



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม

เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพขี้เลื่อยและเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Optimal Pretreatment of Sawdust and Microorganism for Hydrogen Production

นามผู้วิจัย นางสาวปัทมกร แก้วพงศธร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รักษาราชการแทน  
หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประไพพิศ ชัยรัตน์มโนกร, D.Eng. )

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์จักรกฤษณ์ มหัจฉริยวงศ์, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

สิงสิงห์ มทววิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพขี้เลื่อยและเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

Optimal Pretreatment of Sawdust and Microorganism for Hydrogen Production

โดย

นางสาวปัทมกร แก้วพงศธร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัทมกร แก้วพงศธร 2555: การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพจีโอและเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม) สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร, D.Eng. 160 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพจีโอและเชื้อจุลินทรีย์ในกากตะกอนเพื่อการผลิตไฮโดรเจน โดยการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่ 55 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5 ขึ้นแรกคัดเลือกปัจจัยการปรับสภาพจีโอที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนด้วยแผนการทดลองแฟกต์เก็ตต์-เบอร์แมน พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสจีโอเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากนั้นศึกษาสภาวะการปรับสภาพจีโอที่เหมาะสมด้วยแผนการทดลองทางสถิติและวิธีการตอบสนองที่พื้นผิว พบว่าการหมักจีโอที่ปรับสภาพโดยแซ่จีโอที่ร้อยละ 10 ในสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.75 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 10 บาร์ เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นไฮโดรไลซิสจีโอด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ 10 เอฟพียูต่อกรัม ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 215.77 มิลลิลิตรต่อกรัมจีโอที่ผ่านการปรับสภาพหมักร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะเหมาะสม โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของกากตะกอนเท่ากับ 2 แซ่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 264.68 มิลลิลิตรต่อกรัมจีโอ จากการวิเคราะห์โมเลกุลชีวภาพเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Thermoanaerobacterium* มีความโดดเด่นในกากตะกอนทั้งก่อนและหลังกระบวนการหมัก นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในการหมักจีโอร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60 ร่วมกับเหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม และสังกะสี ที่ความเข้มข้น 200 150 100 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 275.77 มิลลิลิตรต่อกรัมจีโอ การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการปรับสภาพจีโอและกากตะกอนสามารถเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนได้

Papangkorn Kaewpongsaton 2012: Optimal Pretreatment of Sawdust and Microorganism for Hydrogen Production. Master of Science (Environmental Technology and Management), Major Field: Environmental Technology and Management, Department of Environmental Technology and Management.  
Thesis Advisor: Assistant Professor Prapaipid Chairattananamokorn, D.Eng.  
160 pages.

The objective of this research is to study the optimum condition of pretreatments of sawdust and microorganism in seed sludge for hydrogen production by anaerobic fermentation at 55 °C and pH 5.5. Firstly, screening of factors of the sawdust pretreatment significantly influencing to hydrogen production was conducted by Plackett-Berman experimental design. The cellulase activity for the hydrolysis of the sawdust was a significant factor. Thereafter, the optimum pretreatment condition was investigated with Taguchi and Response Surface Method experimental design. The fermentation of sawdust pretreated by soaking in sulfuric acid solution at concentration of 1.75% at 60 °C for 3 hr, exploding with steam at 10 bar for 10 min and hydrolyzing with cellulase at 10 FPU/g for 15 hr provided the highest hydrogen production yield at 215.77 ml/g. The fermentation of the pretreated sawdust with sludge, pretreated under optimum condition by adjusting pH of the seed sludge at pH 2.0 and soaking in hot water at 100 °C for 1 hr, provided the highest hydrogen production yield at 264.68 ml/g. From molecular biology analysis, *Thermoanaerobacterium* species was dominant in the seed sludge both before and after the fermentation. Furthermore, the optimum condition fermentation of pretreated sawdust and seed sludge at C:N ratio at 60 with  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  at the concentration of 200 mg/L, 150 mg/L, 100 mg/L and 0.5 mg/L, respectively provided the maximum hydrogen yield at 275.77 ml/g. This study indicates that the pretreatment of sawdust and seed sludge could enhance hydrogen production.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความกรุณาคอยปรึกษาอันเป็นประโยชน์ตลอดจนชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาดังกล่าว และให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย และขอกราบขอบพระคุณ Prof. Dr. Tsuyshi Imai ดร. สมเกียรติ เตชะกาญจนารักษ์ คุณนิมารดี บุญอาพัทธ์เจริญ เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่บางขุนเทียน และคุณอรุณศรี ฝางคำ ที่คอยให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยทุกด้าน พร้อมทั้งให้คำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนตามโครงการความร่วมมือในการผลิตนักวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยผ่านสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และขอขอบคุณทุนสนับสนุนกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับความร่วมมือในการแลกเปลี่ยนนิสิตนักศึกษาภายใต้โครงการความร่วมมือระหว่างไทย-ญี่ปุ่น (The 4<sup>th</sup> Young Scientists Seminar) และภายใต้โครงการ Asian Core Program และ JASSO ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณบริษัท มาลีสามพราน จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านของเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการทดลอง และบริษัทอีสต์ เอเชียติก (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านของเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้สำหรับการทดลอง

ขอขอบคุณ อาจารย์ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน รวมถึงพี่ๆ ที่ประเทศญี่ปุ่นทุกคนที่คอยให้คำแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดเวลาที่ทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความช่วยเหลือ มอบความห่วงใยและคอยเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมาแก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา และขอขอบพระคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ซึ่งมิได้เอ่ยนามในที่นี้ทุกๆ ท่าน

ปัทมกร แก้วพงศธร

กันยายน 2555

## สารบัญ

## หน้า

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| สารบัญ                      | (1) |
| สารบัญตาราง                 | (2) |
| สารบัญภาพ                   | (7) |
| คำนำ                        | 1   |
| วัตถุประสงค์                | 3   |
| การตรวจเอกสาร               | 4   |
| อุปกรณ์และวิธีการ           | 47  |
| อุปกรณ์                     | 47  |
| วิธีการ                     | 49  |
| ผลและวิจารณ์                | 56  |
| สรุปและข้อเสนอแนะ           | 108 |
| สรุป                        | 108 |
| ข้อเสนอแนะ                  | 109 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง        | 110 |
| ภาคผนวก                     | 130 |
| ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์  | 131 |
| ภาคผนวก ข ข้อมูลจากการทดลอง | 143 |
| ประวัติการศึกษาและการทำงาน  | 160 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                | หน้า |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง                                                                                                                                 | 38   |
| 2        | ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรอง จำนวน 7 ปัจจัย โดยมีจำนวนสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 12 การทดลอง และมีจำนวน dummy variables 4 ตัว                                          | 40   |
| 3        | แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเงื่อนไขการทดลอง จำนวนปัจจัยที่สนใจศึกษาและจำนวนระดับของปัจจัย                                                                                                                     | 42   |
| 4        | คุณสมบัติของตัวอย่างจีเลื้อยที่ใช้ในการศึกษา                                                                                                                                                                   | 56   |
| 5        | ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีแฟคัลเท็กซ์-เบอร์แมน                                           | 58   |
| 6        | การวิเคราะห์ทางสถิติผลของปัจจัยในการปรับสภาพจีเลื้อยที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน                                                                                                                                    | 59   |
| 7        | ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบตามแผนการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ                           | 65   |
| 8        | ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร่วมกับการระบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบตามแผนการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ                      | 66   |
| 9        | ผลผลิตไฮโดรเจนและอัตราการเกิดไฮโดรเจนจากแผนการทดลองทางสถิติที่ได้จาก สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพจีเลื้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร่วมกับการระบิดด้วยไอน้ำจากการทำซ้ำเพื่อยืนยันผล | 72   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                | หน้า |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 10       | ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำและการไฮโดรไลซิสที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองที่พื้นผิว | 74   |
| 11       | เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการปรับสภาพวัตถุดิบที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด                                                                                                                                 | 79   |
| 12       | ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพร่วมกับกากตะกอนที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและค้างร่วมกับความร้อนที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทางอุทก          | 81   |
| 13       | ผลของความเข้มข้นของเหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนตามแผนการทดลองทางอุทก                                                                                | 85   |
| 14       | สัญลักษณ์กำกับบนแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างกากตะกอนที่ศึกษา                                                                                                                                                         | 95   |
| 15       | รหัสลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกากตะกอนก่อนและหลังการปรับสภาพ และหลังการหมัก                                                                                                                                           | 96   |
| 16       | เปรียบเทียบจีโนมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบก่อนและหลังการปรับสภาพและหลังกระบวนการหมัก                                                                                                                          | 99   |
| 17       | กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์และค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพก่อนกระบวนการหมักกับข้อมูลใน NCBI                                                                                 | 102  |
| 18       | กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์และค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของกากตะกอนหลังกระบวนการหมักกับข้อมูลใน NCBI                                                                                                   | 105  |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่                                                                                                                                                                                              | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ก1 สัดส่วนและปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียม 0% Denaturing solution                                                                                                                                             | 140  |
| ก2 สัดส่วนและปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียม 100% Denaturing solution                                                                                                                                           | 140  |
| ข1 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย<br>สารละลายกรดซัลฟิวริกที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธี<br>แฟล็กเก็ตต์-เบอร์แมน                                                   | 144  |
| ข2 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย<br>สารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่<br>ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทาคุชิ                                       | 145  |
| ข3 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย<br>สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่<br>ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทาคุชิ                                  | 146  |
| ข4 ปริมาณไฮโดรเจนจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย<br>กรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการ<br>ทดลองด้วยวิธีการตอบสนองต่อพื้นผิว                             | 147  |
| ข5 ปริมาณไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจนสะสมจากการหมักจีเลื้อยร่วมกับ<br>กากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างที่สภาวะต่างๆ ที่<br>ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทาคุชิ                                   | 148  |
| ข6 ปริมาณไฮโดรเจนจากการหมักจีเลื้อยร่วมกับกากตะกอนที่สภาวะต่างๆ ที่<br>ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทาคุชิ                                                                                                    | 149  |
| ข7 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นปริมาณไฮโดรเจนและผลผลิตไฮโดรเจน<br>สะสมจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย สารละลายกรดซัลฟิวริกที่<br>สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีแฟล็กเก็ตต์-เบอร์แมน | 150  |
| ข8 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพ<br>ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่<br>ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทาคุชิ                         | 151  |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่                                                                                                                                                                                                                                                                   | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ข9 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ                                                                                                  | 152  |
| ข10 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองต่อพื้นผิว                                                                                        | 153  |
| ข11 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ                                                                                                                  | 154  |
| ข12 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักจีเลื้อยร่วมกับกากตะกอนที่สภาวะต่างๆ ตามแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ                                                                                                                                                                | 155  |
| ข13 ผลของปริมาณกรดอินทรีย์ระยะย่อยประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และ กรดโพรไพโอนิก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่สภาวะการทดลองที่ 4 6 และชุดควบคุม ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีแฟล็กเก็ตต์-เบอร์แมน                | 156  |
| ข14 ผลของปริมาณกรดอินทรีย์ระยะย่อยประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะการทดลองที่ 1 6 และชุดควบคุม ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ      | 157  |
| ข15 ผลของปริมาณกรดอินทรีย์ระยะย่อยประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการหมักจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะการทดลองที่ 1 6 และชุดควบคุม ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ | 158  |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

