค่าความเป็นกรด-เบสในช่วง 5 – 10 ในถังหมักที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8 เกิดแก๊ส 28 mL/day ดังนั้นในการผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลังควรควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 8 นอกจากนี้ศึกษาปริมาณวัตถุดิบตั้งต้น (substrate loading) ที่เตรียมจากน้ำเสียโรงงานแป้งมัน และกากมันสำปะหลังในอัตราส่วนแตกต่างกัน พบว่าการใช้อัตราส่วนของน้ำเสีย และกากมันสำปะหลัง เท่ากับ 4:6 เกิดแก๊สชีวภาพมากที่สุด และอัตราส่วน 2:8 มีปริมาณแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด เนื่องจากความเข้มข้นของสารอาหารมากเกินไป Anunputtikul and Rodtong (2007) ทดสอบปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการย่อยของจุลินทรีย์ โดยใช้หัวมันสำปะหลังในปริมาณแตกต่างกัน ได้แก่ 12.5, 25, 50, 100, 200 และ 400 กรัม ในถังหมักปริมาตรการทำงาน 5 ลิตร พบว่าการใช้ปริมาณวัตถุดิบ 50 กรัม หรือปริมาณร้อยละ 1.00 โดยมวลต่อปริมาตร เกิดแก๊สชีวภาพปริมาณมากที่สุด

นอกจากนี้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ Ofoefule and Uzodinma (2009) ตรวจสอบปริมาณคาร์บอน และไนโตรเจนของวัตถุดิบที่ใช้หมักแก๊ส พบว่าการใช้เปลือกมันสำปะหลัง หรือมูลสัตว์เพียงอย่างเดียว มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ แต่เมื่อผสมเปลือกมันสำปะหลังกับมูลสุกร ให้มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้มาก

ดัชนีบ่งชี้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ

ประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ สามารถวิเคราะห์จากค่าดัชนีต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตขึ้นต่อวัน ปริมาณแก๊สชีวภาพสะสม ค่าความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFA) ค่าซีโอดี (COD)

ปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตขึ้น สามารถบ่งบอกถึงความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในการปรับตัวและการทำงานภายในระบบบำบัดน้ำเสีย Li et al. (2017) ประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพและการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุลินทรีย์เมื่อใช้วัตถุดิบตั้งต้นที่แตกต่างกัน โดยได้ติดตามการเปลี่ยนของดัชนีต่าง ๆ เพื่อบ่งชี้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตขึ้นต่อวัน และปริมาณแก๊สชีวภาพทั้งหมด เป็นผลมาจากการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ หากการทำงานของจุลินทรีย์ที่ผลิตแก๊สสูญกยบยัง ปริมาณแก๊สชีวภาพจะมีค่าลดลง

ในขณะที่ค่าซีโอดี ที่ปรากฏใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสีย หากประสิทธิภาพในการกำจัดค่าซีโอดี มีค่าลดลง แสดงว่าระบบบำบัดน้ำเสียมีปัญหา และสภาพแวดล้อมของระบบไม่เอื้อต่อการเจริญ และการทำงานของจุลินทรีย์ อัตราการย่อยสลายอินทรีย์จึงต่ำลง (Mao et al., 2017)

สำหรับค่าความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย สามารถบ่งชี้ประสิทธิภาพของการผลิตแก๊สชีวภาพได้ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ (Tampio, Blasco, Vainio, Kahala, & Rasi, 2019) สารตั้งต้นในการผลิตแก๊สชีวภาพ เช่น คาร์โบไฮเดรตในกากมันสำปะหลัง เมื่อถูกย่อยจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และกรดอินทรีย์ต่อไป เช่น กรดบิวทิริก กรดอะซิติก กรดแลคติก (Cavinato et al., 2017) โดยปริมาณของกรดเหล่านี้ ส่งผลต่อค่าความเป็นกรด-เบสการสะสมของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ปริมาณมาก จะส่งผลให้ค่าความเป็นเบสของระบบลดลง กลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตแก๊สมีเทนทำงานไม่ได้ ดังนั้นจึงเลือกดัชนีเหล่านี้เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ

จากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง จะเห็นได้ว่าการจัดปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพให้เหมาะสมมีความสำคัญ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณสารตั้งต้น ตลอดจนหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ ดังนั้นเพื่อให้การผลิตแก๊สชีวภาพมีประสิทธิภาพการทำงานสูงสุด ผู้วิจัยจึงคัดเลือก และคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง และการผลิตแก๊สชีวภาพ ตลอดจนค้นหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลังด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ ในบทนี้กล่าวถึงวัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี วัสดุดิบ วิธีการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล

วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์	ยี่ห้อ
ขวดรูปชมพู่ (flask)	Duran
บีกเกอร์ (beaker)	Pyrex
ถ้วยครุชีเบิล (crucible)	Robu
ขวดเก็บสาร (laboratory bottle)	Duran
จานเพาะเชื้อ (petri dish)	Hycon
คิวเวทท์ (cuvette)	Sarstedt
ไมโครปิเปตต์ (micropipette)	Sartorius
หลอดเซนทรีฟิวจ์พลาสติก ขนาด 15 mL	Nest Biotechnology
หลอดเซนทรีฟิวจ์พลาสติก ขนาด 50 mL	Nest Biotechnology
หลอดไมโครเซนทรีฟิวจ์	Nest Biotechnology
ถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ขนาด 10K MWCO	Thermo Fisher scientific
หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง (spin column) ขนาด 10K MWCO	GE Healthcare
กระดาษกรอง (filter paper) เบอร์ 1	Whatman

เครื่องมือ

เครื่องมือ

เครื่องมือ	ยี่ห้อ	รุ่น
หม้อนึ่งความดัน (autoclave)	JS Research	JSAC-40
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	ACCULAB	ATL-224-I
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	OHAUS	SPS202F
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)	ESCO	SCV-4A1
เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)	SCIOLOGEX	MX-S

เครื่องมือ (ต่อ)

เครื่องมือ	ยี่ห้อ	รุ่น
ตู้อบความร้อน (hot air oven)	Wisd	WOF-50
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	DLAB	DWB20-P
เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer)	HYSC	HY-HS11
เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)	OHAUS	ST2100
เตาเผาความร้อนสูง (muffle furnace)	HYSC	MF-05
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV/VIS spectrophotometer)	PG Instruments	T80+
เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge)	HERMLE	Z206A
เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง (high speed centrifuge)	BIOLINE	Mini-15K
เครื่องเขย่าสารควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)		
ช่วง 10 – 70 องศาเซลเซียส	JS Research	SSI-100C
เครื่องเขย่าสารควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)		
ช่วง 4 – 45 องศาเซลเซียส	ALLSHENG	SI-45

สารเคมี และวัสดุเติม

สารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ
อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar	HiMedia
อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth	HiMedia
2-Mercaptoethanol	Sigma
3,5-Dinitrosalicylic acid	Sigma
10% SDS Solution	Bio-Rad
40% Acrylamide	Bio-Rad
95% Ethanol	COM
1x Dye Reagent	Bio-Rad
Acetone	Labscan
Acetic acid glacial	RCI Labscan

สารเคมี (ต่อ)

สารเคมี	ยี่ห้อ
Acetic acid glacial	RCI Labscan
Ammonium sulfate	Ajax
Ammonium persulfate	Ajax
Bromothymol blue	Ajax
BLUeye prestained protein ladder	GeneDirex
Calcium carbonate	Ajax
Carboxymethyl cellulose (CMC)	Sigma
Congo red	Ajax
Coomassie Brilliant Blue	Ajax
Dipotassium phosphate	Ajax
Disodium phosphate	Ajax
Dye reagent concentrate	Bio-Rad
EDTA disodium salt	Ajax
Glucose	Ajax
Glycerol	Ajax
Isopropanol	RCI Labscan
Magnesium sulfate	Ajax
Methanol	RCI Labscan
Monosodium phosphate	Ajax
Peptone	HiMedia
Potassium chloride	Ajax
Sodium nitrate	Ajax
Sodium hydroxide	Ajax
Sodium chloride	Ajax
Sodium phosphate	Ajax
Sulfuric acid	Qrec
Tetramethylethylenediamine	Sigma
Total starch assay kit	Megazyme

สารเคมี (ต่อ)

สารเคมี

Tris hydroxymethyl aminomethane

ยี่ห้อ

Omnipur

Yeast extract

HiMedia

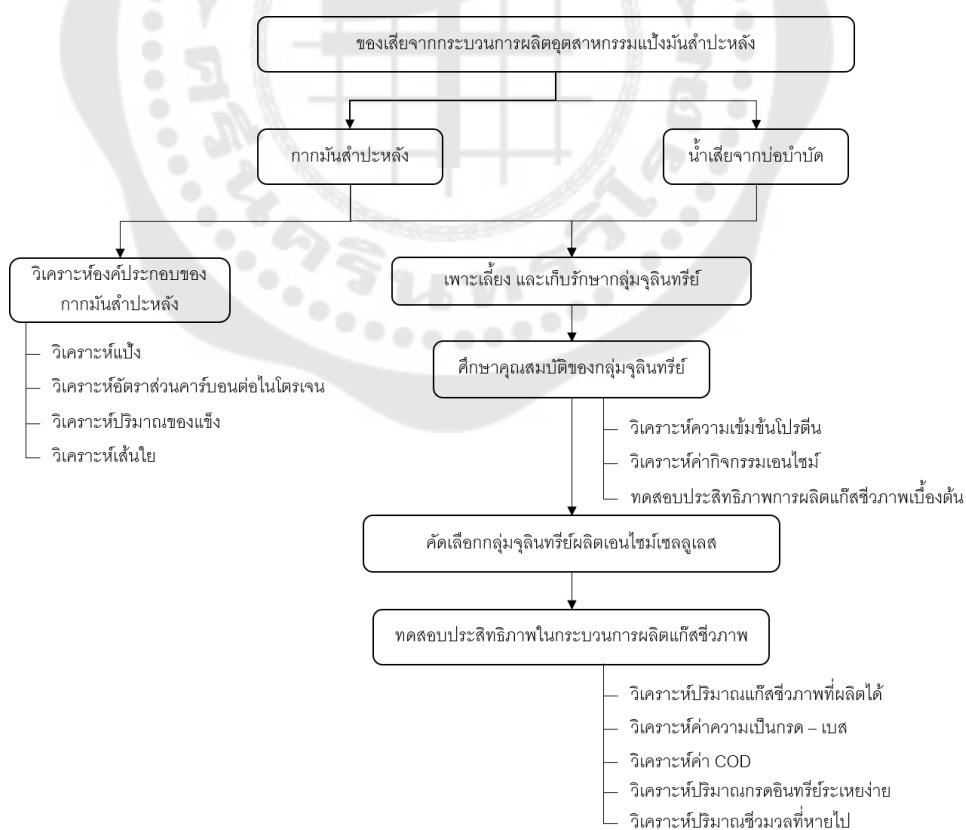
วัตถุดิบ

กากมันสำปะหลัง จากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง จังหวัดอุทัยธานี

น้ำเสียจากบ่อบำบัดน้ำเสีย จากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง จังหวัดอุทัยธานี

วิธีการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยระดับห้องปฏิบัติการ มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพ และค้นหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ โดยมีแผนผังขั้นตอนการวิจัยดังภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 แผนผังขั้นตอนการวิจัย

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง โดยวิธี amyloglucosidase/ α -amylase method

การวิเคราะห์ปริมาณแป้งใช้วิธีการ amyloglucosidase/ α -amylase method ซึ่งดัดแปลงจาก AOAC Method 996.11 และ AACC Method 76-13.01 (McCleary, Charmier, & McKie, 2019) โดยนำตัวอย่างกากมันสำปะหลังมาอบให้แห้ง ปั่นและกรองด้วยตะแกรงลวด ขนาด 0.5 มิลลิเมตร ใส่ตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิกรัม ในหลอดทดลองขนาด 16 x 22 มิลลิเมตร เติม ethanol 80% ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex) จากนั้นนำมาวิเคราะห์แป้งร่วมกับการใช้สารเคมีในชุดตรวจสอบ total starch assay kit ยี่ห้อ Megazyme (ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง) และวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

1.2 การวิเคราะห์อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยวิธี NCHS method

การวิเคราะห์อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ใช้ตัวอย่างอบแห้ง บดละเอียด (powder) มาตรวจหาปริมาณธาตุไนโตรเจน, คาร์บอน, ไฮโดรเจน และซัลเฟอร์ ในตัวอย่าง สารอินทรีย์ (NCHS method) (Lawrenz & Mitchell, 2006) ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์องค์ประกอบ ธาตุ (elemental analyzer) ยี่ห้อ LECO 628 Series ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งอาศัยหลักการ complete combustion (oxidation)

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็ง โดยการชั่งน้ำหนัก (gravimetric method)

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งจะใช้วิธีการชั่งน้ำหนัก (gravimetric method) (Orhororo, Ebunilo, & Sadjere, 2017) โดยแบ่งการวิเคราะห์ดังนี้ 1) ของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) คือ น้ำหนักของสารที่เหลืออยู่ในภาชนะ หลังจากระเหยน้ำออกจากตัวอย่าง ด้วยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 2) ของแข็งระเหยได้ (Volatile solid, VS) คือ ปริมาณของแข็งที่ระเหยไป เมื่อนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งในตัวอย่าง)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยวิธี detergent fiber analysis

การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยวิธี detergent fiber analysis (Soest & Wine, 1967) แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ การหาค่า Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF) และ Acid Detergent Lignin (ADL) (ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของเส้นใยในพืช) โดยปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เทียบกับน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของเส้นใยคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

เฮมิเซลลูโลส (%) = NDF – ADF

เซลลูโลส (%) = ADF – ADL

ลิกนิน (%) = ADL

การเตรียมกลุ่มจุลินทรีย์

1.1 การเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์

แหล่งที่มาของกลุ่มจุลินทรีย์ 4 แหล่ง ได้แก่ กากมันสำปะหลังชุดที่ 1 น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic) จากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลังชุดที่ 2 และน้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic) จากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง ผู้วิจัยเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ในหลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้กากมันสำปะหลัง ปริมาณ 10 กรัม หรือน้ำเสียจากบ่อบำบัด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจนปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 8 กลุ่ม

1.2 การเก็บรักษากลุ่มจุลินทรีย์

การเก็บรักษากลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากกากมันสำปะหลัง และบ่อบำบัด น้ำเสียที่เพาะเลี้ยงได้ จำนวน 8 กลุ่ม เริ่มต้นโดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex) จากนั้นบีบเปิดสารผสมที่เตรียมไว้ 500 ไมโครลิตร และกลุ่มจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ผสมให้เข้ากัน และนำไปเก็บรักษาในรูปของ stock culture ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

การศึกษาคุณสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

1.1 การเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อเก็บเกี่ยวเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme)

การเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อเก็บเกี่ยวเอนไซม์อย่างหยาบ จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสิ้น 4 สูตร ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium ที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (Br), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium ที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน (Bc), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร peptone cellulose solution ที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน (Pr) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร peptone cellulose solution ที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน (Pc)