### ตารางผนวกที่

### หน้า

- ข16 ผลของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการหมักขี้เลื่อยร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างที่สภาวะต่างๆ ในชั่วโมงเริ่มต้นและชั่วโมงสุดท้าย ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ 159

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                 | หน้า |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส                                                                                                                                                                                                      | 4    |
| 2      | เปรียบเทียบการปลดปล่อยคาร์บอนระหว่างเครื่องยนต์ที่ใช้ไฮโดรเจนกับ<br>เครื่องยนต์ที่ใช้เชื้อเพลิงชนิดอื่น                                                                                                                         | 7    |
| 3      | การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการรีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำและกระบวนการก๊าซซิฟิเค<br>ชัน                                                                                                                                                    | 8    |
| 4      | การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง                                                                                                                                                                           | 10   |
| 5      | การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม                                                                                                                                                                          | 11   |
| 6      | การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง                                                                                                                                                                                    | 12   |
| 7      | การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง                                                                                                                                                                                 | 13   |
| 8      | กลไกการผลิตไฮโดรเจนจากสารตั้งต้นประเภทกลูโคส                                                                                                                                                                                    | 15   |
| 9      | ลักษณะของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาล<br>โมเลกุลคู่ พร้อมแสดงให้เห็นถึงหมู่ที่ทำหน้าที่รีดิวซ์รวมทั้งชี้ให้เห็นถึงลักษณะ<br>โครงสร้างของซูโครสซึ่งจัดเป็นน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (nonreducing sugar) | 28   |
| 10     | การเคลื่อนที่บนโพลีอคริลาไมด์เจลของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างเปรียบเทียบกับดี<br>เอ็นเอจากเชื้อมาตรฐานในการทำดีจีจี                                                                                                                 | 36   |
| 11     | ผลของความดันและความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีผลต่อปริมาณ<br>ไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                               | 77   |
| 12     | ผลของปริมาณเอนไซม์และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีผลต่อ<br>ปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                         | 78   |
| 13     | ผลของความดันและปริมาณเอนไซม์เซลล์ูเลสที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                                               | 78   |
| 14     | ความเป็นกรดต่างที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจน<br>สะสม                                                                                                                                                      | 82   |
| 15     | อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                                                 | 83   |
| 16     | ระยะเวลาในการปรับสภาพกากตะกอนที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                                                       | 84   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                                                                                                                                                                                                              | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 17 ความเข้มข้นของเหล็กที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                                                                                  | 86   |
| 18 ความเข้มข้นของแคลเซียมที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                                                                               | 87   |
| 19 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                                                                             | 88   |
| 20 ความเข้มข้นของสังกะสีที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                                                                                | 89   |
| 21 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม                                                                                                                                                                                          | 90   |
| 22 ความสัมพันธ์ระหว่างกรดอินทรีย์ระเหยง่ายในสารละลายหลังจากการหมักจีลื้อยที่ปรับสภาพกากตะกอน (ชั่วโมงที่ 168) กับผลผลิตไฮโดรเจนสะสมตามแผนการทดลองทางอุชิ                                                                                            | 91   |
| 23 ความสัมพันธ์ปริมาณไฮโดรเจนสะสมและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่าง ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส             | 92   |
| 24 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคจีจีจีของกากตะกอนก่อนและหลังการหมักที่สภาวะการทดลองที่ 1-5 ของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายกรดและด่างตามแผนการทดลองทางอุชิ (AF; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอก่อนการหมัก BF; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลังการหมัก)             | 93   |
| 25 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคจีจีจีของกากตะกอนก่อนและหลังการหมักที่สภาวะการทดลองที่ 6-8 และชุดควบคุมของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายกรดและด่างตามแผนการทดลองทางอุชิ (AF; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอก่อนการหมัก BF; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลังการหมัก) | 94   |
| 26 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ก่อนกระบวนการหมักโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbour-Joining                                                                                                                              | 97   |
| 27 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้หลังกระบวนการหมักโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbour-Joining                                                                                                                              | 98   |

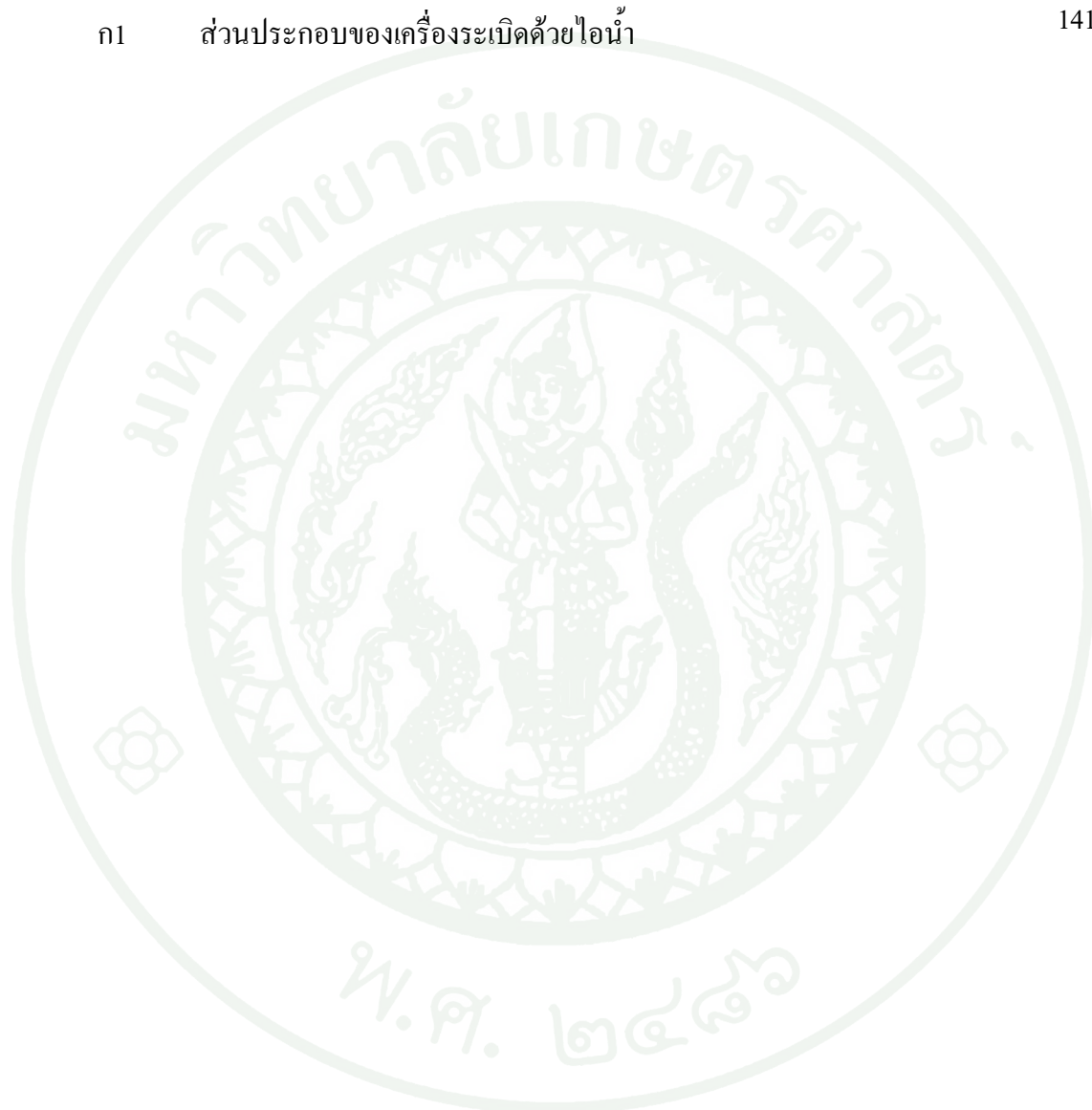
## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

ก1 ส่วนประกอบของเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ

141



## การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการปรับสภาพขี้เลื่อยและเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน

### Optimal Pretreatment of Sawdust and Microorganism for Hydrogen Production

#### คำนำ

พลังงานถือเป็นปัจจัยสำคัญในการขับเคลื่อนประเทศให้พัฒนาไปสู่ความก้าวหน้า แต่ในปัจจุบันปัญหาการขาดพลังงานที่มีแนวโน้มสูงขึ้นต่อเนื่องก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั่วโลก โดยแหล่งพลังงานส่วนใหญ่ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงประเภทฟอสซิล ซึ่งได้แก่ น้ำมันดิบ ถ่านหิน และ ก๊าซธรรมชาติ แหล่งพลังงานเหล่านี้มีจำนวนจำกัดและกำลังจะหมดไปในไม่ช้า วิกฤตการณ์ดังกล่าวกระตุ้นให้ประเทศต่างๆ เกิดการตื่นตัวเร่งคิดค้นพลังงานทดแทนหรือพลังงานทางเลือกใหม่ ชนิดต่างๆ ได้แก่ พลังงานลม พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานน้ำ และพลังงานไฮโดรเจน เป็นต้น

เชื้อเพลิงไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกที่ได้รับความสนใจมาก เพราะมีจุดเด่นต่างจากเชื้อเพลิงทั่วไปคือ เป็นเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพในการเผาไหม้สูง สะอาด สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในครัวเรือนและภาคอุตสาหกรรมได้และที่สำคัญคือเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพราะผลพลอยจากการเผาไหม้พลังงานไฮโดรเจนมีเพียงไอน้ำเท่านั้น สำหรับกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนนั้นสามารถทำได้โดยใช้วิธีทางกายภาพเคมี เช่น การแยกน้ำด้วยไฟฟ้า การรีฟอร์มมิ่ง ซึ่งมีข้อจำกัดในการผลิตการใช้หรือการผลิต คือ ต้องใช้พลังงานสูงและเปลืองค่าไฟฟ้า ดังนั้นการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพจากชีวมวลจึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ (นริศรา, 2552) เพราะใช้พลังงานตั้งต้นต่ำ สามารถทำได้หลายวิธี และยังสอดคล้องกับแผนยุทธศาสตร์ด้านเชื้อเพลิงไฮโดรเจนและเทคโนโลยีเซลล์เชื้อเพลิงของกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน ที่ต้องการให้มีการผลิตเชื้อเพลิงไฮโดรเจนจากแหล่งทรัพยากรที่มีอยู่มากในประเทศโดยให้มีการใช้อย่างปลอดภัยในทุกสาขาเศรษฐกิจและครอบคลุมทั่วประเทศภายในปี 2573 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2554)

ขี้เลื่อย คือ ผงไม้ที่เกิดจากการตัดไม้ด้วยเลื่อยหรือเกิดจากการขัดไม้ด้วยกระดาษทรายหรือเครื่องขัดหรือเกิดขึ้นจากขั้นตอนการตกแต่งชิ้นงาน ขี้เลื่อยเป็นชีวมวลที่ประกอบด้วยเซลลูโลสเป็น

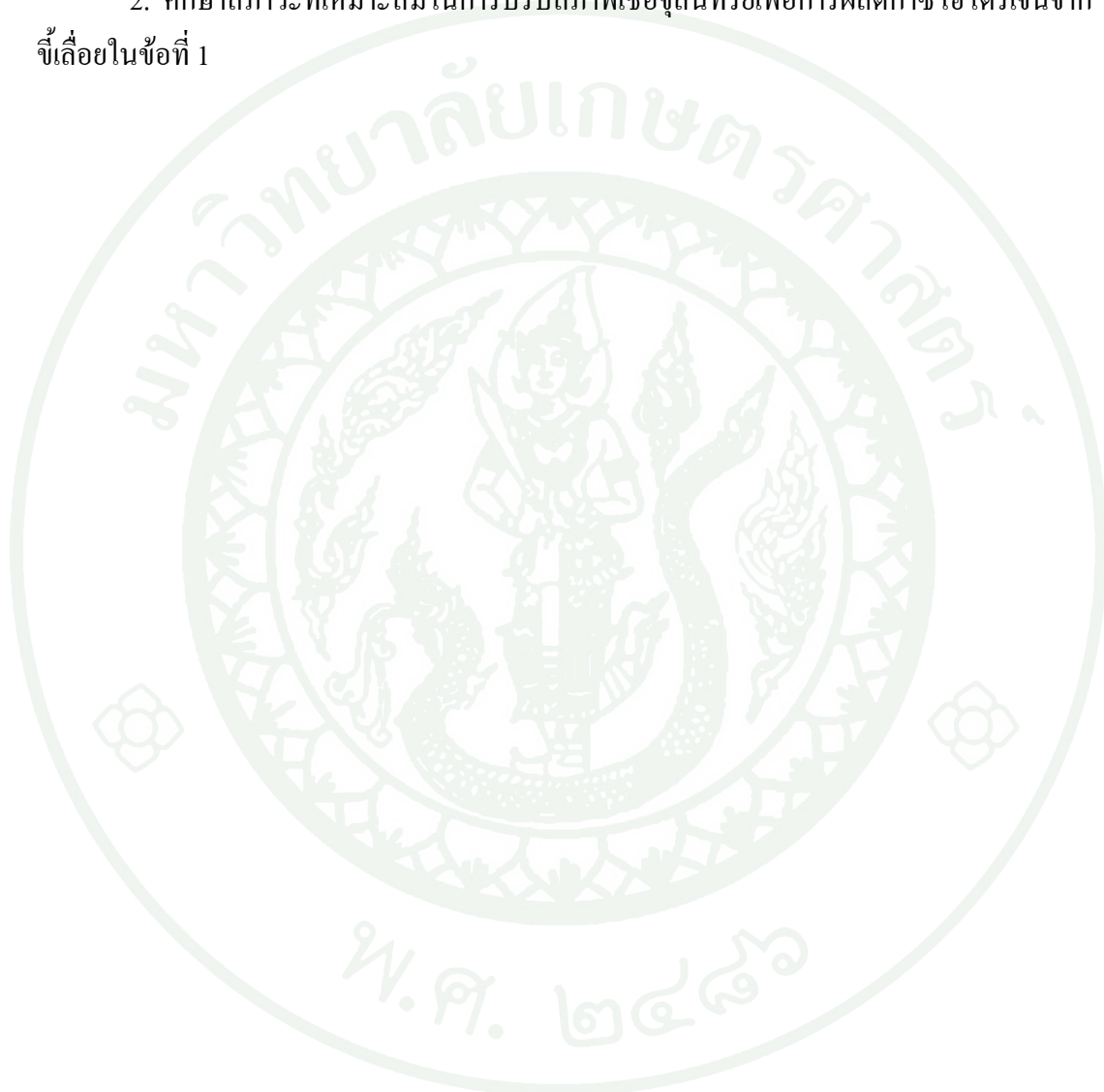
ส่วนใหญ่ นอกจากนี้มีลิกลินและเฮมิเซลลูโลสเชื่อมติดกับเซลลูโลสซึ่งยากต่อการย่อยสลายของ จุลินทรีย์ จึงต้องมีการปรับสภาพชี้เลี้ยงเพื่อกำจัดลิกลินและเฮมิเซลลูโลสและทำให้เซลลูโลสเรียง ตัวกันอย่างหลวมเพื่อให้่ายต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และจุลินทรีย์ โดยการนำชี้เลี้ยงที่ผ่าน การปรับสภาพมาเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิส ผลผลิตที่ได้จะเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งจะใช้เป็นซับ เสตรทในกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน สามารถนำไปใช้ เป็นเชื้อเพลิงทดแทนหรือเชื้อเพลิงเสริมในกระบวนการผลิตภายในโรงงานได้ ยังสามารถลด ปริมาณของเหลือทิ้งที่ก่อให้เกิดปัญหาด้านขยะ ได้อีกด้วย