กระบวนการนี้ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ โดยบีบเปิดกลุ่มจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ใน stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ จากนั้นนำเข้าเครื่องเขย่า

ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการย้ายเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณการเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ โดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium หรือสูตร peptone cellulose solution ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และบ่มต่อเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบระยะเวลาทำการเก็บเกี่ยว เอนไซม์อย่างหยาบ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งมีเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (protein purification) ด้วยการตกตะกอนเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความอิ่มตัวร้อยละ 80 และการทำไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ถุงไดอะไลซิสขนาด 10K MWCO ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายโปรตีนในถุงมา ใส่หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง (spin column) ขนาด 10K MWCO concentrated column ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส ที่อยู่ด้านบนหลอด (supernatant) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้ ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป

1.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีน โดยวิธี Bradford protein assay

การวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีน โดยวิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) เริ่มจากการสร้างกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นโปรตีน โดยใช้สารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย BSA ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในควิเวทท์ เดิมสารละลาย 1x Dye Reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้คำนวณเป็นกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นโปรตีน

วิเคราะห์หาค่าปริมาณโปรตีนของเอนไซม์อย่างหยาบ โดยปิเปตเอนไซม์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในควิเวทท์ เดิมสารละลาย 1x dye reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ และคำนวณค่าปริมาณโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นโปรตีน

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารตั้งต้นให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic (DNS) colorimetric method

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารตั้งต้นให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ ใช้สารตั้งต้น 3 ชนิด ได้แก่ carboxymethyl cellulose (CMC) ฟางข้าว และกากมันสำปะหลัง โดยทดสอบเอนไซม์อย่างหยาบที่ผลิตขึ้นจากกลุ่มจุลินทรีย์กับสารตั้งต้นแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2.5% ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS method (Miller, 1959) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายที่ได้ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย และน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตใส่ในคิวเวทท์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 540 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งสร้างจากสารละลายกลูโคสที่ทราบความเข้มข้น และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาว 540 นาโนเมตร

1.4 การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนด้วย SDS-PAGE analysis

การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis (Laemmli, 1970) ด้วย 12% gel SDS-PAGE โดยตัวอย่างโปรตีนที่ตรวจหาคือ เอนไซม์อย่างหยาบที่กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตขึ้น เริ่มจากการเตรียมแผ่นเจลที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย separating gel และ stacking gel (ภาคผนวก ข) ขั้นตอนการวิเคราะห์ปิเปตตัวอย่างโปรตีน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ SDS gel-loading buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการต้ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ จากนั้นปิเปต BLUeye prestained protein ladder ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นแถบ standard marker เปรียบเทียบขนาดโปรตีน การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ใช้เครื่อง electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำแผ่นเจลมาย้อมเพื่อสังเกตการย้อมติดสีของแถบโปรตีน โดยแช่แผ่นเจลในสารละลาย Coomassie blue staining buffer บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เทสารละลายที่ใช้ย้อมสีออก และล้างแผ่นเจลด้วยสารละลาย destaining buffer บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จนสังเกตเห็นแถบโปรตีน บนที่กภาพ และเปรียบเทียบกับแถบ standard marker ซึ่งแสดงขนาดของโมเลกุลโปรตีนในช่วง 11 ถึง 245 kDa

นอกจากนี้วิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยสารตั้งต้น CMC ใช้ 12% gel SDS-PAGE ที่ผสม 1% CMC ในเจล ทำตามขั้นตอนเดิมตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง จนกระทั่งการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าใช้เครื่อง electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่แผ่นเจลใน wash buffer บนเครื่องเขย่า 1 ชั่วโมง เพื่อล้าง SDS ออก เมื่อครบกำหนดเวลาย้ายแผ่นเจลไปแช่ใน renaturing buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นเจลมาย้อมสีด้วยสารละลาย Congo red 1% บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาล้างแผ่นเจลด้วยสารละลายด้วย 1M NaCl เป็นเวลา 10 นาที สังเกตหาโซนสีที่แสดงถึงการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารตั้งต้น CMC และบันทึกผล

1.5 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพเบื้องต้น

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพเบื้องต้น ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยกำหนดปริมาตร working volume เท่ากับ 200 มิลลิลิตร ใช้กากมันสำปะหลัง 20% w/v ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ปริมาณ 33 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบสของสารผสมภายในขวดรูปชมพู่ให้มีค่าเท่ากับ 7 และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรน้ำภายในขวดรูปชมพู่เท่ากับ 200 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดด้วยจุกยางเจาะรูที่ต่อสายยางสำหรับเก็บแก๊ส นำปลายสายยางใส่ในบีกเกอร์บรรจุน้ำที่คิดว่าไว้บ่มแก๊สที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บันทึกปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นโดยวิธีการแทนที่น้ำในบีกเกอร์ ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 14 วัน

การหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์

การหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยกากมันสำปะหลัง และการผลิตแก๊สชีวภาพ ผู้วิจัยตั้งภาวะการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์โดยกำหนด 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ มีค่า 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ มีปริมาณ 25%, 50% และ 75% v/v และชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ โดยทำการทดลอง 2 ข้ำ ในทุกการทดลอง และชุดควบคุม (control)

ภาชนะที่ใช้ในการทดลองหมักแก๊สชีวภาพ คือ ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยกำหนดปริมาตร working volume เท่ากับ 200 มิลลิลิตร ใช้กากมันสำปะหลัง 15% w/v มูลวัว ปริมาณ 5% w/v peptone 1.6 กรัม สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 250 mM

ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สำหรับปริมาตรกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้มีปริมาณ 25%, 50% และ 75% v/v จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบสของสารผสมให้มีค่าเท่ากับ 7 และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรน้ำภายในขวดรูปชมพู่เท่ากับ 200 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดรูปชมพู่ด้วยจุกยางเจาะรูที่ต่อสายยางสำหรับเก็บแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน วัดปริมาณแก๊สโดยวิธีแทนที่น้ำทุก ๆ 24 ชั่วโมง วัดค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-เบส วัดค่าซีไอดี โดยใช้วิธีฟลักซ์แบบปิด/การไทเทรต (closed Reflux, titrimetric Method) และวัดค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย โดยใช้วิธี distilled method (Siedlecka et al., 2008) ทุก ๆ 3 วันตลอดระยะเวลาการทดลอง และบันทึกปริมาณการย่อยสลายชีวมวล (biomass) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ปริมาณแก๊ส ธาตุองค์ประกอบ ของแข็ง และเส้นใย โดยหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ
2. วิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนที่ผลิตได้จากกลุ่มจุลินทรีย์ โดยหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำการทดลอง 2 ซ้ำ
3. วิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ของ กลุ่มจุลินทรีย์ โดยหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ
4. วิเคราะห์ปริมาณแก๊สสะสม จากทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพเบื้องต้น 14 วัน โดยหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำการทดลอง 2 ซ้ำ และวิเคราะห์สถิติทดสอบของครัสคอกล-วอลลิส (Kruskal-Wallis test)
5. วิเคราะห์ภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแก๊สชีวภาพ 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ และชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ โดยวัดค่าปริมาณแก๊สสะสม ความเป็นกรด-เบส ค่าซีไอดี ค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย และปริมาณชีวมวลที่หายไป สำหรับค่าปริมาณแก๊สสะสม วิเคราะห์โดยหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำการทดลอง 2 ซ้ำ และวิเคราะห์สถิติทดสอบของ ครัสคอกล-วอลลิส

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลัง เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เกิดขึ้นภายหลังจากกระบวนการสกัดแป้งออกจากหัวมันสำปะหลัง องค์ประกอบหลักที่พบในกากมันสำปะหลัง ได้แก่ แป้ง และเส้นใย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน ในการวิจัยครั้งนี้ได้นำกากมันสำปะหลัง มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตแก๊สชีวภาพ จึงได้ทำการศึกษาปริมาณขององค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

ปริมาณแป้ง

นำตัวอย่างกากมันสำปะหลังแห้ง 100 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์แป้งด้วยชุดตรวจทดสอบ total starch assay จาก Megazyme โดยวิธี amyloglucosidase/ α -amylase method พบว่ามีแป้งเป็นองค์ประกอบร้อยละ 42.31 ± 2.45 ดังแสดงในตาราง 5

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

นำตัวอย่างกากมันสำปะหลังแห้ง ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุ (elemental analyzer) ยี่ห้อ LECO 628 Series โดยวิธี NCHS method ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองมีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ เป็นองค์ประกอบร้อยละ 40.10 ± 0.39 , 6.11 ± 0.11 , 0.25 ± 0.01 และ 0.41 ± 0.18 เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้งตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 5 ดังนั้นกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลอง จึงมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 160.40 : 1

ปริมาณของแข็ง

นำตัวอย่างกากมันสำปะหลังสด 2 กรัม ไปอบแห้ง และนำมาชั่งน้ำหนัก พบปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) มีค่าร้อยละ 14.96 ± 0.10 จากนั้นนำกากมันสำปะหลังไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนัก พบปริมาณของแข็งระเหยได้ (Volatile solid, VS) มีค่าร้อยละ 97.59 ± 0.02 เมื่อเทียบกับปริมาณของแข็งทั้งหมด หรือ 6.52 ± 0.04 เมื่อเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างกากมันสำปะหลังสด ดังแสดงในตาราง 5

ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

นำตัวอย่างกากมันสำปะหลังน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ไปบดให้มีขนาดเล็ก หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน พบปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด ร้อยละ 84.93 ± 0.68 และปริมาณลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 10.83 ± 0.53 และ 0.50 ± 1.35 เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ปริมาณที่พบ (%)
แป้ง	42.31 ± 2.45
ธาตุคาร์บอน	40.10 ± 0.39
ธาตุไฮโดรเจน	6.11 ± 0.11
ธาตุไนโตรเจน	0.25 ± 0.01
ธาตุซัลเฟอร์	0.41 ± 0.18
ของแข็งทั้งหมด	14.96 ± 0.10
ของแข็งระเหยได้	6.52 ± 0.04
องค์ประกอบเส้นใย (fiber content)	
เซลลูโลส	84.93 ± 0.68
เฮมิเซลลูโลส	0.50 ± 1.35
ลิกนิน	10.83 ± 0.53

การเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อเก็บเกี่ยวเอนไซม์

กลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมาจาก 4 แหล่ง ได้แก่ น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic) ของโรงงานแป้งมันสำปะหลัง, กากมันสำปะหลังชุดที่ 1, น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic) ของโรงงานแป้งมันสำปะหลัง และกากมันสำปะหลังชุดที่ 2 จากนั้นผู้วิจัยเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth และบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ทำให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 8 กลุ่ม ดังตาราง 6

ตาราง 6 กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากบ่อบำบัดน้ำเสียและกากมันสำปะหลัง

กลุ่มจุลินทรีย์	แหล่งที่มา	อุณหภูมิ (°C)
1	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	30
2	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	50
3	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	30
4	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	50
5	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	30
6	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	50
7	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	30
8	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	50

จากนั้นนำกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 8 กลุ่ม มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium (B) และสูตร peptone cellulose solution (P) โดยใช้ฟางข้าว (r) และกากมันสำปะหลัง (c) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร ส่งผลให้มีอาหาร 4 สูตร ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium + ฟางข้าว (Br), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium + กากมันสำปะหลัง (Bc), อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร peptone cellulose solution + ฟางข้าว (Pr) และ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร peptone cellulose solution + กากมันสำปะหลัง (Pc)

การตั้งชื่อกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย ตัวอักษรและตัวเลข 3 ตำแหน่ง ดังต่อไปนี้

ตัวอักษร ตำแหน่งที่ 1 หมายถึง ชนิดของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

ตัวอักษร ตำแหน่งที่ 2 หมายถึง ชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตัวเลข ตำแหน่งที่ 3 หมายถึง แหล่งที่มาของกลุ่มจุลินทรีย์

ยกตัวอย่าง กลุ่มจุลินทรีย์ Br-1 หมายถึง กลุ่มจุลินทรีย์จากน้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร

ตาราง 7 กลุ่มจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในภาวะแตกต่างกันเพื่อใช้ในการทดลอง

กลุ่มจุลินทรีย์	แหล่งที่มา	อุณหภูมิ (°C)	อาหารเลี้ยงเชื้อ*
Br-1	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	30	Br
Br-2	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	50	Br
Br-3	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	30	Br
Br-4	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	50	Br
Br-5	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	30	Br
Br-6	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	50	Br
Br-7	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	30	Br
Br-8	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	50	Br
Bc-1	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	30	Bc
Bc-2	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	50	Bc
Bc-3	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	30	Bc
Bc-4	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	50	Bc
Bc-5	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	30	Bc
Bc-6	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	50	Bc
Bc-7	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	30	Bc
Bc-8	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	50	Bc
Pr-1	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	30	Pr
Pr-2	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	50	Pr
Pr-3	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	30	Pr
Pr-4	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	50	Pr
Pr-5	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	30	Pr
Pr-6	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	50	Pr
Pr-7	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	30	Pr
Pr-8	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	50	Pr
Pc-1	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	30	Pc
Pc-2	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (mesophilic)	50	Pc

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มจุลินทรีย์	แหล่งที่มา	อุณหภูมิ (°C)	อาหารเลี้ยงเชื้อ*
Pc-3	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	30	Pc
Pc-4	กากมันสำปะหลังชุดที่ 1	50	Pc
Pc-5	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	30	Pc
Pc-6	น้ำเสียจากบ่อบำบัด (thermophilic)	50	Pc
Pc-7	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	30	Pc
Pc-8	กากมันสำปะหลังชุดที่ 2	50	Pc

* หมายเหตุ Br = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium ที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

Bc = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium ที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

Pr = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร peptone cellulose solution ที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

Pc = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร peptone cellulose solution ที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

จากตาราง 7 พบว่าการเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากบ่อบำบัดน้ำเสีย และกากมันสำปะหลัง ในภาวะที่มีอุณหภูมิ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันดังตาราง ทำให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 32 กลุ่ม ซึ่งจะถูกนำไปใช้เพาะเลี้ยง เพื่อเก็บเกี่ยวเอนไซม์อย่างหยาบ สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตั้งต้น และทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สชีวภาพของจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ในการทดลองต่อไป

ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์อย่างหยาบจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง

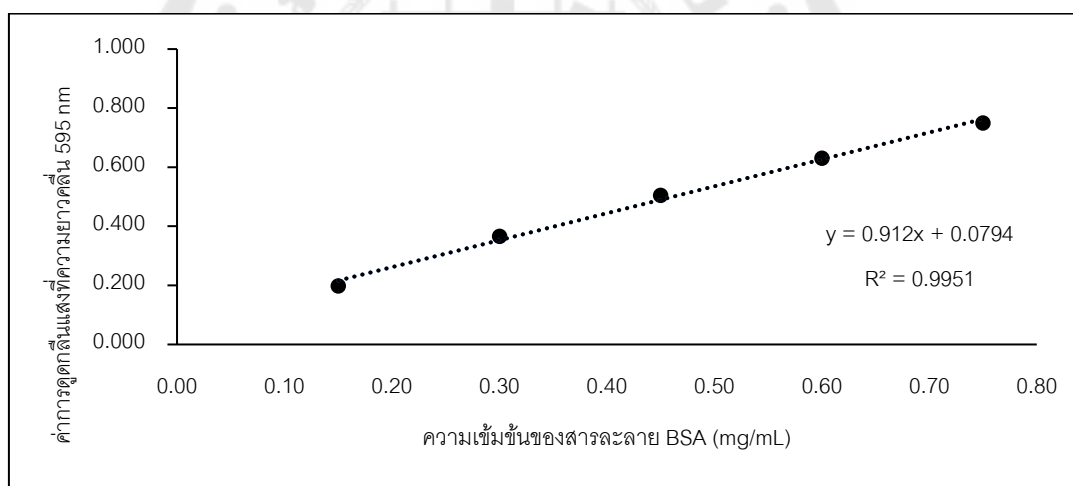
การสร้างกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นโปรตีน

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นโปรตีน โดยใช้สารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, และ 0.75 mg/mL ตามลำดับ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นที่ 595 nm ผลการทดลองเป็นดังตาราง 8

ตาราง 8 ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลาย Bovine Serum Albumin ที่ 595 nm

ค่าความเข้มข้น สารละลาย BSA (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (Abs) ที่ความยาวคลื่น 595 nm
0.15	0.198
0.30	0.366
0.45	0.505
0.60	0.630
0.75	0.750

แล้วนำผลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm กับความเข้มข้นสารละลาย BSA เป็นดังภาพประกอบ 5

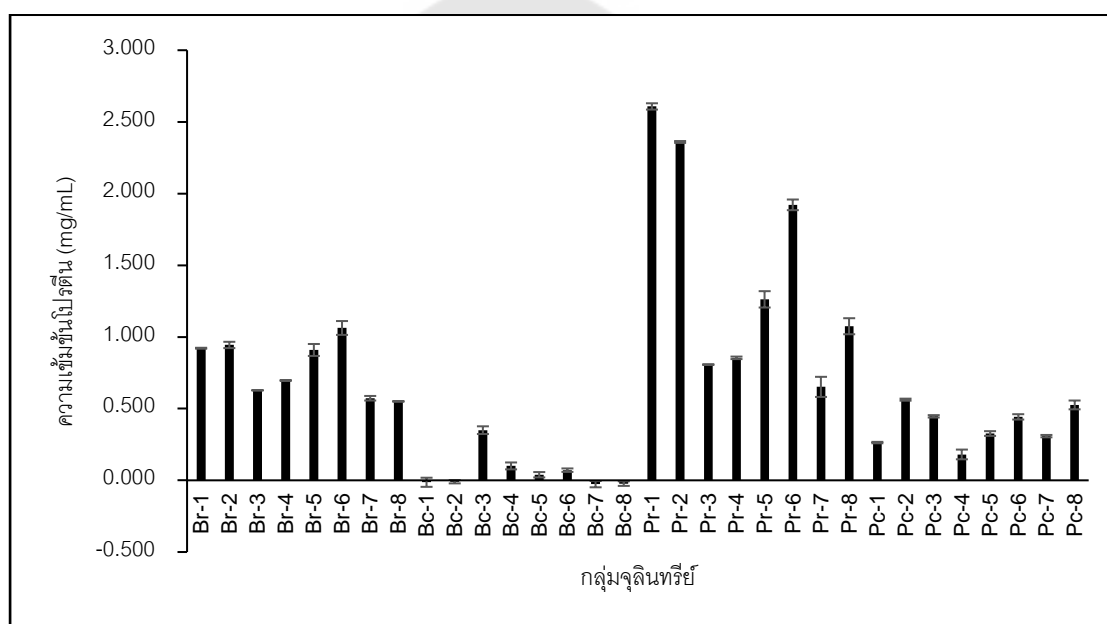


ภาพประกอบ 5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 0.15 – 0.75 mg/mL และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm

จากกราฟได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: R^2) เท่ากับ 0.9951 จากสมการ $y = 0.912x + 0.0794$ เมื่อ x แทน ความเข้มข้นของสารละลาย BSA (mg/mL) และ y แทน ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Bovine Serum Albumin ที่ 595 nm

ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) จากกลุ่มจุลินทรีย์

การเก็บเกี่ยวตัวอย่างเอนไซม์อย่างหยาบ สามารถเก็บได้ทั้งสิ้น 32 ตัวอย่าง จากกลุ่มจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงไว้ 32 กลุ่ม พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ Pr-1, Pr-2 และ Pr-6 สามารถผลิตเอนไซม์อย่างหยาบได้ปริมาณมากที่สุด ดังแสดงในภาพประกอบ 6 โดยกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-1 ผลิตเอนไซม์อย่างหยาบได้ปริมาณ 2.61 ± 0.02 mg/mL, กลุ่มจุลินทรีย์ Pr-2 และ Pr-6 ผลิตเอนไซม์อย่างหยาบได้ปริมาณ 2.36 ± 0.01 mg/mL และ 1.92 ± 0.04 mg/mL ตามลำดับ



ภาพประกอบ 6 ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์อย่างหยาบจากกลุ่มจุลินทรีย์

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารตั้งต้น ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

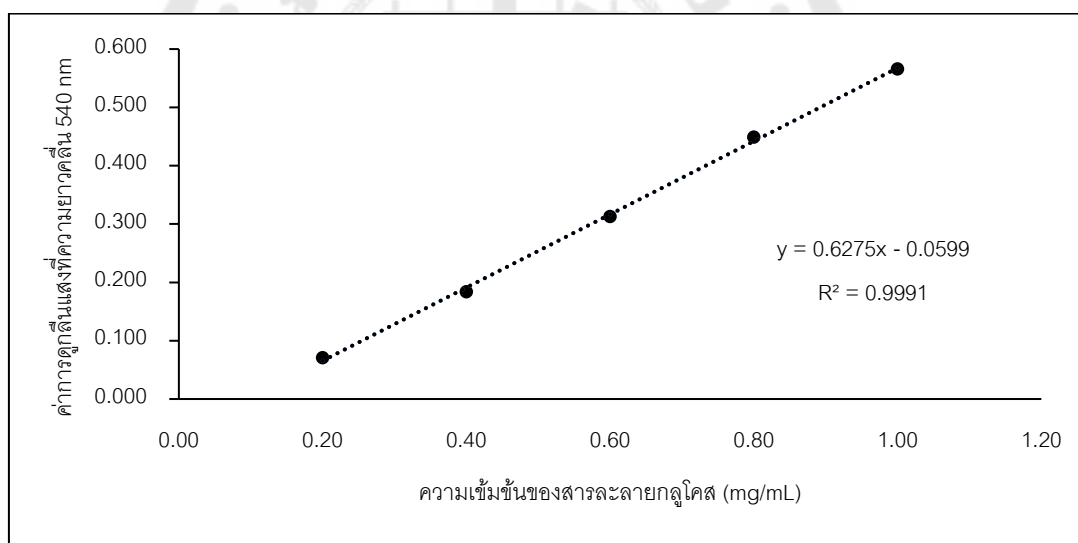
การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 mg/mL ตามลำดับ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 540 nm ผลการทดลองเป็นดังตาราง 9

ตาราง 9 ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ 540 nm

ค่าความเข้มข้น สารละลายมาตรฐานกลูโคส (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง (Abs) ที่ความยาวคลื่น 540 nm
0.20	0.071
0.40	0.184
0.60	0.313
0.80	0.449
1.00	0.566

แล้วนำผลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 nm กับความเข้มข้นสารละลายกลูโคส เป็นดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.20 – 1.00 mg/mL และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

จากกราฟได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: R^2) เท่ากับ 0.9991 จากสมการ $y = 0.6275x - 0.0599$ เมื่อ x แทน ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (mg/mL) และ y แทน ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ 540 nm

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ

วิเคราะห์คุณสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์ในการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง โดยนำเอนไซม์อย่างหยาบแต่ละตัวอย่าง มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารตั้งต้นให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ carboxymethyl cellulose (CMC) ฟางข้าว และกากมันสำปะหลัง อัตราส่วนของสารตั้งต้นและเอนไซม์ มีค่าเท่ากับ 5% w/v ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการ DNS method ดังตาราง 10



ตาราง 10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสารถังต้นชนิดต่าง ๆ

กลุ่มจุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/mL)		
	CMC	ฟางข้าว	กากมันสำปะหลัง
Br-1	2.159 ± 0.081 ^d	2.613 ± 0.119 ^a	3.768 ± 0.065 ^h
Br-2	1.704 ± 0.068 ^e	2.270 ± 0.136 ^c	4.111 ± 0.078 ^{gh}
Br-3	1.476 ± 0.156 ^g	2.517 ± 0.069 ^{ab}	11.377 ± 0.230 ^b
Br-4	2.076 ± 0.064 ^d	2.360 ± 0.084 ^c	11.470 ± 0.720 ^b
Br-5	1.510 ± 0.087 ^g	2.392 ± 0.082 ^{abc}	2.528 ± 0.113 ^j
Br-6	2.889 ± 0.143 ^c	2.185 ± 0.085 ^c	2.661 ± 0.312 ^{ij}
Br-7	1.099 ± 0.173	2.164 ± 0.109 ^c	4.790 ± 0.605 ^{gm}
Br-8	0.918 ± 0.167 ^{hi}	2.344 ± 0.077 ^c	9.704 ± 0.299 ^k
Bc-1	0.525 ± 0.014 ^l	1.500 ± 0.064 ^e	0.945 ± 0.051 ⁿ
Bc-2	0.528 ± 0.028 ^{jk}	1.534 ± 0.104 ^e	0.921 ± 0.085 ⁿ
Bc-3	3.341 ± 0.199 ^b	1.548 ± 0.084 ^e	6.390 ± 0.214 ^f
Bc-4	2.244 ± 0.058 ^d	1.813 ± 0.104 ^d	3.117 ± 0.137 ^{ij}
Bc-5	0.536 ± 0.048 ^{jk}	1.463 ± 0.040 ^{ef}	0.921 ± 0.120 ⁿ
Bc-6	0.509 ± 0.029 ^{jk}	1.585 ± 0.113 ^e	1.715 ± 0.136 ^l
Bc-7	0.634 ± 0.044 ^{ijk}	1.593 ± 0.008 ^e	1.510 ± 0.090 ^l
Bc-8	0.653 ± 0.089 ^{ijk}	1.662 ± 0.114 ^{de}	1.452 ± 0.160 ^l
Pr-1	2.796 ± 0.057 ^c	1.471 ± 0.112 ^e	2.876 ± 0.151 ^{ij}
Pr-2	2.050 ± 0.069 ^d	1.455 ± 0.056 ^e	2.469 ± 0.228 ^j
Pr-3	1.386 ± 0.037 ^g	1.423 ± 0.122 ^e	5.361 ± 0.448 ^e
Pr-4	3.309 ± 0.108 ^b	1.311 ± 0.060 ^f	8.296 ± 0.332 ^d
Pr-5	1.654 ± 0.100 ^{ef}	1.380 ± 0.057 ^e	1.699 ± 0.053 ^l
Pr-6	4.352 ± 0.286 ^a	1.617 ± 0.155 ^e	4.597 ± 0.243 ^m
Pr-7	0.761 ± 0.072 ^j	1.731 ± 0.124 ^d	12.878 ± 0.393 ^a
Pr-8	0.669 ± 0.056 ^{ijk}	0.974 ± 0.040 ^g	1.309 ± 0.177 ^{ln}
Pc-1	0.663 ± 0.032 ^{ijk}	0.743 ± 0.009 ^h	3.165 ± 0.065 ^{ij}
Pc-2	0.663 ± 0.103 ^{ijk}	0.878 ± 0.088 ^{gh}	3.550 ± 0.033 ^h
Pc-3	1.447 ± 0.157	1.008 ± 0.140 ^g	6.503 ± 0.719 ^f
Pc-4	0.924 ± 0.035 ^{hi}	0.740 ± 0.110 ^h	7.792 ± 0.320 ^e

ตาราง 10 (ต่อ)

กลุ่มจุลินทรีย์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/mL)		
	CMC	ฟางข้าว	กากมันสำปะหลัง
Pc-5	0.634 ± 0.068 ^{ijk}	0.868 ± 0.035 ^{gh}	2.297 ± 0.178 ^l
Pc-6	1.540 ± 0.064 ^{fg}	0.865 ± 0.077 ^{gh}	1.545 ± 0.266 ^l
Pc-7	0.621 ± 0.071 ^{ijk}	0.775 ± 0.091 ^h	10.633 ± 0.144 ^c
Pc-8	0.538 ± 0.033 ^{jk}	0.708 ± 0.084 ^h	10.554 ± 0.587 ^c

ค่าในตารางแสดง $\bar{X} \pm SD$ ที่มาจากการทดลอง 3 ซ้ำในภาวะเดียวกัน วิเคราะห์สถิติในแต่ละสารตั้งต้นด้วยวิธี Mann-Whitney U test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี least significant difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากตาราง 10 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารตั้งต้น CMC ของเอนไซม์ที่เก็บเกี่ยวจากกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 32 กลุ่ม พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากเอนไซม์ทั้งหมด 32 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0.51 – 4.35 mg/mL เมื่อสารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นฟางข้าวแนวโน้มประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเอนไซม์ ก็เปลี่ยนไปเช่นกัน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากเอนไซม์ทั้งหมด 32 ตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 0.71 – 2.61 mg/mL

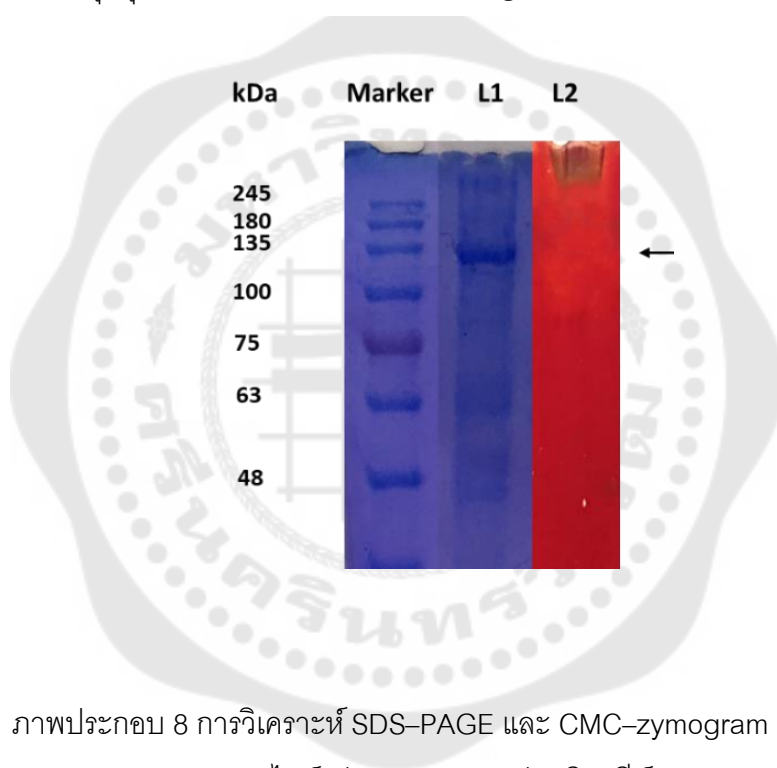
การใช้กากมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้น พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากเอนไซม์ทั้งหมด 32 ตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 0.92 – 12.88 mg/mL โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายกากมันสำปะหลังของกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-7 แตกต่างจากกลุ่มจุลินทรีย์อื่น ($p < 0.05$)

คุณสมบัติของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการอีกประการหนึ่ง คือ ความสามารถในการผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง ผู้วิจัยจึงคัดเลือกจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายกากมันสำปะหลังได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า 9 mg/mL ขึ้นไป ได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์ Br-3, Br-4, Br-8, Pr-7, Pc-7 และ Pc-8 เพื่อนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพเบื้องต้นต่อไป

การวิเคราะห์ SDS-PAGE และ CMC-zymogram analysis

การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนเพื่อตรวจสอบขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE และวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้น CMC ด้วย CMC-zymogram เลือกใช้เอนไซม์อย่างหายาบจากกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6 เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น CMC ได้น้ำตาลรีดิทรีอัสปริมาณมากที่สุด ดังตาราง 10

CMC เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายสารของเอนไซม์ endoglucanase (Ordaz-Díaz et al., 2016) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันว่าเอนไซม์อย่างหายาบของกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6 เป็นเอนไซม์ endoglucanase



ภาพประกอบ 8 การวิเคราะห์ SDS-PAGE และ CMC-zymogram analysis ของเอนไซม์อย่างหายาบจากกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6

จากผลการทดลองพบแถบโปรตีน ดังภาพประกอบ 8 ตำแหน่ง Marker คือ BLUeye prestained protein ladder ตำแหน่ง L1 คือ แถบโปรตีนที่ย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue คือ และตำแหน่ง L2 คือ บริเวณโซนใสที่ย้อมสีด้วย Congo red

ผลการทดลองพบว่า แถบโปรตีนมีขนาด 130 kDa บน SDS-PAGE ที่ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue (L1) แสดงว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 130 kDa นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ CMC-zymogram พบตำแหน่งใสที่ปรากฏตรงกับแถบโปรตีนเอนไซม์เซลลูเลสที่สกัดได้จากกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6 ดังภาพประกอบ 11 (L2) ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้า

พบว่า เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็น CMC เอนไซม์จากกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตั้งต้นดังกล่าว โดยสาร CMC ในแผ่นเจลทำปฏิกิริยากับสี Congo red ทำให้บริเวณที่มีสาร CMC ปรากฏเป็นสีแดง เมื่อสาร CMC ถูกย่อย จึงทำให้บริเวณดังกล่าวไม่เกิดการดูดซึมสีของ Congo red จึงปรากฏเป็นตำแหน่งใส (Johnsen & Krause, 2014)

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแก๊สเบื้องต้น

กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังสูงสุด 6 อันดับแรก ได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์ Br-3, Br-4, Br-8, Pr-7, Pc-7 และ Pc-8 นำมาบ่มกับกากมันสำปะหลัง 20% w/v เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยกำหนดปริมาตร working volume 200 มิลลิลิตร ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ปริมาตร 33 มิลลิลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-เบสของสารผสมภายในขวดรูปชมพู่ให้มีค่าเท่ากับ 7 ได้ผลการทดลอง ดังตาราง 11

ตาราง 11 ปริมาณแก๊สสะสมตลอดระยะเวลา 14 วัน จากการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในการหมักแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง

กลุ่มจุลินทรีย์	ปริมาณแก๊สสะสม (mL/g-VS)*
Br-3	14.09 ± 15.29
Br-4	43.37 ± 56.35
Br-8	215.71 ± 69.47
Pr-7	11.56 ± 1.59
Pc-7	78.83 ± 33.52
Pc-8	349.33 ± 11.38
control	13.43 ± 0.33

ค่าในตารางแสดง $\bar{X} \pm SD$ ที่มาจากการทดลอง 2 ซ้ำในภาวะเดียวกัน วิเคราะห์สถิติทดสอบของครัสคาล-วอลลิส ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากตาราง 11 ปริมาณแก๊สชีวภาพสะสม 14 วัน จากกลุ่มจุลินทรีย์ Br-3, Br-4, Br-8, Pr-7, Pc-7, Pc-8 และ control พบว่าไม่แตกต่างกัน ($\chi^2 = 10.343$, $df = 6$, $p = 0.111$) โดยกลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ผลิตแก๊สชีวภาพได้มากที่สุด 349.33 ± 11.38 mL/g-VS รองลงมาคือ กลุ่มจุลินทรีย์ Br-8 ผลิตแก๊สชีวภาพได้ 215.71 ± 69.47 mL/g-VS นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแก๊สของ control ที่ไม่ได้ใส่กลุ่มจุลินทรีย์ ผลิตแก๊สชีวภาพ

ได้ 13.43 ± 0.33 mL/g-VS พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 และ Br-8 ผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่า 26 และ 16 เท่า ตามลำดับ

กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 และ Br-8 เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงสุดสองอันดับแรก ผู้วิจัยจึงเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 และ Br-8 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เพื่อหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

ภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

ผู้วิจัยได้ตั้งภาวะการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ โดยกำหนดค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7 เป็นตัวแปรควบคุม และกำหนดปัจจัย 3 ปัจจัย เป็นตัวแปรต้น ดังนี้

1. อุณหภูมิ มีค่า 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส
2. ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ มีค่า 25, 50 และ 75 %v/v
3. ชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ ซึ่งได้รับการคัดเลือกคุณสมบัติจากการทดลองก่อนหน้า

ได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์ Br-8 หมายถึง กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาจากกากมันสำปะหลังชุดที่ 2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร basal medium โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร และกลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 หมายถึง กลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดแยกมาจากน้ำกากมันสำปะหลังชุดที่ 2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร peptone cellulose solution โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร

สำหรับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Br-8 25 %v/v มีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.09 กรัม ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Br-8 50 %v/v มีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.18 กรัม ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Br-8 75 %v/v มีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.27 กรัม ในขณะที่ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Pc-8 25 %v/v มีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.15 กรัม ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Pc-8 50 %v/v มีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.31 กรัม ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Pc-8 75 %v/v มีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.46 กรัม

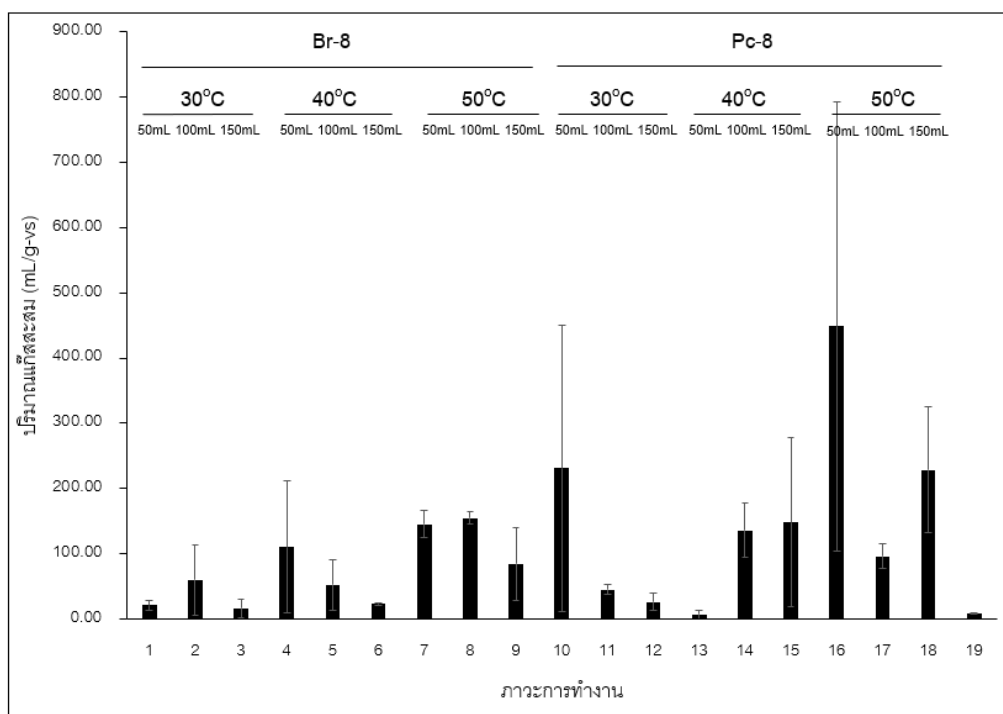
เมื่อกำหนดปัจจัยต่าง ๆ ครบถ้วนแล้วทำให้ได้ภาวะการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ 18 ภาวะ และชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่กลุ่มจุลินทรีย์ 1 ภาวะ โดยชุดควบคุมจะทำงานที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังตาราง 12

ตาราง 12 ภาวะการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

ภาวะการทำงาน	กลุ่มจุลินทรีย์	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (%v/v)	อุณหภูมิ (°C)
1	Br-8	25	30
2	Br-8	50	30
3	Br-8	75	30
4	Br-8	25	40
5	Br-8	50	40
6	Br-8	75	40
7	Br-8	25	50
8	Br-8	50	50
9	Br-8	75	50
10	Pc-8	25	30
11	Pc-8	50	30
12	Pc-8	75	30
13	Pc-8	25	40
14	Pc-8	50	40
15	Pc-8	75	40
16	Pc-8	25	50
17	Pc-8	50	50
18	Pc-8	75	50
19	control	-	40

ปริมาณแก๊สสะสมตลอดระยะเวลา 28 วัน

ผู้วิจัยเก็บปริมาณแก๊สโดยวิธีแทนที่น้ำในบีกเกอร์ทุก ๆ 24 ชั่วโมง บันทึกผลเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณแก๊สชีวภาพตลอดระยะเวลา 28 วัน ได้ผลดังภาพประกอบ 9



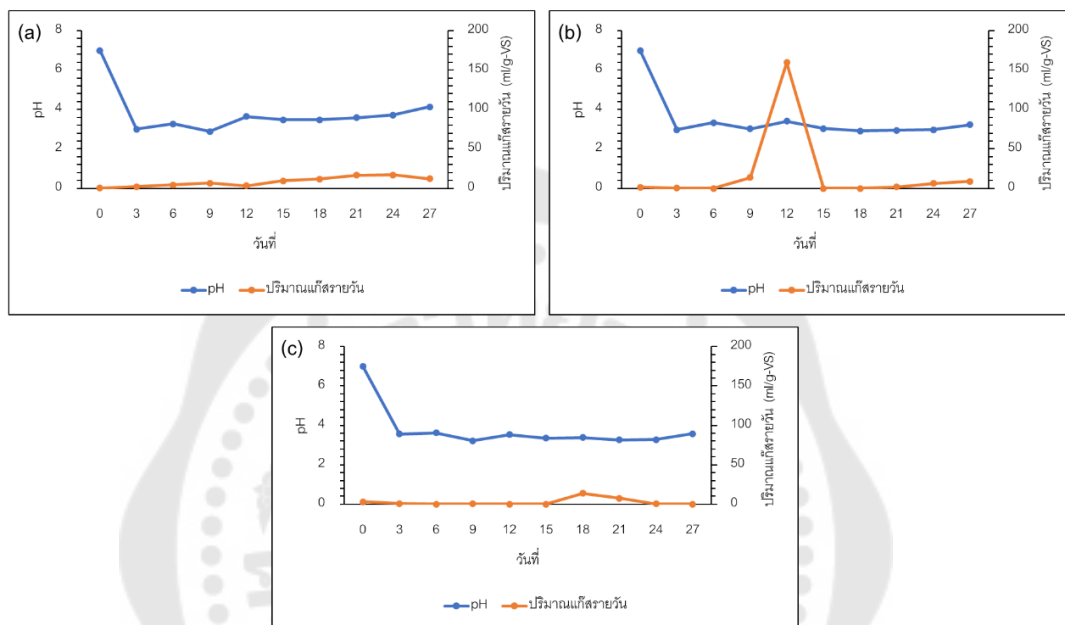
ภาพประกอบ 9 ปริมาณแก๊สสะสมของภาวะการทำงานต่าง ๆ ตลอดระยะเวลา 28 วัน

ค่าในภาพแสดง $\bar{X} \pm SD$ ที่มาจากการทดลอง 2 ซ้ำในภาวะเดียวกัน วิเคราะห์สถิติทดสอบของครัสคอล-วอลลิส ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากภาพประกอบ 9 ปริมาณแก๊สชีวภาพสะสม 28 วัน จาก 19 ภาวะการทำงาน พบว่าไม่แตกต่างกัน ($\chi^2 = 21.061$, $df = 18$, $p = 0.276$) จะเห็นได้ว่า ภาวะการทำงานที่อุณหภูมิเดียวกัน และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เท่ากัน กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้มากกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ Br-8 โดยภาวะการทำงานที่ 16 คือ การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ปริมาณ 25 %v/v ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบปริมาณแก๊สชีวภาพสะสมสูงสุด เท่ากับ 448.82 mL/g-VS สำหรับภาวะการทำงานที่ 10 คือ การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ปริมาณ 25 %v/v ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการทดลองของภาวะการทำงานที่ 18 คือ การใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ปริมาณ 75 %v/v ที่ป่มในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณแก๊สชีวภาพสะสมรองลงมา เท่ากับ 230.90 mL/g-VS และ 228.37 mL/g-VS ตามลำดับ

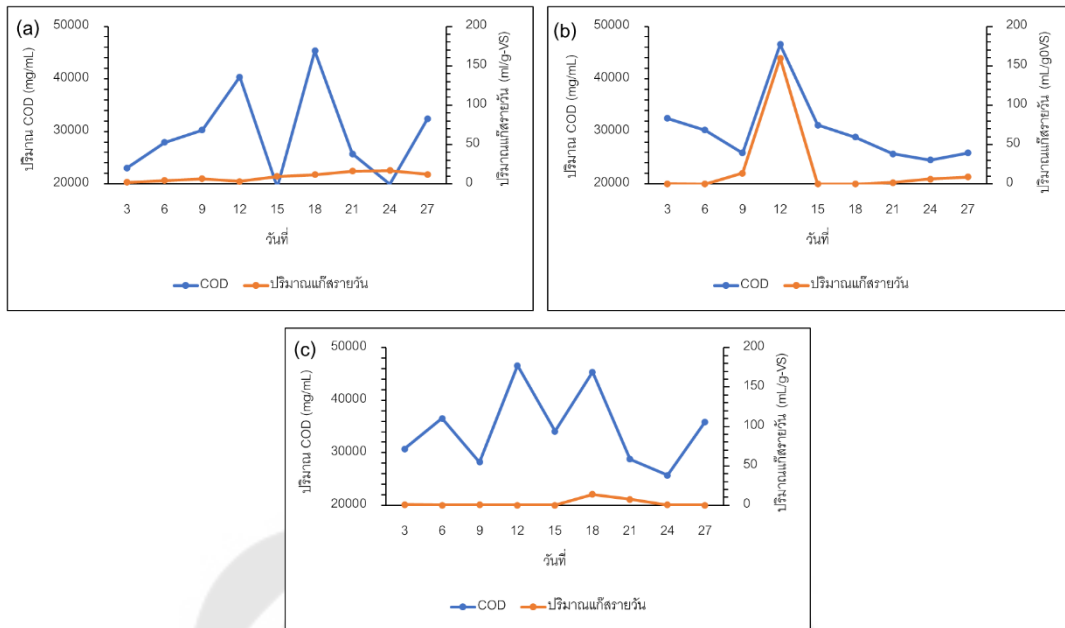
ความสัมพันธ์ของดัชนีบ่งชี้ประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ

ค่าความเป็นกรด-เบส ค่าซีไอดี และค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่บันทึกผลทุก ๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลาการทดลอง 28 วัน สามารถนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้



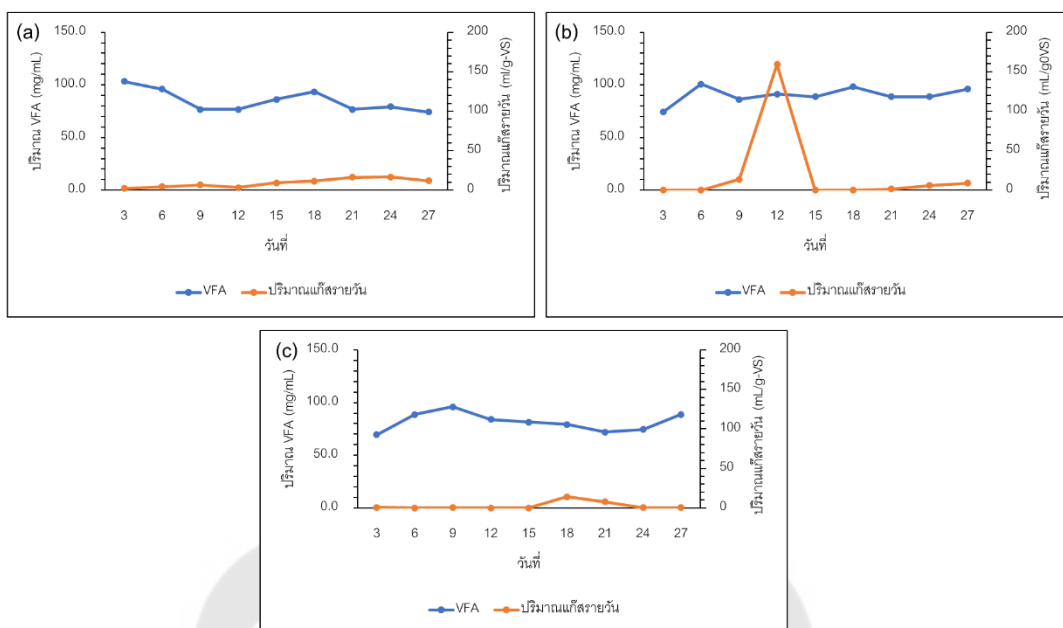
ภาพประกอบ 10 ความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณแก๊สสายวัน ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)

จากภาพประกอบ 10 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-เบส และปริมาณแก๊สสายวัน ในระยะเวลาการทดลอง 28 วัน โดยค่าความเป็นกรด-เบส เมื่อเริ่มต้นการทดลองมีค่าเท่ากับ 7 เมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลา 3 วัน ค่าความเป็นกรด-เบสลดลงอยู่ในช่วง 3 – 4 ซึ่งค่าความเป็นกรด-เบสที่อยู่ในระดับต่ำตลอดการทดลอง ส่งผลให้ปริมาณแก๊สที่ผลิตได้ในแต่ละวันมีค่าน้อย จากภาพ (b) พบว่าในช่วงวันที่ 9 ค่าความเป็นกรด-เบส เริ่มเพิ่มขึ้น ปริมาณแก๊สที่ผลิตได้ก็มีปริมาณมากขึ้น และเมื่อค่าความเป็นกรด-เบส ลดลงในวันที่ 15 ปริมาณแก๊สที่ผลิตได้ก็มีปริมาณลดลง



ภาพประกอบ 11 ความสัมพันธ์ของค่าซีโอดี และปริมาณแก๊สรายวัน ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)

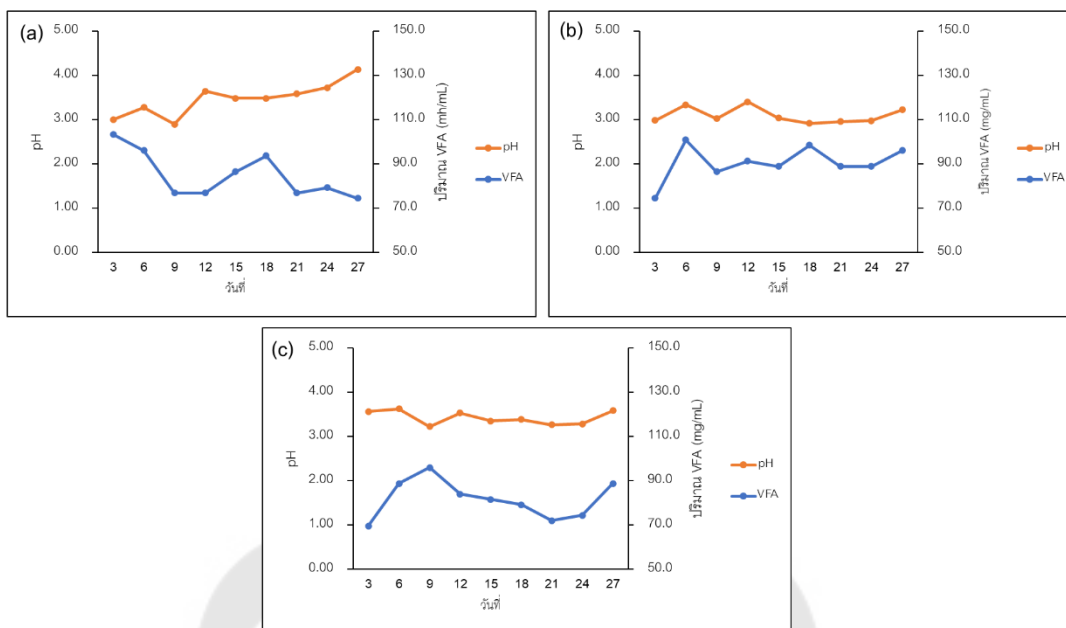
จากภาพประกอบ 11 พบว่าความสัมพันธ์ของค่าซีโอดีและปริมาณแก๊สรายวัน ในวันที่ 12, 15 ของภาวะการทดลองทั้ง 3 มีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ ค่าซีโอดีเพิ่มขึ้นอย่างมาก ในช่วงวันที่ 12 และลดลงอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 3 วันต่อมา เนื่องจากสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำ ถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของแก๊สชีวภาพ ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณแก๊สรายวันในวันที่ 15 ก็สูงขึ้น เช่นเดียวกัน กล่าวคือจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการไฮโดรลิซิส (hydrolysis) ซึ่งเป็นปฏิกิริยา ที่เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เป็นสารโมเลกุล ขนาดเล็ก เจริญได้ในภาวะดังกล่าว และย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปที่จุลินทรีย์ผลิตแก๊ส สามารถนำไปใช้ได้



ภาพประกอบ 12 ความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย และปริมาณแอมโมเนียวัน
ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)

จากภาพประกอบ 12 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย และปริมาณแอมโมเนียวัน ในระยะเวลาการทดลอง 28 วัน พบว่าภาวะการทำงานที่ 10 ในช่วงวันที่ 12 - 18 ค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่ายสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณแอมโมเนียวันเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงในช่วงวันที่ 9 - 12 ของภาวะการทำงานที่ 16

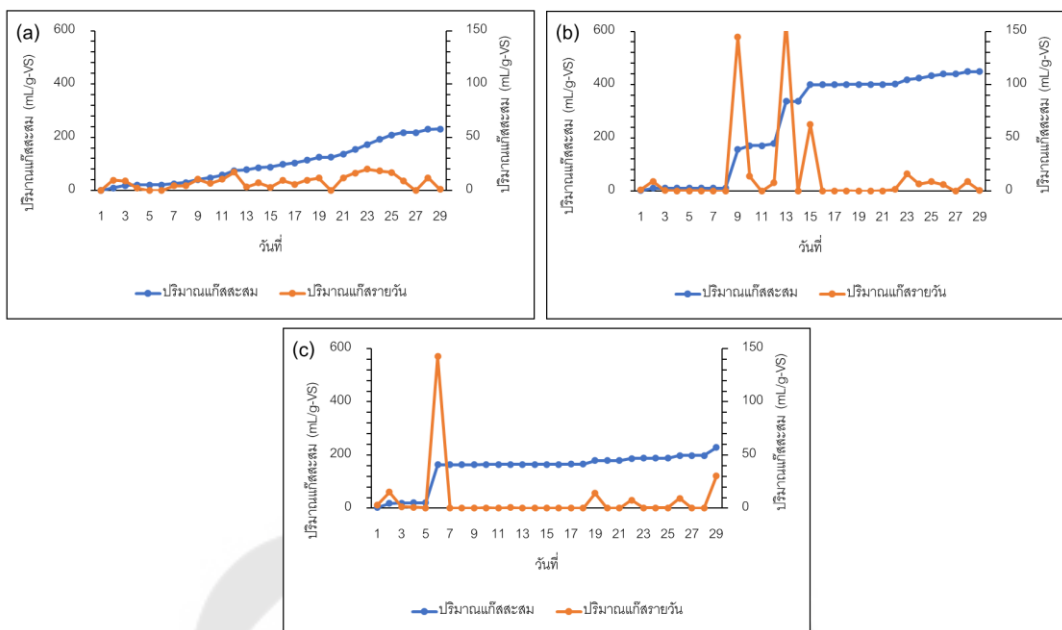
สำหรับภาวะการทำงานที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย และปริมาณแอมโมเนียวันไม่สอดคล้องกัน ในช่วงวันที่ 6 - 9 ค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่ายสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณแอมโมเนียวันลดลง



ภาพประกอบ 13 ความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-เบส และค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)

จากภาพประกอบ 13 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-เบส และค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย พบว่าที่ภาวะการทำงานที่ 10 16 และ 18 การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-เบสมากนัก โดยค่าความเป็นกรด-เบสตลอดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 3 – 4

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ เช่น ในวันที่ 9 ของภาวะการทำงานที่ 18 ค่าความเป็นกรด-เบสลดลง เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับในวันที่ 18 ของภาวะการทำงานที่ 10 และ 16

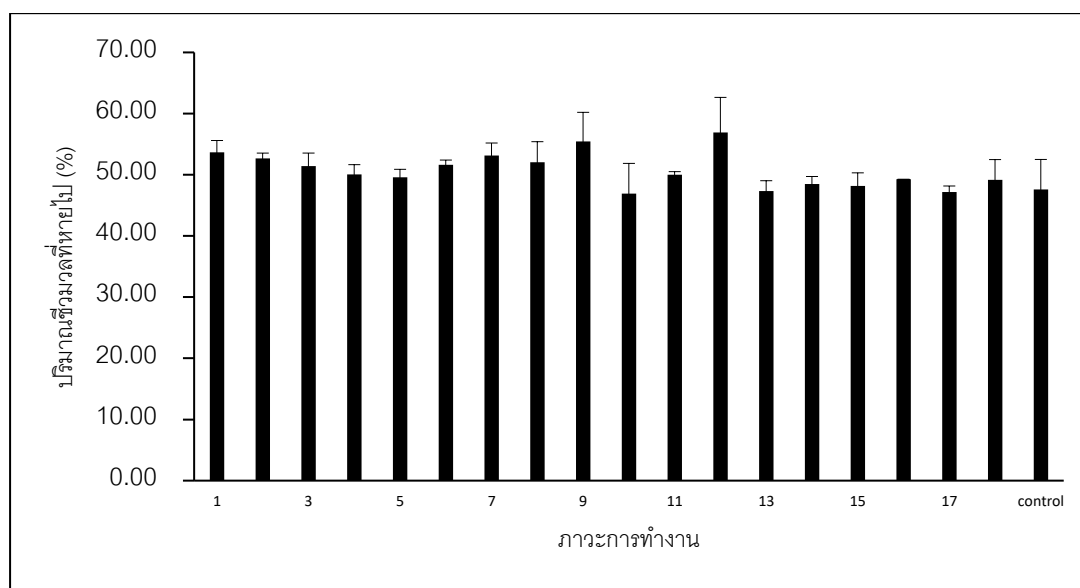


ภาพประกอบ 14 ความสัมพันธ์ของปริมาณแก๊สสะสม และปริมาณแก๊สรายวัน ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c)

จากภาพประกอบ 14 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณแก๊สสะสม และปริมาณแก๊สรายวัน ในภาวะการทำงานที่ 10 (a) 16 (b) และ 18 (c) ในระยะเวลาการทดลอง 28 วัน พบว่าทั้ง 3 ภาวะการทำงานที่ใช้จุลินทรีย์กลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 มีการผลิตแก๊สแตกต่างกัน โดยภาวะการทำงานที่ 10 คือการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ปริมาณ 25 %v/v ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการผลิตแก๊สรายวันสม่ำเสมอ แต่อัตราการผลิตต่ำ ทำให้ปริมาณแก๊สสะสมน้อยกว่าภาวะการทำงานที่ 16 และ 18 ที่ผลิตแก๊สไม่ต่อเนื่อง แต่สามารถผลิตได้ในปริมาณมากต่อครั้ง จึงมีปริมาณแก๊สสะสมสูงกว่า

ปริมาณชีวมวลที่หายไป (biomass weight loss)

ความสามารถของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 และ Br-8 ในการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง สามารถวัดได้ด้วยค่าร้อยละของปริมาณชีวมวลที่หายไป (biomass weight loss)