กากตะกอนที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเชื้อผสมที่มาจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำ ผลไม้กระป๋อง จึงต้องมีการปรับสภาพกากตะกอนก่อนทำการหมักร่วมกับชี้เลี้ยง เนื่องจากเป็น ขั้นตอนที่ช่วยยับยั้งเชื้อที่ผลิตมีเทนและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน วิธีการปรับ สภาพกากตะกอนสามารถทำได้หลายวิธีแตกต่างกัน ได้แก่ การใช้ความร้อน การใช้กรด การใช้ด่าง และการใช้สารเคมี เป็นต้น (Yi and Xin, 2006; Ren *et al.*, 2008; O-Thong *et al.*, 2009)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพชี้เลี้ยงและกากตะกอน เพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศ

## วัตถุประสงค์

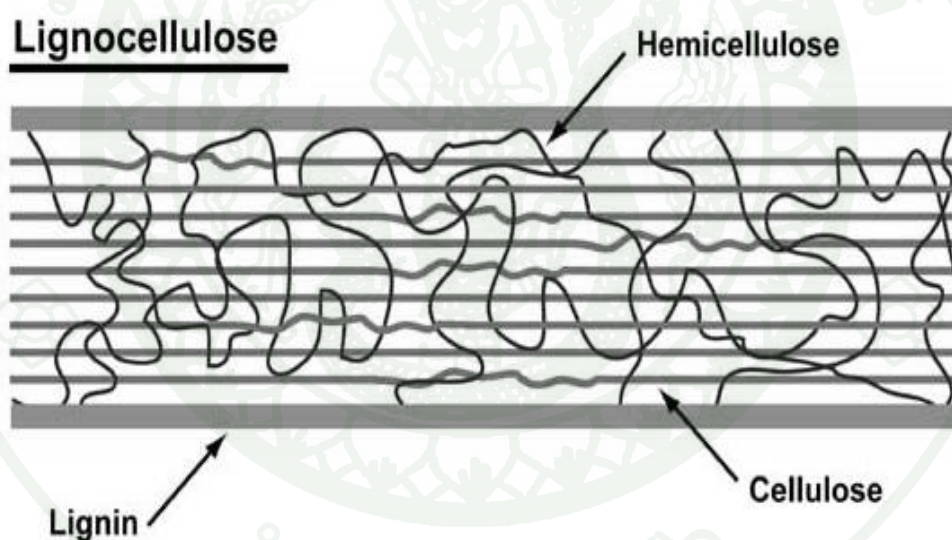
1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพจีเอ็มเอชเพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากจีเอ็มเอชในข้อที่ 1



## การตรวจเอกสาร

### 1. ลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ฟางข้าว กากอ้อย เศษไม้ และซังข้าวโพด เป็นต้น ประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) เป็นส่วนใหญ่ (ดังภาพที่ 1) เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส (pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (xylose) แมนโนส (mannose) และอะราบินโนส (arabinose) เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549)



ภาพที่ 1 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Mosier *et al.* (2005)

1.1 เซลลูโลส (cellulose) เป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นแบบ linear homopolysaccharide ประกอบด้วยน้ำตาลดี-กลูโคส (D-glucose) ที่เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ (1→4) ไกลโคซิดิก ถ้าไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยกรดแก่จะได้ ดี-กลูโคส แต่ถ้าไฮโดรไลซ์ไม่สมบูรณ์จะได้รีดิวซ์

ไดแซ็กคาไรด์ คือ เซลโลไบโอส เอนไซม์ไกลโคซิเดส (glycosidase) ที่พบในทางเดินอาหาร (digestive tract) ของสัตว์ ที่เลี้ยงลูกด้วยนมที่ไม่สามารถย่อยพันธะ(1 →4)ไกลโคซิดิกได้ แต่ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว ควาย สามารถใช้เซลลูโลสเป็นอาหารได้ เนื่องจากมีแบคทีเรียในกระเพาะอาหารส่วนรูเมน (rumen) สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) มาย่อยเซลลูโลสได้ โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงเป็นเส้นยาวขนานกัน แต่ละเส้นจะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้อยู่ร่วมกันเป็นมัด (ประมาณตั้งแต่ 40 โมเลกุลของเซลลูโลสขึ้นไป) มีลักษณะเป็นเส้นใยเล็ก เรียกว่า ไฟบริล (fibril)

1.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ประกอบด้วย โมเลกุลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosaccharide) ชนิดต่างๆ ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปเป็นจำนวน 100 โมเลกุลที่มีคุณสมบัติในการละลายได้ในสารละลายต่าง น้ำตาลเชิงเดี่ยวนี้อาจแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ เพนโทแซนส์ (pentosans) และ เฮกโซแซนส์ที่ไม่ใช่เซลลูโลส (non cellulose hexosans) น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสคือ ดี-ไซแลนส์ (D-xylans) และ ดี-กลูโค-ดีแมนแนนส์ (D-glucosyl-D-mannans) และมีไซค์แซนส์เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น แอล-อะราบินอส (L-arabinoses)

1.3 ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่ร่วมกับ เซลลูโลส ลิกนินเป็นสารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิดซึ่งเป็นสารอะโรมาติก ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติทางกายภาพที่ยืดหยุ่น จึงทำให้พืชที่มี ลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (lignase) หรือ ลิกนินเนส (ligninase)

## 2. ขี้เลื่อย

ขี้เลื่อย (sawdust) เป็นของเหลือทิ้งจากการก่อสร้างที่ใช้ไม้เป็นองค์ประกอบ และอุตสาหกรรมไม้ประเภทต่างๆ รวมไปถึงกระบวนการผลิตไฟเบอร์บอร์ดลักษณะของขี้เลื่อยมีทั้งหยาบและละเอียดขึ้นอยู่กับอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ใช้เลื่อยและชนิดของไม้ที่ถูกเลื่อย ขี้เลื่อยจากกระบวนการผลิตไฟเบอร์บอร์ดเกิดจากขั้นตอนการตกแต่งชิ้นงาน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยมาก โรงงานจึงต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดขี้เลื่อยที่เกิดขึ้น

ชี้เลื่อย เป็นชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloses) ที่ประกอบด้วยเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้มีลิกนินและเฮมิเซลลูโลสเชื่อมติดกับเซลลูโลสมีความเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงใช้ในโรงงาน จึงมีแนวคิดในการนำชี้เลื่อยมาผลิตก๊าซไฮโดรเจน โดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน

### 3. ไฮโดรเจน

#### 3.1 คุณสมบัติของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจน (hydrogen) เป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำที่เป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดของสิ่งมีชีวิตบนโลก ตามธรรมชาติบรรยากาศในโลกมีก๊าซไฮโดรเจนประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความแข็งแรงในการยึดโมเลกุล เท่ากับ 436 กิโลจูลต่อโมล หรือ 104 กิโลแคลอรีต่อโมล ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยนิวเคลียสอยู่กลาง ภายในนิวเคลียส ประกอบด้วยโปรตอน นิวตรอน และมีอิเล็กตรอนวิ่งรอบนอก เหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทปขึ้นกับจำนวนโปรตอน และจำนวนนิวตรอนที่ต่างกัน ดังนี้

- ไฮโดรเจน (hydrogen) มีจำนวนโปรตอน 1 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 1.0078

- ดิวเทอเรียม (deuterium) มีจำนวนโปรตอน 2 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 2.0141

- ทริเทียม (tritium) มีจำนวนโปรตอน 3 โปรตอน จำนวน 1 นิวตรอน มีน้ำหนักอะตอม เท่ากับ 3.0161

ไฮโดรเจนมีอยู่ 3 สถานะ คือ ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ไฮโดรเจนที่เป็นของแข็ง ไม่มีสี โครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม ปริมาตร เท่ากับ 22.56 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อโมล ไฮโดรเจนที่เป็นของเหลวไม่มีสี ค่าความหนืด ต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็ว ไฮโดรเจนที่เป็นก๊าซ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ ก๊าซไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2554)

ไฮโดรเจนถือได้ว่าเป็นเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ได้รับการคาดหมายและยอมรับว่าจะเป็นแหล่งของเชื้อเพลิงที่สำคัญมากในอนาคต เนื่องจากส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยเมื่อเกิดการเผาไหม้กับออกซิเจน แตกต่างจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงอื่นที่ให้การปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก (greenhouse gas) (ดังภาพที่ 2) ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการทำให้โลกร้อนขึ้น (global warming) นอกจากนี้กระแสไฟฟ้าสามารถผลิตจากไฮโดรเจนโดยป้อนไฮโดรเจนเข้าเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) ซึ่งขณะนี้นักวิจัยทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงและนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เนื่องจากประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงมีค่าสูงกว่าอุปกรณ์ผลิตไฟฟ้าแบบอื่นๆ มาก ดังนั้นไฮโดรเจนจึงเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงดั้งเดิมได้ (ธรรมบุญ, 2550)



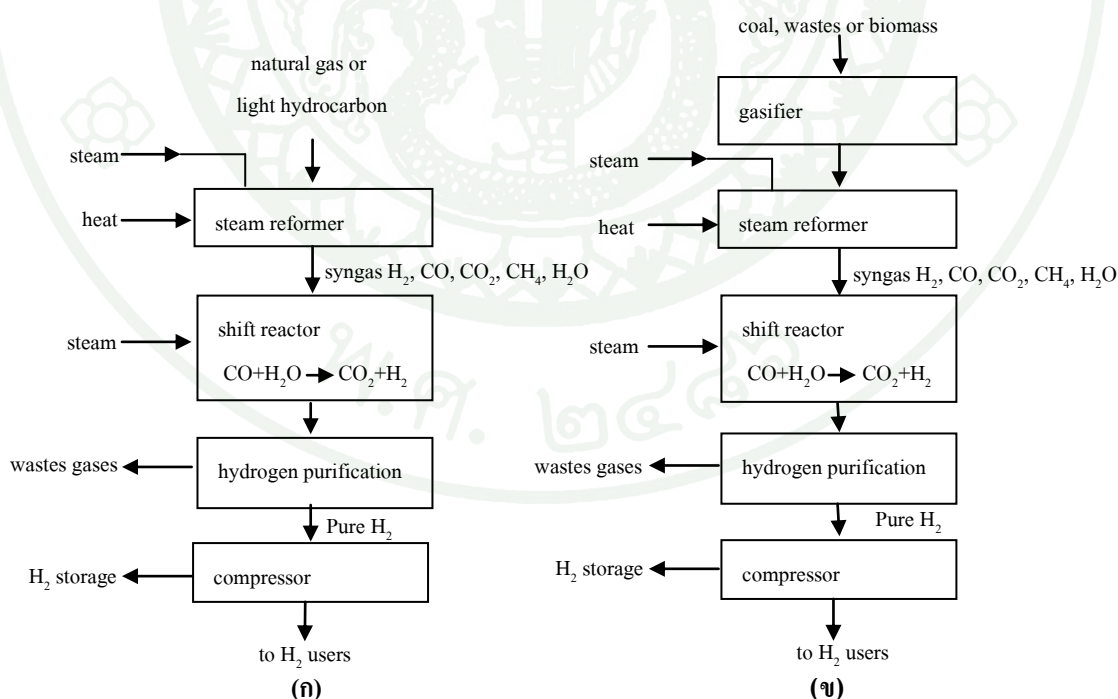
ภาพที่ 2 เปรียบเทียบการปลดปล่อยคาร์บอนระหว่างเครื่องยนต์ที่ใช้ไฮโดรเจนกับเครื่องยนต์ที่ใช้เชื้อเพลิงชนิดอื่น

ที่มา: Bak *et al.* (2002)

### 3.2 เทคโนโลยีการผลิตไฮโดรเจน

เทคโนโลยีการผลิตไฮโดรเจนแบ่งออกได้เป็น 3 เทคโนโลยีหลัก คือ กระบวนการความร้อนเคมี (thermo chemical processes) กระบวนการไฟฟ้าเคมี (electro chemical processes) และกระบวนการชีวเคมี (biochemical processes)

3.2.1 กระบวนการความร้อนเคมี (thermo chemical process) ไฮโดรเจนสามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมีโดยใช้ความร้อน มีวัตถุดิบหลักที่เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น ก๊าซธรรมชาติ ถ่านหิน ชีวมวล เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือก๊าซสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย ไฮโดรเจน ( $H_2$ ) คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) คาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) น้ำ ( $H_2O$ ) และมีเทน ( $CH_4$ ) จากนั้นจะผ่านกระบวนการเพิ่มเติมเพื่อให้ไฮโดรเจนบริสุทธิ์ขึ้น การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการความร้อนเคมี ได้แก่ กระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (steam reforming) กระบวนการก๊าซซิฟิเคชัน (gasification) ปัจจุบันการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำจากก๊าซธรรมชาติเป็นกระบวนการที่ใช้กันแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ ซึ่งในประเทศไทยใช้กระบวนการนี้ในการผลิตไฮโดรเจนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ



ภาพที่ 3 การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการรีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (ก) และกระบวนการก๊าซซิฟิเคชัน (ข)

3.2.2 กระบวนการไฟฟ้าเคมี (electro chemical process) เป็นกระบวนการแยกน้ำด้วยไฟฟ้าเพื่อผลิตไฮโดรเจนและออกซิเจน โดยไฟฟ้าที่มาจากแหล่งกำเนิดไฟฟ้าทุกชนิดสามารถใช้ได้กับกระบวนการนี้ ไม่ว่าจะเป็นไฟฟ้าจากแหล่งพลังงานหมุนเวียน รวมทั้งจากพลังงานนิวเคลียร์

3.2.3 กระบวนการชีวเคมี (biochemical processes) เป็นการผลิตไฮโดรเจนโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก หรือจุลินทรีย์ และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ซึ่งสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้เปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นไฮโดรเจน อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีข้อเสีย คือ มีประสิทธิภาพการผลิตต่ำ ความสามารถในการผลิตถูกจำกัดด้วยความเข้มแสงที่ได้รับ (กระทรวงพลังงาน, 2555)

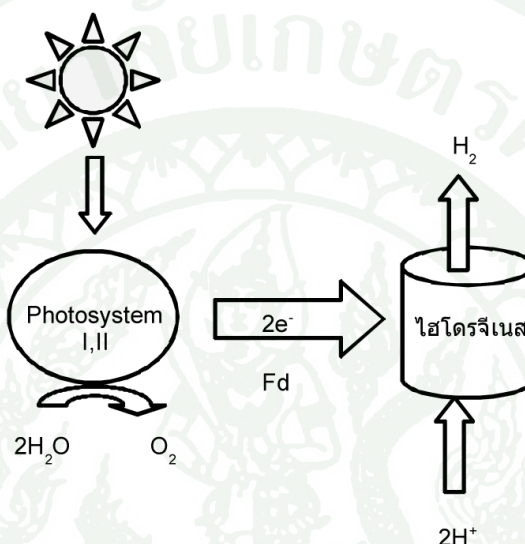
ในปัจจุบันนี้กระบวนการเปลี่ยนรูปสารไฮโดรคาร์บอนด้วยไอน้ำ (steam reforming of hydrocarbons) เป็นกระบวนการที่ใหญ่ที่สุดสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงไฮโดรเจน แต่ปัญหาหลักที่สำคัญของกระบวนการนี้คือ การปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมากซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อนหรือปรากฏการณ์เรือนกระจก นอกจากนี้แล้วยังประสบปัญหาการขาดแคลนแหล่งของไฮโดรคาร์บอนที่นำมาใช้ในกระบวนการอีกด้วย ดังนั้นกระบวนการอื่นซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ที่ปลอดภัย และสามารถผลิตเชื้อเพลิงไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงควรได้มีการพัฒนาขึ้นเพื่อรองรับความต้องการเชื้อเพลิงไฮโดรเจนในอนาคต นักวิทยาศาสตร์จึงหันมาพัฒนาการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพหรือไบโอไฮโดรเจน (biohydrogen) กระบวนการผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 กระบวนการหลัก ได้แก่

3.3 กระบวนการใช้แสง (light - driven process) สามารถจำแนกเป็นวิธีย่อยได้ดังนี้

3.3.1 การแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง (direct biophotolysis) การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงเป็นกระบวนการที่ใช้ระบบแสงของสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) เช่น สาหร่ายสีเขียว (green algae) เพื่อแยกน้ำโดยการดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์โดยตรงให้เป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วยอัตราส่วน 2:1 ดังสมการที่ (1) (Ni *et al.*, 2006)