ภาพประกอบ 15 ร้อยละของปริมาณชีวมวลที่หายไปของภาวะการทำงานต่าง ๆ

ค่าในภาพแสดง $\bar{X} \pm SD$ ที่มาจากการทดลอง 2 ซ้ำในภาวะเดียวกัน วิเคราะห์สถิติทดสอบของครัสคอล-วอลลิส ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากภาพประกอบ 15 ร้อยละของปริมาณชีวมวลที่หายไปของภาวะการทำงานต่าง ๆ พบว่าไม่แตกต่างกัน ($\chi^2 = 28.445$, $df = 18$, $p = 0.056$) ปริมาณชีวมวลที่หายไปมีค่าอยู่ระหว่าง 46.94 % – 56.92 % โดยกลุ่มจุลินทรีย์จะสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นในภาวะการทำงานที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส โดยภาวะการทำงานที่ดีที่สุดในการทดลองนี้คือ ภาวะการทำงานที่ 12 ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ย่อยสลายกากมันสำปะหลังได้ 56.92 ± 5.73 % รองลงมาคือ ภาวะการทำงานที่ 9 กลุ่มจุลินทรีย์ Br-8 ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลังได้ 55.47 ± 4.74 % และภาวะการทำงานที่ 1 กลุ่มจุลินทรีย์ Br-8 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลังได้ 53.67 ± 1.93 % ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ความล้มเหลวของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังเกิดขึ้น เนื่องจากการสูญเสียจุลินทรีย์จากการปล่อยน้ำทิ้งปริมาณมากเกินไป การแก้ปัญหาโดยการซื้อหัวเชื้อทางการค้ามาเติมเข้าสู่ระบบใช้เวลานานในการทำงาน และค่าใช้จ่ายสูง งานวิจัยนี้จึงคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลังและน้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสีย ที่สามารถปรับตัวและเจริญได้เร็ว รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังและผลิตแก๊สชีวภาพ โดยทำการศึกษาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการทดลอง และคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลัง และน้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสีย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium และ peptone cellulose solution ที่มีฟางข้าว และกากมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ได้กลุ่มจุลินทรีย์ 32 กลุ่ม จากนั้นเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ทั้ง 32 กลุ่ม เพื่อเก็บเกี่ยวเอโนไซม์อย่างหายาบ และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง และประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ เพื่อคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง และสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ Pr-7 ย่อยกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงที่สุด และกลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ผลิตแก๊สชีวภาพได้มากที่สุด เท่ากับ 357.37 mL/g-VS จากนั้นนำกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สชีวภาพ ซึ่งในแต่ละภาวะการทำงานมีความแตกต่างกันที่อุณหภูมิ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ และชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ จากนั้นติดตามบันทึกผลปริมาณแก๊สชีวภาพสะสม ค่าความเป็นกรด-เบส ค่าซีไอดี และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ปริมาณ 25% v/v ที่ทำงานในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลิตแก๊สชีวภาพได้มากที่สุด เท่ากับ 448.82 mL/g-VS

อภิปรายผลการวิจัย

องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบหลักในกากมันสำปะหลัง คือ แป้ง ในงานวิจัยนี้พบแป้งประมาณร้อยละ 42 ซึ่งน้อยกว่างานวิจัยอื่น ๆ ที่พบอยู่ในช่วงร้อยละ 60 – 65 (Djuma'ali et al., 2012; Okudoh et al., 2014; Rattanachomsri et al., 2009) ซึ่งในอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง คือ ส่วนที่เป็นหัวมันสำปะหลังหลังจากผ่านการคั้นเพื่อเอาน้ำแป้งออกไป

หากพบปริมาณแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่น้อย แสดงว่ากระบวนการสกัดแป้งมันสำปะหลัง มีประสิทธิภาพ (Mathong, 2011) นอกจากนี้สายพันธุ์ของมันสำปะหลัง สถานที่เพาะปลูก และช่วงเวลาในการปลูกก็ส่งผลต่อปริมาณแป้งที่พบ (Janket et al., 2018) ดังนั้นปริมาณแป้ง ในกากมันสำปะหลังของแต่ละงานวิจัยจึงแตกต่างกัน สำหรับปริมาณของแข็งในกากมันสำปะหลัง ที่ใช้ในการทดลอง พบปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 14.96 ± 0.10 ซึ่งเป็นน้ำหนักภายหลัง การอบแห้ง แสดงว่ากากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองมีความชื้นสูง มีน้ำเป็นองค์ประกอบมาก

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่พบในกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลอง พบปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 40.10% และปริมาณไนโตรเจน 0.25% สอดคล้องกับงานวิจัย ของ Okudoh et al. (2014) ที่ตรวจสอบปริมาณธาตุในกากมันสำปะหลังและพบปริมาณคาร์บอน เท่ากับ 40% และปริมาณไนโตรเจน 0.46%

สำหรับการทดลองเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในงานวิจัยอื่น พบปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 8 – 15 เฮมิเซลลูโลส ร้อยละ 2 – 4 และลิกนิน ร้อยละ 2 (Djuma'ali et al., 2012; Rattanachomsri et al., 2009) กล่าวคือพบปริมาณเซลลูโลส มากที่สุด รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามลำดับสำหรับการทดลองนี้ พบปริมาณ เซลลูโลสสูงถึงร้อยละ 84.93 สำหรับลิกนิน พบในปริมาณร้อยละ 10.83 และเฮมิเซลลูโลส พบในปริมาณน้อยที่สุด เพียงร้อยละ 0.50 โดยปริมาณเซลลูโลสที่พบมากที่สุด และพบมากกว่า งานวิจัยของ Djuma'ali et al. (2012) ถึง 10 เท่า เนื่องจากในงานวิจัยดังกล่าววิเคราะห์ปริมาณ เซลลูโลสจากตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ α -amylase เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เซลลูโลสบางส่วนจึงถูกย่อยสลายไป สำหรับปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่พบน้อยที่สุดนั้นเนื่องจาก ในการทดลองวิเคราะห์ด้วยวิธี detergent fiber analysis ซึ่งใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 72 – 98% ในการย่อยสลายตัวอย่าง เฮมิเซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์แบบสายสั้นที่ผูกกับเซลลูโลส ในผนังเซลล์พืช (Lucenius, Valle-Delgado, Parikka, & Österberg, 2019) จึงถูกย่อยได้ง่ายด้วย กรด เป็นผลให้พบในปริมาณต่ำ

การเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อเก็บเกี่ยวเอนไซม์

การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลัง และน้ำเสียจากบ่อบำบัด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ทำให้ได้กลุ่มจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 32 กลุ่ม ซึ่งผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน และการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อย สลายสารตั้งต้นชนิดเดียวกันของเอนไซม์แต่ละตัวอย่างที่พบค่าแตกต่างกัน เป็นการยืนยัน ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้เป็นจุลินทรีย์คนละกลุ่ม

ความเข้มข้นของโปรตีนจากเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) และการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตั้งต้นของเอนไซม์

เนื่องจากการวิจัยต้องการกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง จึงทำการเพาะเลี้ยงกลุ่มจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน เพื่อเก็บตัวอย่างเอนไซม์อย่างหยาบมาตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีน และวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้น จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น กลุ่มจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone cellulose solution (PCS) ผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากกว่ากลุ่มจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PCS มี peptone เป็นองค์ประกอบ จุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์ออกมาอยู่ภายนอกเซลล์ และนำสารอาหารที่ย่อยสลายได้ มาใช้ในการเจริญ ดังนั้นแหล่งอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง กลุ่มจุลินทรีย์จึงสามารถนำไนโตรเจนมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ของตนเองได้มาก นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ก็ส่งผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ เช่น เอนไซม์ที่ผลิตจากกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-1 มีความเข้มข้นโปรตีน 2.608 ± 0.022 mg/mL ในขณะที่เอนไซม์ที่ผลิตจากกลุ่มจุลินทรีย์ Pc-1 มีความเข้มข้นโปรตีน 0.263 ± 0.005 mg/mL ผลการวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ (Ashwini, Gaurav, Karthik, & Bhaskara Rao, 2011; Singh et al., 2012; Wang et al., 2016) เนื่องจากฟางข้าวพบเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 32 – 47 (Iqbal, Kyazze, & Keshavarz, 2013; Kitsubthawee, Cheenkachorn, Chuetor, Rattanaporn, & Sriariyanun, 2019) และไม่พบแป้ง ในขณะที่กากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองพบแป้งร้อยละ 42 และเซลลูโลสร้อยละ 84 ดังนั้นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน จึงมีแนวโน้มที่จะผลิตทั้งเอนไซม์อะไมเลส และเซลลูเลส ในขณะที่กลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนจึงสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่า

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสารตั้งต้นแต่ละชนิดได้ดี เป็นกลุ่มจุลินทรีย์คนละชนิด เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม สามารถผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกัน และสารตั้งต้นแต่ละตัวมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันด้วย เช่น สารตั้งต้น CMC ถูกย่อยสลายและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณมากที่สุด จากเอนไซม์ของกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6 โดย CMC เป็นสารที่ใช้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (Lynd, Weimer, van Zyl, & Pretorius, 2002) ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6 มีเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ CMC-zymogram เพื่อยืนยัน

ว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากกลุ่มจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส พบว่าหลังจากใส่เอนไซม์จากกลุ่มจุลินทรีย์ Pr-6 เกิดบริเวณโซนใส (clear zone) ขึ้นบนแผ่นเจล SDS ที่มีส่วนผสมของ CMC เนื่องจากสาร CMC ถูกย่อย และไม่มีสาร CMC ที่จะดูดซึ่มสีแดงของ Congo red บริเวณดังกล่าวจึงเห็นเป็นโซนใส (Johnsen & Krause, 2014)

ภาวะการทำงานที่เหมาะสมของกลุ่มจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพ

การทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ในการผลิตแก๊สชีวภาพต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ในการทดลองจะเห็นได้ว่าสภาวะที่ใช้ในการหมักแก๊สชีวภาพ มีผลต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ รวมถึงปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ สำหรับตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ คือ ปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ค่าซีไอดี และปริมาณชีวมวลที่หายไป เนื่องจากระหว่างกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพจะเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น (Tampio et al., 2019) โดยปริมาณของกรดอินทรีย์ และสารที่ละลายน้ำส่งผลต่อค่าความเป็นกรด-เบส และค่าซีไอดี ดังนั้นดัชนีเหล่านี้จึงเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพที่ดี

สำหรับค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นในการทดลอง มีค่าเท่ากับ 7 เนื่องจากอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ คือ 6.5 – 8 (Witarsa & Lansing, 2014) จากนั้นค่าความเป็นกรด-เบสลดลงอย่างรวดเร็ว อยู่ในช่วง 3 – 4 ซึ่งข้อมูลจาก Dobre, Nicolae, and Matei (2014) ระบุว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-เบสลดลงต่ำกว่า 6 กระบวนการสร้างแก๊สมีเทนจะถูกยับยั้ง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zhang et al. (2011) ซึ่งทำการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตแก๊สมีเทนจากกากมันสำปะหลังด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ ได้มีการรักษาค่าความเป็นกรด-เบสให้อยู่ที่ 7.2 ตลอดการทดลองด้วยการใช้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ในขณะที่งานวิจัยนี้ค่าความเป็นกรด-เบสตลอดช่วงการทดลองจะอยู่ในช่วง 3 – 4

สาเหตุการลดลงของค่าความเป็นกรด-เบส ที่เกิดขึ้นตั้งแต่ในช่วงแรกของการทดลองนั้น สามารถอธิบายได้ด้วยขั้นตอนของกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ (Okudoh et al., 2014) เนื่องจากเกิดกระบวนการไฮโดรลิซิส กลุ่มจุลินทรีย์ในขบวนการหมัก เจริญและปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยกากมันสำปะหลัง เมื่อกากมันสำปะหลังถูกย่อยสลายเป็นสารโมเลกุลเล็ก สารดังกล่าวถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างกรดหรือเอซิโดเจเนซิส ปริมาณกรดอินทรีย์ในระบบจึงเพิ่มมากขึ้น ค่าความเป็นกรด-เบสจึงลดลง

สำหรับค่าซีไอดี มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารในกระบวนการไฮโดรลิซิส สามารถย่อยกากมันสำปะหลัง ให้เป็นสารโมเลกุลเล็ก ละลายอยู่ในน้ำ เมื่อตรวจวัดค่าซีไอดี จึงพบค่าซีไอดีในปริมาณสูง เช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในขั้นตอนแอสซิโดเจเนซิส ใช้สารโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาลกลูโคส ที่ผลิตได้จากกระบวนการไฮโดรลิซิสเป็นสารตั้งต้น ในการผลิตกรดอินทรีย์ (Okudoh et al., 2014)

จากการเพิ่มขึ้นของค่าซีไอดี และค่าความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย แสดงให้เห็นว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการทดลอง ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อย่อยกากมันสำปะหลัง อีกทั้งจุลินทรีย์กลุ่มแอสซิโดเจนิคแบคทีเรีย ที่ย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนไฮโดรลิซิส ได้กรดอินทรีย์

สำหรับการหาภาวะการทำงานที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ ได้ใช้กากมันสำปะหลัง และมูลสัตว์เป็นวัตถุดิบในการหมักแก๊สชีวภาพ และเติม peptone เพื่อปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพ ทั้งนี้มูลสัตว์สามารถช่วยปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้ด้วย (Dobre et al., 2014; Ofoefule & Uzodinma, 2009) เนื่องจากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองมีค่า 40.10 : 0.25 ทำให้ในการวิจัยช่วงแรกที่ใช้กากมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียวในการหมักแก๊สชีวภาพ ระบบจึงล้มเหลว โดยงานวิจัยของ Ofoefule and Uzodinma (2009) ศึกษาการผลิตแก๊สชีวภาพจากเปลือกมันสำปะหลังร่วมกับมูลสัตว์ชนิดต่าง ๆ พบว่าการหมักร่วมให้ปริมาณแก๊สชีวภาพสูงกว่า การหมักโดยใช้เปลือกมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเพียงอย่างเดียว และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับผลิตแก๊สชีวภาพมีค่าเท่ากับ 25 ซึ่งพบในการหมักร่วมกันระหว่างเปลือกมันสำปะหลังและมูลสุกร ดังนั้นในการหมักแก๊สชีวภาพ จึงมีการใส่มูลสัตว์ได้แก่ มูลวัว เพื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์

งานวิจัยครั้งนี้ใช้กากมันสำปะหลัง และมูลสัตว์เป็นวัตถุดิบในการหมักแก๊สชีวภาพ มีปริมาณแก๊สชีวภาพมากกว่างานวิจัยของ Anunputtikul and Rodtong (2007) ที่ใช้สารตั้งต้นเป็นมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียวถึง 28 เท่า และมากกว่างานวิจัยของ Zhang et al. (2011) ที่ใช้กากมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นเพียงอย่างเดียวถึง 17 เท่า

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลที่หายไป จากการย่อยสลายของกลุ่มจุลินทรีย์ พบว่าการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ปริมาณ 75 %v/v ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลาย

กากมันสำปะหลังได้ดีที่สุด ปริมาณชีวมวลที่หายไป เท่ากับร้อยละ 56.92 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Br-8 ปริมาณเท่ากัน ที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่ามีปริมาณชีวมวลที่หายไปเพียงร้อยละ 51.40 เท่านั้น เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำหมักเซลล์แห้ง พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Pc-8 มีปริมาณมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Br-8

สำหรับปัจจัยเรื่องอุณหภูมิในการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้กลุ่มจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน ปริมาณเท่ากัน แต่ทำงานที่คนละอุณหภูมิ ระยะเวลาในการเริ่มผลิตแก๊สชีวภาพจะแตกต่างกัน ยกตัวอย่าง ภาวะการทำงานที่ 16 และ 18 ซึ่งใช้กลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าภาวะการทำงานที่ 16 ใช้ระยะเวลา 7 วัน ในการเริ่มผลิตแก๊ส ในขณะที่ภาวะการทำงานที่ 18 ใช้ระยะเวลาเพียง 4 วัน และภาวะการทำงานที่ 18 นี้ให้ปริมาณแก๊สชีวภาพ สูงสุดอีกด้วย เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์ Pc-8 ดั้งเดิม มีที่มาจากกากมันสำปะหลังที่ถูกบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่อนำมาใช้งานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงสามารถทำหน้าที่ย่อยสลายกากมันสำปะหลัง และผลิตแก๊สชีวภาพได้ดี งานวิจัยของ Promphiphak (2012) ทดลองหาหัวเชื้อจุลินทรีย์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง โดยทำการคัดเลือกหัวเชื้อจากฟาร์มสุกร ฟาร์มวัว และโรงงานแปรงมันสำปะหลัง พบว่าหัวเชื้อจากโรงงานแปรงมันสำปะหลัง สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ปริมาณมากที่สุด โดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีในพื้นที่นั้น (indigenous) สามารถช่วยให้การผลิตแก๊สชีวภาพมีประสิทธิภาพ