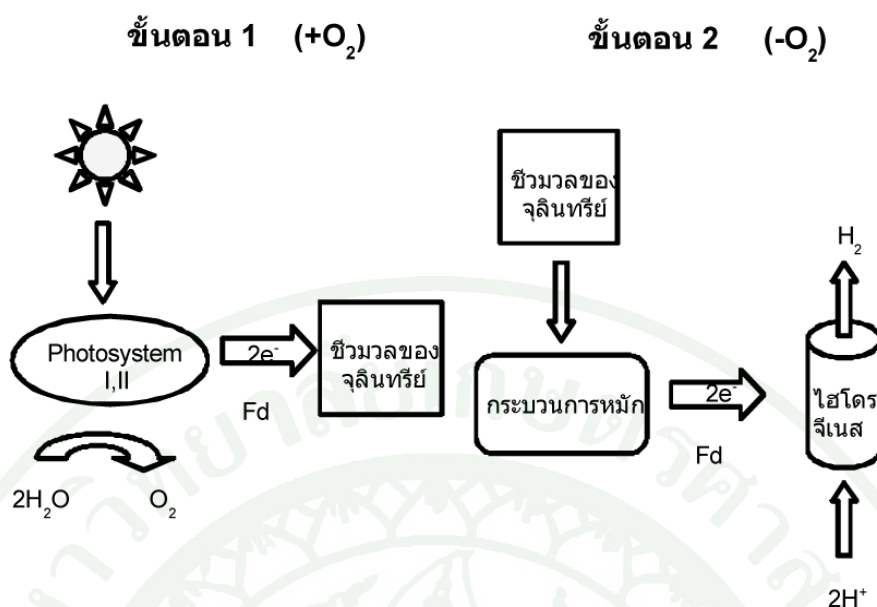
ระบบแสงที่สอง (photosystem II, PSII) ดูดซับพลังงานแสงอาทิตย์ทำให้น้ำแตกตัวเป็นออกซิเจน โปรตรอน ( $H^+$ ) และอิเล็กตรอน ( $e^-$ ) จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์รีดอกซิน (Fd) โดยพลังงานแสงอาทิตย์ที่ถูกดูดซับโดยระบบแสงที่หนึ่ง (photosystem I, PSI) เฟอร์รีดอกซินที่ถูกรีดิวซ์จะส่งอิเล็กตรอนให้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพื่อสร้างไฮโดรเจน ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรง

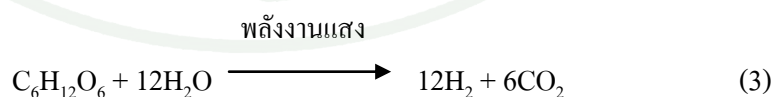
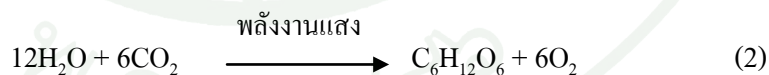
เนื่องจากออกซิเจนมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส จึงมีความจำเป็นต้องรักษาระดับออกซิเจนให้มีค่าต่ำกว่า 0.1% เพื่อให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้อย่างยั่งยืน (Hallenbeck and Benemann, 2002) สาหร่ายสีเขียวหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางตรงได้ เช่น *Chlamydomonas reinhardtii* (Melis *et al.*, 2000) และ *Chlorella fusca* (Winkler *et al.*, 2002)

3.3.2 การแยกสลายด้วยแสงทางอ้อม (Indirect biophotolysis) การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมจะพบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) หรือไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ซึ่งมีคุณสมบัติในการใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนที่แยกออกจากกัน ดังแสดงในภาพที่ 5



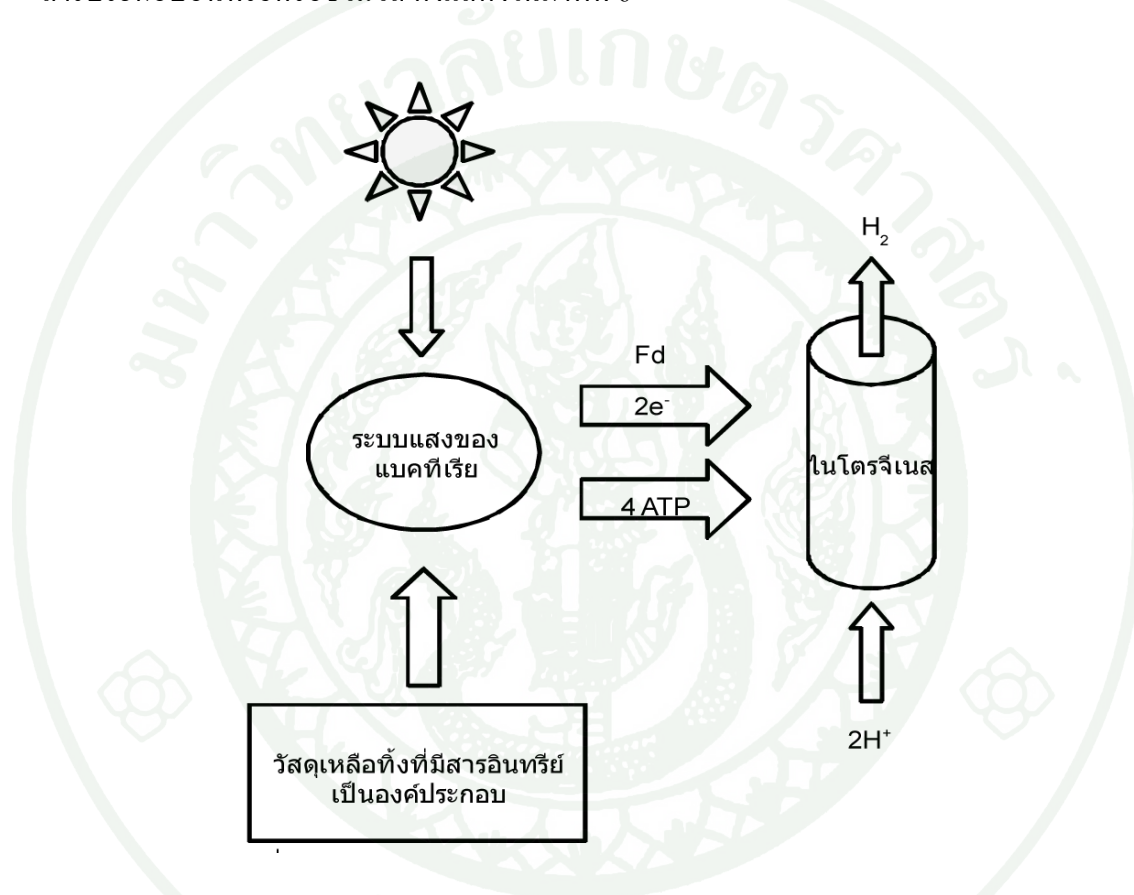
ภาพที่ 5 การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยวิธีการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อม

การผลิตไฮโดรเจนแบบนี้จะสามารถแก้ปัญหาเนื่องจากออกซิเจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผลิตไฮโดรเจน เพราะกระบวนการสร้างออกซิเจนและไฮโดรเจนเกิดแยกกัน โดยในขั้นตอนแรกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะใช้พลังงานแสงผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสงที่หนึ่งและสองร่วมกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรตเก็บสะสมเป็นชีวมวลของสาหร่าย ดังสมการที่ (2) และในขั้นตอนที่สองชีวมวลของสาหร่ายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไฮโดรเจนดังสมการที่ (3) (Levin *et al.*, 2004)



สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหลายชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำโดยการแยกสลายด้วยแสงแบบทางอ้อมได้ เช่น *Gloeocapsa alpicola* (Troshina *et al.*, 2002)

3.3.3 กระบวนการหมักแบบใช้แสง (photofermentation) การผลิตไบโอไฮโดรเจน โดยกระบวนการหมักแบบใช้แสงเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria) โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะประกอบด้วยระบบสังเคราะห์แสงเดียวและไม่สร้างออกซิเจน ซึ่งแตกต่างจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายและพืชชั้นสูง แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะผลิตไฮโดรเจนผ่านเอนไซม์ไนโตรจีเนสภายใต้สภาวะที่ใช้แสงและสารประกอบอินทรีย์หรือชีวมวล ดังแสดงในภาพที่ 6



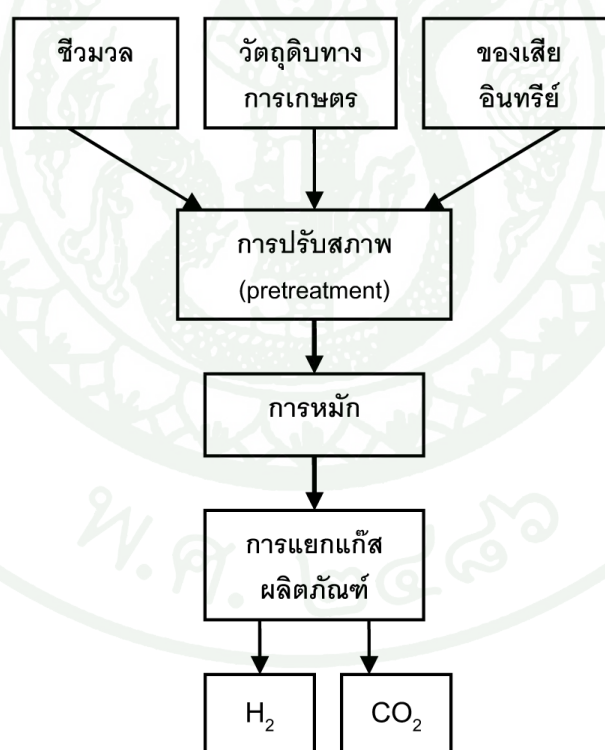
ภาพที่ 6 การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง

ภายใต้สภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะใช้กรดอินทรีย์อย่างง่ายเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยังเฟอร์รีดอกซินโดยพลังงานในรูป ATP ซึ่งอิเล็กตรอน 1 ตัวต้องการพลังงาน 2 ATP จากนั้นเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเพื่อสร้างไฮโดรเจน สมการที่ (4) แสดงการผลิตไฮโดรเจนจากกรดแลกติก



การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสงนั้นสามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด เช่น สารอินทรีย์หลายประเภท ของเสียที่เป็นชีวมวล ไม่ว่าจะเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมหรือจากการเกษตร แบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่สามารถผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก ได้แก่ *Rhodobacter capsulatus* (Ooshima *et al.*, 1998) และ *Rhodospseudomonas capsulate* (Fang *et al.*, 2005)

3.4 กระบวนการแบบไม่ใช้แสง (non light-driven process) การผลิตไบโอไฮโดรเจนด้วยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจะเกิดในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ ซึ่งมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสและสามารถใช้สารตั้งต้นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ชีวมวล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ของเสียจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม ในสภาวะไม่ใช้แสง เพื่อการผลิตไฮโดรเจน ดังแสดงในภาพที่ 7 และมีผลพลอยได้เป็นสารอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และคาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 7 การผลิตไบโอไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง

เมื่อใช้กลูโคส 1 โมล เป็นสารตั้งต้น จะสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล เมื่อมีการดัดแปลงเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังแสดงในสมการที่ (5) หรือผลิตไฮโดรเจนได้ 2 โมล เมื่อมีการดัดแปลงเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ดังแสดงในสมการที่ (6) (Hawkes *et al.*, 2002)



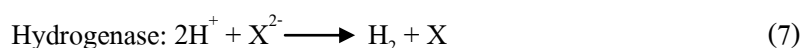
แต่ในทางปฏิบัติ การผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 4 โมล ต่อ กลูโคส 1 โมล ไม่สามารถเกิดขึ้นได้จริง เนื่องจากสารตั้งต้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นชีวมวลของจุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะมีทั้งกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกอยู่ร่วมกัน นอกจากนี้ยังมีสารเมแทบอลิต์อื่นๆ เช่น โพรไพโอนิก แอลกอฮอล์และกรดแลคติก รวมอยู่ด้วย (Levin *et al.*, 2004)

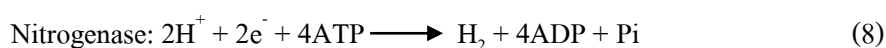
#### 4. กลไกการผลิตไฮโดรเจนแบบไมโครอานาโรบิก

4.1 การผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจนสลายสารอินทรีย์เพื่อให้ได้พลังงานภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เรียกปฏิกิริยาการหมักที่มีไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายว่า การหมักไฮโดรเจน

4.2 บทบาทของการหมักไฮโดรเจน คือ การควบคุมระดับการถ่ายเทอิเล็กตรอนในเซลล์แบคทีเรีย โดยเปลี่ยนพลังงานที่เกินมาเป็นไฮโดรเจน แบคทีเรียสามารถเก็บและใช้ไฮโดรเจนได้ ดังนั้นปฏิกิริยาย้อนกลับที่มีการใช้ไฮโดรเจนควรจะถูกยับยั้ง เพื่อที่จะเป็นการเพิ่มค่าผลผลิตไฮโดรเจน

4.3 ปฏิกิริยาการหมักไฮโดรเจน แบคทีเรียที่ใช้ผลิตไฮโดรเจน แบ่งออกเป็น 2 ชนิด โดยใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน คือ แบคทีเรียที่ใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนส ดังสมการที่ (7) และแบคทีเรียที่ใช้เอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังสมการที่ (8)

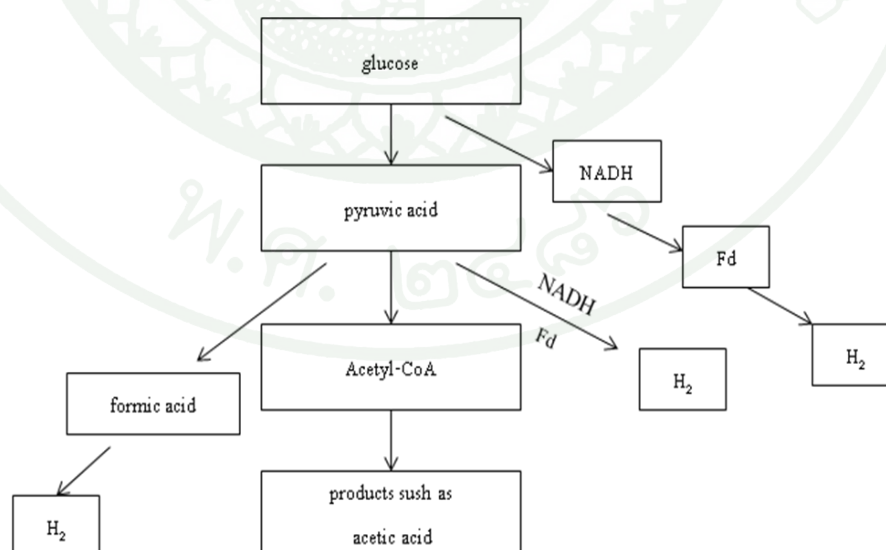




X: ตัวรับส่งอิเล็กตรอน (electron carrier), Pi: ฟอสเฟตอนินทรีย์ (inorganic phosphate)

จากปฏิกิริยาข้างบน ไฮโดรจีเนสจะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาผันกลับและการดูดซึมของไฮโดรเจน นอกจากนี้ ปฏิกิริยาเคมีโดยไฮโดรจีเนสจำเป็นต้องมีพลังงาน (ATP) ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน

จากภาพที่ 8 แสดงวิถีของการหมักไฮโดรเจน โดยไฮโดรเจนเกิดได้หลายทาง ได้แก่ ผ่านทาง NADH และเฟอร์รีดอกซินหรือผ่านทางเฟอร์รีดอกซินเท่านั้น หรือผ่านทางฟอร์มेटไลเอส (formate-lyase) ในการหมักไฮโดรเจน ไฮโดรเจนเกิดจากการย่อยสลายออกซิเดทีฟ (oxidative decomposition) ของสารตั้งต้นอินทรีย์ ดังนั้น การหมักไฮโดรเจนจึงถูกนำมาใช้ในการบำบัดของเสียและน้ำเสียจากการหมักมีเทน หรือตะกอนแบบแรง เนื่องจากการหมักไฮโดรเจนเข้ากันได้กับผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอินทรีย์ อัตราการเกิดปฏิกิริยาการหมักไฮโดรเจนเป็นแบบเร็วเมื่อเทียบกับการหมักมีเทน ซึ่งอาจบ่งบอกได้ว่าการหมักไฮโดรเจนเป็นวิธีการบำบัดขั้นต้นของการหมักมีเทน (สมาคมสารชีวมวลเอเชีย, 2551)



ภาพที่ 8 กลไกการผลิตไฮโดรเจนจากสารตั้งต้นประเภทกลูโคส

#### 4.4 การสร้างกรดอินทรีย์ระเหยง่าย

หลังจากสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ถูกย่อยให้เล็กลง (กระบวนการไฮโดรไลซิส) กลายเป็นสารประกอบอินทรีย์โมเลกุลเล็กและถูกแบคทีเรียสร้างกรดขนส่งเข้าสู่เซลล์ แบคทีเรียที่ทำหน้าที่สร้างกรดในกระบวนการไม่ใช้ออกซิเจนเป็นพวก obligate anaerobes และ facultative แต่แบคทีเรียพวก obligate anaerobes มีจำนวนมากกว่ามาก จึงเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ทำหน้าที่ผลิตกรด ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียหลายๆกลุ่มของ *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Escherichia* และ *Aerobacter* เมื่อสารอินทรีย์ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์แล้วจะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนโดยผ่านกระบวนการหมักภายในเซลล์ เปลี่ยนสารอินทรีย์ที่เข้าสู่เซลล์ให้เป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย คาร์บอนอะตอมไม่เกิน 5 ตัว เช่น กรดอะซิติก โพรพาโอนิก และกรดบิวทิริก เป็นต้น

กระบวนการหมักภายในเซลล์ที่สำคัญมากสำหรับสิ่งมีชีวิต คือ การหมักกลูโคสเป็นไพรูเวตโดยผ่านวิถีทางชีวเคมีที่เรียกว่า Emden-Meyerhof Pathway หรือวิถีไกลโคไลซิส กลูโคสจะถูกออกซิไดซ์กลายเป็นกรดไพรูวิก ดังนี้