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพจากกากมันสำปะหลัง ด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะสำหรับการนำผลการวิจัยไปใช้ และสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป ดังนี้

1. เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ สามารถใช้ภาวะดังกล่าวออกแบบการทดลองในขั้นต่อไปเพื่อตรวจสอบความคงที่ (stability) ในกระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพได้
2. อาจลดช่วงห่างของอุณหภูมิที่ทำการทดลองให้น้อยลง เพื่อหาอุณหภูมิที่กลุ่มจุลินทรีย์สามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ และประหยัดพลังงานในการรักษาระดับอุณหภูมิ

3. เพิ่มเติมการศึกษาดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพของการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ เช่น ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) องค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ อัตราการผลิตแก๊สมีเทน

4. เพิ่มเติมการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง เพื่อให้ทราบชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำงานภายในระบบหมักแก๊สชีวภาพ ซึ่งช่วยให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับกลุ่มจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น



บรรณานุกรม

- Adelekan, B. A., & Bamgboye, A. I. (2009). Comparison of biogas productivity of cassava peels mixed in selected ratios with major livestock waste types. *African Journal of Agricultural Research*, 4(7), 571-577.
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675-685.
- Ahring, B. K. (2003). *Perspectives for anaerobic digestion*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., & Ahmad Asad, S. (2014). Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, 2014, 183752.
- Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768-778.
- Anukam, A., Mohammadi, A., Naqvi, M., & Granström, K. (2019). A Review of the chemistry of anaerobic digestion: methods of accelerating and optimizing process efficiency. *Processes*, 7(8), 504.
- Anunputtikul, W., & Rodtong, S. (2007). Laboratory scale experiments for biogas production from cassava tubers. *Asian Journal on Energy and Environment*, 8(1), 444-453.
- Ashwini, K., Gaurav, K., Karthik, L., & Bhaskara Rao, K. V. (2011). Optimization, production and partial purification of extracellular α -amylase from *Bacillus sp. marini*. *Archives of Applied Science Research*, 3(1), 33-42.
- Balat, M., & Balat, H. (2009). Biogas as a renewable energy source-a review. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 31, 1280-1293.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 483-489.
- Cavinato, C., Frison, N., Herrero, N. M., Gottardo, M., Ros, C. D., Strazzera, G., . . . Bolzonella, D. (2017). *Volatile fatty acids production from organic waste for biorefinery platforms*. Paper presented at the 5th International Conference on Sustainable Solid Waste Management.
- Chae, K. J., Jang, A. M., Yim, S. K., & Kim, I. S. (2008). The effects of digestion temperature and temperature shock on the biogas yields from the mesophilic anaerobic digestion of swine manure. *Bioresource Technology*, 99(1), 1-6.
- Coulon, F., & Villa, R. (2011). *Anaerobic digestion of waste*. Paper presented at the workshop on anaerobic digestion. University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa: Cranefield University (UK).
- Djuma'ali, Soewarno, N., Sumarno, S., Primarini, D., & Sumaryono, W. (2012). Cassava pulp as a biofuel feedstock of an enzymatic hydrolysis process. *MAKARA of Technology Series*, 15(2), 183-192.
- Dobre, P., Nicolae, F., & Matei, F. (2014). Main factors affecting biogas production-an overview. *Romanian Biotechnological Letters*, 19, 9283-9296.
- Drosg, B. (2013). *Process monitoring in biogas plants*: IEA Bioenergy Paris, France.
- Fannin, K. F., & Biljetina, R. (1987). *Reactor designs*. London, England: Elsevier Applied Science.
- Iqbal, H., Kyazze, G., & Keshavarz, T. (2013). Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. *BioResources*, 8(2), 3157-3176.
- Janket, A., Vorasoot, N., Toomsan, B., Kaewpradit, W., Banternng, P., Kesmala, T., . . . Jogloy, S. (2018). Seasonal variation in starch accumulation and starch granule size in cassava genotypes in a tropical savanna climate. *Agronomy*, 8(12), 297.
- Johnsen, H. R., & Krause, K. (2014). Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 830-838.

- Kappell, A. D., Carey, D. E., Zitomer, D. H., & McNamara, P. J. (2020). Effect of antimicrobial washout from anaerobic digesters on microbial community composition. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 6(6), 1658-1671.
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., & Dawson, L. (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, 31(8), 1737-1744.
- Kitsubthawee, K., Cheenkachorn, K., Chuetor, S., Rattanaporn, K., & Sriariyanun, M. (2019). Characterizations of lignocellulose waxes and study of their effects on enzymatic saccharification for biofuel production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 346, 12005.
- Kosugi, A., Kondo, A., Ueda, M., Murata, Y., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., . . . Mori, Y. (2009). Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase. *Renewable Energy*, 34(5), 1354-1358.
- Kovacs, K., Ács, N., Kovács, E., Wirth, R., Rákhely, G., Strang, O., . . . Bagi, Z. (2013). Improvement of biogas production by bioaugmentation. *BioMed Research International*, 2013, 482653.
- Krakat, N., Schmidt, S., & Scherer, P. (2010). Mesophilic fermentation of renewable biomass: does hydraulic retention time regulate methanogen diversity?. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6322-6326.
- Laemmli, U. K. (1970). SDS-PAGE Laemmli method. *Nature*, 227, 680-685.
- Lawrenz, D. A., & Mitchell, J. (2006). Thermal evolution methods for carbon, sulfur, oxygen, nitrogen and hydrogen in iron and steel analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-19. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470027318.a2414>
- Lee, D.-J., Show, K.-Y., & Wang, A. (2013). Unconventional approaches to isolation and enrichment of functional microbial consortium-a review. *Bioresource Technology*, 136, 697-706.
- Li, X., Liu, Y. H., Zhang, X., Ge, C. M., Piao, R. Z., Wang, W. D., . . . Zhao, H. Y. (2017).

- Evaluation of biogas production performance and dynamics of the microbial community in different straws. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 524-534.
- Lucenius, J., Valle-Delgado, J. J., Parikka, K., & Österberg, M. (2019). Understanding hemicellulose-cellulose interactions in cellulose nanofibril-based composites. *Journal of Colloid and Interface Science*, 555, 104-114.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577.
- Mao, C., Zhang, T., Wang, X., Feng, Y., Ren, G., & Yang, G. (2017). Process performance and methane production optimizing of anaerobic co-digestion of swine manure and corn straw. *Scientific Reports*, 7(1), 1-9.
- Mathong, Y. (2011). *Utilization of cassava peel and pulp for biogas production*. (Doctoral dissertation, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand). Retrieved from <https://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/55736>
- McCleary, B. V., Charmier, L. M., & McKie, V. A. (2019). Measurement of Starch: Critical Evaluation of Current Methodology. *Starch-Stärke*, 71(1-2), 1800146.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Ofoefule, A. U., & Uzodinma, E. O. (2009). Biogas production from blends of cassava (*Manihot utilissima*) peels with some animal wastes. *International Journal of Physical Sciences*, 4(7), 398-402.
- Okudoh, V., Trois, C., Workneh, T., & Schmidt, S. (2014). The potential of cassava biomass and applicable technologies for sustainable biogas production in South Africa: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 1035-1052.
- Ordaz-Díaz, L. A., Rojas-Contreras, J. A., Flores-Vichi, F., Flores-Villegas, M. Y., Álvarez-Álvarez, C., Velasco-Vázquez, P., & Bailón-Salas, A. M. (2016). Quantification of endoglucanase activity based on carboxymethyl cellulose in four fungi isolated from an aerated lagoon in a pulp and paper mill. *BioResources*, 11(3), 7781-7789.

- Orhorhoro, E. K., Ebunilo, P. O., & Sadjere, E. (2017). Experimental determination of effect of total solid (TS) and volatile solid (VS) on biogas yield. *American Journal of Modern Energy*, 3(6), 131-135.
- Parawira, W. (2011). Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32, 172-186.
- Parawira, W., & Tekere, M. (2011). Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(1), 20-31.
- Pawongrat, R. (2015). Potential and utilization of lignocellulose agricultural waste materials for biogas production. *Pathumwan Academic Journal*, 5(14), 67-78.
- Poszytek, K., Ciezkowska, M., Sklodowska, A., & Drewniak, L. (2016). Microbial consortium with high cellulolytic activity (MCHCA) for enhanced biogas production. *Frontiers in Microbiology*, 7(324), 1-11.
- Promphiphak, P. (2012). *Biogas production by using cassava waste cake from the production of cassava starch*. (Master's thesis, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand). Retrieved from <http://newtdc.thailis.or.th/docview.aspx?tdcid=245858>
- Rabii, A., Aldin, S., Dahman, Y., & Elbeshbishy, E. (2019). A review on anaerobic co-digestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration. *Energies*, 12, 1106.
- Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., & Champreda, V. (2009). Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(5), 488-493.
- Rodriguez, C., Alaswad, A., Benyounis, K., & Olabi, A. G. (2017). Pretreatment techniques used in biogas production from grass. *Renewable and sustainable energy reviews*, 68, 1193-1204.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 262-280.
- Siedlecka, E. M., Kumirska, J., Ossowski, T., Glamowski, P., Golebiowski, M., Gajdus, J., .

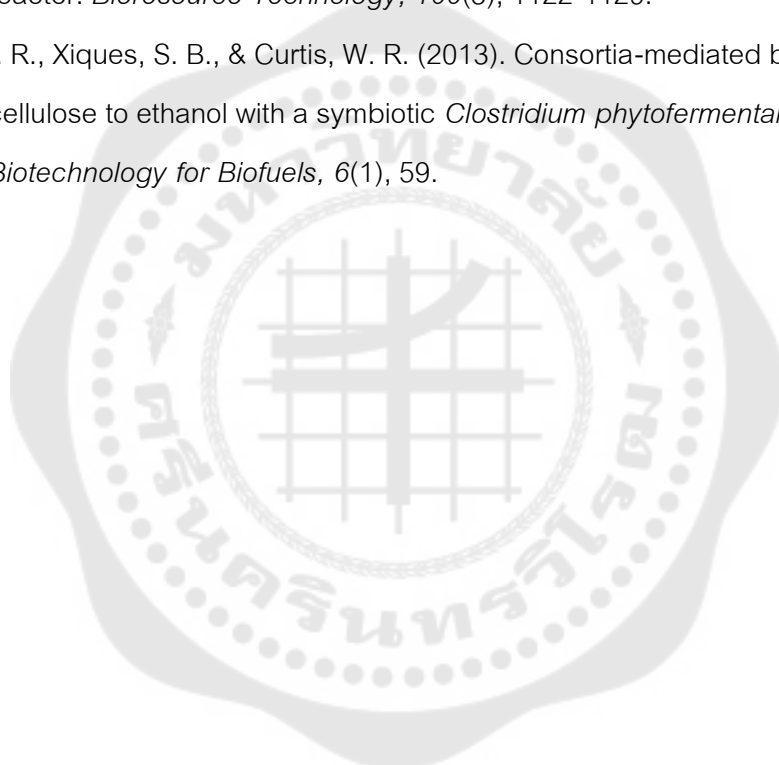
- . . Stepnowski, P. (2008). Determination of volatile fatty acids in environmental aqueous samples. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17(3), 351-356.
- Singh, S., Bose, H., Richa, K., Loganathan, K., Kumar, G., & Rao, B. (2012). Isolation and characterization of protease producing marine eubacteria. *Journal of Agricultural Technology*, 4(6), 591-598.
- Sirianuntapiboon, S. (2014). *Wastewater treatment system*: Bangkok : Top Publishing.
- Soest, P. V., & Wine, R. H. (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 50(1), 50-55.
- Suntronsopa, K. (2008). *Using pulp powder for granulation of sludge in UASB reactor*. (Doctoral dissertation, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand). Retrieved from <https://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/19506>
- Tampio, E. A., Blasco, L., Vainio, M. M., Kahala, M. M., & Rasi, S. E. (2019). Volatile fatty acids (VFAs) and methane from food waste and cow slurry: comparison of biogas and VFA fermentation processes. *GCB Bioenergy*, 11(1), 72-84.
- Tuesorn, S., Wongwilaiwalin, S., Champreda, V., Leethochawalit, M., Nopharatana, A., Techkarnjanaruk, S., & Chaiprasert, P. (2013). Enhancement of biogas production from swine manure by a lignocellulolytic microbial consortium. *Bioresource Technology*, 144, 579-586.
- Wang, F., Ai, M., Yang, G., Chen, J., Chen, X., & Huang, F. (2016). Influence of carbon source on the production of extracellular ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *BioResources*, 11(3), 5676-5686.
- Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J., & Jones, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99(17), 7928-7940.
- Witarsa, F., & Lansing, S. (2014). Quantifying methane production from psychrophilic anaerobic digestion of separated and unseparated dairy manure. *Ecological Engineering*, 78, 95-100.
- Yan, L., Gao, Y., Wang, Y., Liu, Q., Sun, Z., Fu, B., . . . Wang, W. (2012). Diversity of a

mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresource Technology*, 111, 49-54.

Zhang, Q., He, J., Tian, M., Mao, Z., Tang, L., Zhang, J., & Zhang, H. (2011). Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. *Bioresource Technology*, 102(19), 8899-8906.

Zhu, B., Gikas, P., Zhang, R., Lord, J., Jenkins, B., & Li, X. (2009). Characteristics and biogas production potential of municipal solid wastes pretreated with a rotary drum reactor. *Bioresource Technology*, 100(3), 1122-1129.

Zuroff, T. R., Xiques, S. B., & Curtis, W. R. (2013). Consortia-mediated bioprocessing of cellulose to ethanol with a symbiotic *Clostridium phytofermentans*/yeast co-culture. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 59.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1. วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของเส้นใยในพืช

1.1 วิธีการวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF)

1. อบด้วยครุชชีเบลขนาด 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น จึงชั่งน้ำหนักและบันทึกผล
2. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย NDF 50 มิลลิลิตร นำไปต้ม 1 ชั่วโมง
3. เทสารละลายในบีกเกอร์ลงในถ้วยครุชชีเบลที่ชั่งน้ำหนักแล้วเพื่อกรองสารตัวอย่าง
4. ล้างตัวอย่างในถ้วยครุชชีเบลด้วยน้ำกลั่นต้มจนหมดฟอง และล้างตัวอย่างด้วย acetone 3 – 5 ครั้ง
5. นำถ้วยครุชชีเบลที่มีตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น จึงชั่งน้ำหนักและบันทึกผล
6. นำถ้วยครุชชีเบลในข้อที่ 5 มาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักเถ้า (ash) และบันทึกผล

1.2 วิธีการวิเคราะห์หา Acid Detergent Fiber (ADF)

1. อบด้วยครุชชีเบลขนาด 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น จึงชั่งน้ำหนักและบันทึกผล
2. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ADF 50 มิลลิลิตร นำไปต้ม 1 ชั่วโมง
3. เทสารละลายในบีกเกอร์ลงในถ้วยครุชชีเบลที่ชั่งน้ำหนักแล้วเพื่อกรองสารตัวอย่าง
4. ล้างตัวอย่างในถ้วยครุชชีเบลด้วยน้ำกลั่นต้มจนหมดฟอง และล้างตัวอย่างด้วย acetone 3 – 5 ครั้ง
5. นำถ้วยครุชชีเบลที่มีตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น จึงชั่งน้ำหนักและบันทึกผล
6. นำถ้วยครุชชีเบลในข้อที่ 5 มาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักเถ้า (ash) และบันทึกผล

1.3 วิธีการวิเคราะห์หา Acid Detergent Lignin (ADL)

1. เติมสารละลาย 72% H_2SO_4 ในถ้วยครุชีเบิลที่มีสารตัวอย่างจากขั้นตอนการวิเคราะห์ ADF เพื่อย่อยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเติมสารละลายเป็นระยะ และใช้แท่งแก้วคนให้ตัวอย่างที่ทดสอบไม่จับตัวเป็นก้อน

2. ล้างตัวอย่างในถ้วยครุชีเบิลด้วยน้ำกลั่นต้มจนหมดฟอง

3. นำถ้วยครุชีเบิลที่มีตัวอย่างไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น จึงชั่งน้ำหนักและบันทึกผล

4. นำถ้วยครุชีเบิลในข้อที่ 5 ไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักเถ้า (ash) และบันทึกผล

2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

1. บดตัวอย่างให้ละเอียด และกรองด้วยตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร

2. ใส่ตัวอย่างที่บดแล้ว ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใน glass test tube ขนาด 16 x 22 มิลลิเมตร เคาะให้ตัวอย่างลงไปยังก้นหลอด

3. เติมเอทานอล 80% 0.2 มิลลิลิตร นำไป vortex ให้เข้ากัน

4. เติม thermostable α -amylase 3 มิลลิลิตร

5. จากนั้นนำมาต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที โดยเขย่าทุก ๆ 2, 4 และ 6 นาที เพื่อป้องกันการจับตัวเป็นตะกอน และป้องกันการระเหยไปพร้อมกับแอลกอฮอล์

6. เติม amyloglucosidase 330U จากนั้นนำไป vortex ให้เข้ากัน และต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

7. เทสารที่ได้ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร โดยใช้กรวยกรองและล้าง tube ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร และเขย่าให้เข้ากัน

8. ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper Whatman No.1) กรองเฉพาะส่วนใสมาใช้ ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

9. ดูดสารละลายที่ได้ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ย้ายลงอีก tube หนึ่ง

10. เติม GOPOD 3 มิลลิลิตร ในแต่ละ tube แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

11. วัดค่าการดูดกลืนแสง ของตัวอย่าง D-glucose control ที่ 510 nm เทียบกับ reagent blank

3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งในตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งในตัวอย่างน้ำ และกากตะกอน อาศัยวิธีการชั่งน้ำหนัก ซึ่งปริมาณของแข็งที่พบจะประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ของแข็งทั้งหมด (Total Solid, TS) หมายถึง สารที่เหลืออยู่ในภาชนะหลังจากระเหยน้ำออกจากตัวอย่าง ด้วยการนำไปอบแห้ง ประกอบด้วยของแข็งแขวนลอยทั้งหมด และของแข็งละลายทั้งหมด สำหรับของแข็งระเหยได้ (Volatile Solid, VS) หมายถึง ปริมาณของแข็งที่ระเหยไปได้เมื่อนำไปเผาที่ 550 องศาเซลเซียส

วิธีทำ

1. ล้างถ้วยครุชชีเบิล จากนั้นนำเข้าอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส overnight
2. นำถ้วยครุชชีเบิล เข้าโถดูดความชื้น รอเย็นจึงชั่งน้ำหนัก
3. ชั่งตัวอย่างกากมันสด 2 กรัม ใส่ถ้วยครุชชีเบิล
4. นำเข้าอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
5. นำถ้วยครุชชีเบิล เข้าโถดูดความชื้น รอเย็นจึงชั่งน้ำหนัก
6. เข้าอบต่อจนแห้ง (นำออกมาวัดทุก ๆ 2 ชั่วโมง)
7. นำถ้วยครุชชีเบิลไปเผาที่ 440 องศาเซลเซียส
8. นำถ้วยครุชชีเบิลเข้าโถดูดความชื้น รอเย็นจึงชั่งน้ำหนัก
9. กรอกรายละเอียดคำนวณค่าร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมด (%TS) และค่าร้อยละปริมาณของแข็งระเหยได้ (%VS)

วิธีคำนวณ

ค่าร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมด (%TS)

$$\%TS = \frac{W1 - W2}{W3 - W2} \times 100$$

W1 = weight of dried crucible + dried residue

W2 = weight of crucible

W3 = weight of wet sample + crucible

W4 = weight of crucible + weight of residue after ignition

ค่าร้อยละปริมาณของแข็งระเหยได้ (%VS)

$$\%VS = \frac{W1 - W4}{W1 - W2} \times 100$$

W1 = weight of dried crucible + dried residue

W2 = weight of crucible

W3 = weight of wet sample + crucible

W4 = weight of crucible + weight of residue after ignition

4. วิธีการวิเคราะห์ค่าซีไอดี โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด/การไทเทรต (Closed Reflux, Titrimetric Method)

1. ล้างหลอดวัด COD ที่ต้องการใช้ด้วยกรดซัลฟิวริก 20% เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์

2. บีบตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจสอบ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดวัด COD ที่เตรียมไว้ และบีบตลับน้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างใส่หลอดวัด COD 1 หลอด เพื่อใช้เป็น blank

3. เติมน้ำย่าย่อยสลายสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate digestion reagent) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และสารละลายกรดซัลฟิวริก (sulfuric reagent) ปริมาตร 14 มิลลิลิตร ลงในหลอดวัด COD และให้สังเกตสีของสารละลาย ดังต่อไปนี้

สีเขียว หมายถึง ปริมาณน้ำตัวอย่างน้อยเกินไป ต้องเพิ่มปริมาณที่ใช้อีก

สีเหลือง หมายถึง ปริมาณน้ำตัวอย่างเหมาะสม

สีเหลืองฟ้า หมายถึง ปริมาณน้ำตัวอย่างมากเกินไป ต้องเจือจางน้ำตัวอย่าง

4. ปิดฝาหลอดวัด COD และผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย

5. นำหลอดวัด COD ที่ใส่น้ำตัวอย่างและ blank เข้าเตาอบที่อุณหภูมิ 150 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6. เมื่อครบกำหนดเวลานำหลอดวัด COD ออกจากเตาอบ และนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเทสารละลายจากหลอดวัด COD ใส่ลงในบีกเกอร์ เพื่อนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) โดยใช้ ferroin indicator 2 – 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียว และเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ

7. อ่านปริมาตรที่ไทเทรตได้ และคำนวณตามสูตร ต่อไปนี้

$$COD, mg/L = \frac{(a - b) \times N \times 8000}{\text{volume of water sample}}$$

a = ปริมาตรของของสารละลาย FAS ที่ใช้ไทเทรต blank

b = ปริมาตรของของสารละลาย FAS ที่ใช้ไทเทรตน้ำตัวอย่าง

N = Normality ของสารละลาย FAS ที่ใช้

5. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย โดยวิธี distilled method

1. เปิดปริมาณน้ำตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 37 มิลลิลิตร

2. นำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 N โดยใช้สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 5 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสารละลายไม่มีสีเป็นสีชมพูอ่อนที่จุดยุติ

3. อ่านปริมาตรที่ไทเทรตได้ และคำนวณตามสูตร ต่อไปนี้

$$VFA, mg/L = \frac{\text{volume of NaOH} \times 0.1 \times 60,000}{\text{volume of water sample}}$$



ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth

ใน 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. Nutrient broth | 13 กรัม |
| 2. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ | 1,000 มิลลิลิตร |

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium

ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|---------------------------------------|---------------|
| 1. ฟางข้าว หรือ กากมันสำปะหลัง | 1% |
| 2. ไคโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) | 0.10% |
| 3. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) | 0.10% |
| 4. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) | 0.05% |
| 5. Yeast extract | 0.05% |
| 6. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ | 100 มิลลิลิตร |

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Peptone cellulose solution

ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|--|---------------|
| 1. ฟางข้าว หรือ กากมันสำปะหลัง | 0.50% |
| 2. Peptone | 0.05% |
| 3. Yeast extract | 0.10% |
| 4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 0.50% |
| 5. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) | 0.20% |
| 6. กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper Whatman No.1) | 0.50% |
| 7. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ | 100 มิลลิลิตร |

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนด้วย SDS-PAGE analysis

1. 12% gel SDS-PAGE

เจลที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย separating gel และ stacking gel โดยขั้นตอนการเตรียมแผ่นเจล ประกอบด้วย

1. ประกอบอุปกรณ์ในการเตรียมแผ่นเจล โดยทำความสะอาดแผ่นกระจก (glass plates) ที่วาง (casting stand) และกรอบวาง (casting frames) ให้สะอาด

2. ประกอบแผ่นกระจก 2 แผ่น และวางลงใน casting frame โดยวางแผ่นสั้น (short plate) ไว้ด้านหน้า casting frame ให้ปลายแผ่นกระจกทั้งสองเสมอกันเพื่อป้องกันการรั่ว

3. ประกอบอุปกรณ์ทั้งหมด วางบน casting stand และทดสอบการรั่วของกระจก โดยเติมน้ำกลั่นให้เต็มช่องว่างระหว่างกระจก ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้ามีการรั่วไหล น้ำในกระจกจะลดระดับลงมา ต้องทำการเตรียมอุปกรณ์ในการเตรียมแผ่นเจลใหม่

4. เตรียม separating gel โดยผสมสารเคมี ดังนี้

1. น้ำกลั่น	3.36 มิลลิลิตร
2. 40% acrylamide	2.40 มิลลิลิตร
3. 1.5M Tris, pH 8.8	2.08 มิลลิลิตร
4. 10% SDS	0.08 มิลลิลิตร
5. 10% Ammonium persulfate	0.15 มิลลิลิตร
6. TEMED	8 ไมโครลิตร

5. บีบเปิดส่วนของ separating gel ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของกระจก จากนั้นบีบเปิดน้ำกลั่นที่ผ่านการหนึ่งฆ่าเชื้อปิดหน้าเจล เพื่อไล่ฟองอากาศ รอประมาณ 20 – 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นเทน้ำออก

6. เตรียม stacking gel โดยผสมสารเคมี ดังนี้

1. น้ำกลั่น	2.10 มิลลิลิตร
2. 40% acrylamide	0.38 มิลลิลิตร
3. 1.0M Tris, pH 6.8	0.38 มิลลิลิตร
4. 10% SDS	0.03 มิลลิลิตร
5. 10% Ammonium persulfate	0.05 มิลลิลิตร
6. TEMED	5 ไมโครลิตร

7. จากนั้นบีบเปิดส่วนของ stacking gel ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เหลือ

8. ใส่ comb ในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก โดยวาง comb ให้ตรง เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศ และตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว (polymerize) ประมาณ 30 – 45 นาที

9. เมื่อเจลแข็งตัว ดึง comb ออกช้า ๆ และบีบน้ำก้นมาล้างทำความสะอาดแผ่นเจล

2. SDS gel-loading buffer

ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|---|--------------|
| 1. 100 mM Tris-HCl, pH 6.8 | 1.21 กรัม |
| 2. 4% SDS | 4 กรัม |
| 3. 0.2% Bromo Phenol Blue | 0.2 กรัม |
| 4. 20% glycerol | 20 มิลลิลิตร |
| 5. เติมน้ำก้นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร | |

3. Coomassie blue staining buffer

ใน 500 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|--|---------------|
| 1. เมทานอล (methanol) | 250 มิลลิลิตร |
| 2. น้ำก้น | 200 มิลลิลิตร |
| 3. กรดแกลเซียลแอซิก (glacial acetic acid) 50 มิลลิลิตร | |
| 4. Coomassie Brilliant Blue | 1.25 กรัม |

4. Destaining buffer

ใน 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|---|---------------|
| 1. น้ำก้น | 600 มิลลิลิตร |
| 2. เมทานอล (methanol) | 300 มิลลิลิตร |
| 3. กรดแกลเซียลแอซิก (glacial acetic acid) 200 มิลลิลิตร | |

5. Wash buffer

ใน 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|--|--------------|
| 1. 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2 | 30 มิลลิลิตร |
| 2. Isopropanol 99.8% | 20 มิลลิลิตร |

6. 1% Congo red solution

ใน 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|---|----------|
| 1. Congo red | 0.5 กรัม |
| 2. เติมน้ำก้นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร | |

7. Renaturing buffer

ใน 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1. 5 mM β -mercaptoethanol 0.0195 กรัม
2. 1 mM EDTA 0.0146 กรัม
3. 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2 30 มิลลิลิตร



สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าซีโอดี โดยวิธีฟลักซ์แบบปิด

1. น้ำยಾಯ่อยสลายสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium dichromate digestion reagent)

ใน 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|--|---------------|
| 1. Potassium Dichromate | 4.913 กรัม |
| ซึ่งอบแห้งที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง | |
| 2. น้ำกลั่น | 500 มิลลิลิตร |
| 3. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น | 167 มิลลิลิตร |
| 3. mercuric sulfate | 33.3 กรัม |
| 4. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร | |

2. สารละลายกรดซัลฟิวริก (Sulfuric reagent)

ใน 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 1. Silver sulfate | 8.8 กรัม |
| 2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น | 1,000 มิลลิลิตร |

3. Ferroin indicator

ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|---|---------------|
| 1. 1-10 Phenanthroline monohydrate | 1.485 กรัม |
| 2. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 695 มิลลิกรัม |
| 3. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร | |

4. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) 0.1 M

ใน 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- | | |
|--|---------------|
| 1. $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 39 กรัม |
| 2. น้ำกลั่น | 500 มิลลิลิตร |
| 3. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น | 20 มิลลิลิตร |
| 4. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร | |

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	รวีพร รุณจักร
วัน เดือน ปี เกิด	30 พฤศจิกายน 2537
สถานที่เกิด	ปราจีนบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2556 ครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชามัธยมศึกษา วิชาเอกชีววิทยา จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	121/9 หมู่ 12 ตำบลท่างาม อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี 25000
ผลงานตีพิมพ์	Runajak, R., Chuetor, S., Rodiahwati, W., Sriariyanun, M., Tantayotai, P., & Phornphisutthimas, S. (2020). Analysis of Microbial Consortia with High Cellulolytic Activities for Cassava Pulp Degradation. In E3S Web of Conferences (Vol. 141, p. 03005). EDP Sciences.