แต่ละโมลของกลูโคสจะผลิตกรดไพรูวิก 2 โมล และ ATP 1 โมล โคเอนไซม์  $\text{NAD}^+$  จะถูกใช้เป็นพาหะของอิเล็กตรอนและไฮโดรเจน ทำให้เกิด NADH เนื่องจาก  $\text{NAD}^+$  มีจำกัด จึงต้องมีวิธีปลดปล่อย  $\text{H}^+$  ออกจาก NADH ให้กลายเป็น  $\text{NAD}^+$  ใหม่ เพื่อให้มีพาหะสำหรับขนส่งอิเล็กตรอนตลอดไป โดยปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชันของ  $\text{NAD}^+$  เกิดขึ้นได้ดังนี้



สมการที่ (10) สามารถเกิดขึ้นเองได้ตรงเท่ากับ  $\text{H}_2$  (ในด้านขวาของสมการ) สามารถหนีออกไปจากปฏิกิริยาได้ ถ้าไฮโดรเจนที่อยู่ในบรรยากาศเหนือน้ำมีความดันพาร์เชียลต่ำจนทำให้ไฮโดรเจนละลายน้ำได้น้อยมาก ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในสมการที่ (10) ก็จะหนีจากน้ำสู่บรรยากาศได้ง่าย ทำให้สมการที่ (10) สามารถเกิดจากซ้ายไปขวาได้เอง ทำให้มีการคืนกลับของ  $\text{NAD}^+$  เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง กรดไพรูวิกที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์ต่อไป กลายเป็นอะเซทิลโคเอ ( $\text{CH}_3\text{CoA}$ ) ดังนี้



$\text{NAD}^+$  ทำหน้าที่เป็นตัวพาหะของอิเล็กตรอน  $\text{CH}_3\text{CoA}$  จะถูกย่อยสลายต่อไป กลายเป็นกรดอะซิติก พร้อมกับการสร้าง ATP ดังนี้



เมื่อรวมสมการที่ (10) (11) และ (12) เข้าด้วยกัน จะได้ปฏิกิริยาการหมักที่สมบูรณ์ ดังนี้



การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนของกลูโคส 1 โมล จะได้กรดอะซิติก 2 โมล คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมล ไฮโดรเจน 4 โมล และ ATP 4 โมล ทั้งนี้ ปฏิกิริยาของสมการที่ (13) จะเกิดขึ้นภายใต้บรรยากาศที่ไฮโดรเจนมีความดันพาร์เซิลต่ำมากเท่านั้น เมื่อปฏิบัติการไม่ใช้ออกซิเจนสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจะถูกใช้ผลิตมีเทนโดยแบคทีเรียที่เรียกว่า ผู้บริโภคนไฮโดรเจน เป็นผลทำให้ความดันพาร์เซิลของไฮโดรเจนมีค่าต่ำเสมอ



อย่างไรก็ตามหากมีปัญหาเกิดขึ้นทำให้แบคทีเรียบริโภคนไฮโดรเจนไม่สามารถดำรงอยู่ได้ หรือไม่มีแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ในถังหมักไม่ใช้ออกซิเจน ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นก็จะไม่ถูกนำไปใช้ประโยชน์และมีการสะสมตัวของไฮโดรเจน จนกระทั่งความดันพาร์เซิลมีค่าสูง ผลกระทบจะเกิดขึ้นกับการปลดปล่อย  $\text{H}^+$  ออกจาก  $\text{NADH}$  นั่นคือวิธีการปลดปล่อย  $\text{H}^+$  แบบปกติ สมการที่ (10) จะไม่สามารถเกิดขึ้นเองได้ ต้องใช้วิธีการอื่น คือ สร้างปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเองได้และใช้เป็นปฏิกิริยาควบคู่ในการเปลี่ยน  $\text{NADH}$  ให้กลายเป็น  $\text{NAD}^+$  ปรากฏว่าการเปลี่ยนกรดไพรูวิกให้กลายเป็นกรดไพรูฟอนิก สามารถทำให้  $\text{NADH}$  ปลดปล่อย  $\text{H}^+$  ได้ดังนี้



จะเห็นได้ว่าการลดไพรูวิกเพียง 1 โมลสามารถใช้ปลดปล่อย  $H^+$  จาก NADH 2 โมล ซึ่งได้จากการย่อยสลายกลูโคสในขั้นตอนแรกของปฏิกิริยาการหมัก แต่กลูโคส 1 โมลใช้ผลิตกรดไพรูวิกได้ 2 โมล จึงยังมีกรดไพรูวิกเหลืออีก 1 โมล ซึ่งจะถูกย่อยสลายเป็น  $CH_3CoA$  ตามปกติ ดังนี้



ขั้นตอนนี้ถ้าความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนมีค่าต่ำ การปลดปล่อย  $H^+$  จาก NADH จะเกิดดังสมการที่ (16) แต่ถ้าความดันพาร์เชียลมีค่าสูง การปลดปล่อย  $H^+$  จะต้องเกิดขึ้นควบคู่กับการเปลี่ยน  $CH_3CoA$  ให้เป็นกรดอะซิติก ดังนี้



เมื่อรวมสมการ (9) (11) (16) และ (17) เข้าด้วยกันจะได้สมการการหมักที่ใช้ย่อยสลายกลูโคส 1 โมลภายใต้สภาวะหรือบรรยากาศที่ความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนมีค่าสูง ดังนี้



นั่นคือแต่ละโมลของกลูโคสสามารถผลิตกรดอะซิติก 1 โมล โพรไพโอนิก 1 โมล คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมล ไฮโดรเจน 1 โมล และ ATP 3 โมล เมื่อเปรียบเทียบสมการที่ (14) และ (15) จะเห็นได้ว่าการย่อยแบบไม่ใช้อากาศ ภายใต้สภาวะที่มีความดันพาร์เชียลต่ำจะให้ ATP 4 โมล และผลิตกรดอะซิติก 2 โมล (ไม่มีกรดพริออนิกเกิดขึ้น) แต่ถ้าความดันพาร์เชียลของไฮโดรเจนสูงจะได้ ATP เพียง 3 โมล และสร้างกรดอะซิติกและโพรไพโอนิกอย่างละ 1 โมล (กรมควบคุมมลพิษ, 2546)

## 5. การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยโครงสร้างอันซับซ้อนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารอื่นๆ ซึ่งในการนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต ไฮโดรเจนจำเป็นต้องย่อยเซลลูโลสให้อยู่ในรูปของน้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ โดยอาศัย กระบวนการที่เรียกว่า การปรับสภาพ (pretreatment) คือ การเปลี่ยนหรือกำจัดโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆที่เป็นสิ่งกีดขวางต่อกระบวนการย่อยเซลลูโลสส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยดีขึ้น และผลผลิตของน้ำตาลที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้น ดังนั้นการปรับสภาพจึงถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการ เปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส วัตถุประสงค์ของกระบวนการปรับสภาพคือ กำจัดลิกนิน เฮมิเซลลูโลสออก ลดโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนของวัตถุดิบ กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสสามารถแบ่งออกได้ 4 กระบวนการหลัก ดังนี้

5.1 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางกายภาพ (physical pretreatment) โดยการใช้ แรงกล เช่น การบด การตัด เป็นต้น

5.2 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมีกายภาพ (physico-chemical pretreatment) เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion) เป็นต้น

เทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภท ลิกโนเซลลูโลส (McMillan, 1994) จุดประสงค์เพื่อแยกองค์ประกอบของวัสดุจำพวกไม้และวัสดุ เศษเหลือทิ้งทางการเกษตร วัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการ ไฮโดรไลซิส ต่อมาเมื่อมีการศึกษาและปรับปรุงเทคโนโลยีนี้จนสามารถออกแบบเครื่องระเบิดไอน้ำให้ ทำงานได้ทั้งในรูปของกระบวนการทำงานเป็นครั้ง (batch) และการทำงานต่อเนื่อง (continuous) ด้วยระยะเวลาในการระเบิดด้วยไอน้ำไม่เกิน 10 นาที ไอน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูง จะสามารถ สกัดแยกเฮมิเซลลูโลสออกจากส่วนผสมของเซลลูโลสและลิกนิน ต่อมาจึงทำการแยกเซลลูโลส ออกจากลิกนินในภายหลัง ด้วยสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นเทคนิคการระเบิดด้วย ไอน้ำจึงช่วยในการแยกองค์ประกอบต่างๆของไม้ให้อยู่ในรูป เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสและลิกนิน ก่อนนำไปทำเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับผลิตสารที่มีมูลค่าสูงต่อไปตัวแปรสำคัญของเทคนิคการ

ระเบิดด้วยไอน้ำ คือ อุณหภูมิของไอน้ำและระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด โดยจะทำการรวมตัวแปรทั้งสองให้เป็นตัวแปรเดียวกัน เรียกว่า “ค่าแฟกเตอร์ของความรุนแรง (severity factor, Ro)” ดังความสัมพันธ์นี้

$$Ro = \int_0^t \exp [(T-100)/14.75] dt$$

$$\text{หรือ } \log Ro = \log \{ t \exp [(T-100)/14.75] \}$$

เมื่อ Ro คือ ค่า severity factor

t คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด (นาที)

T คือ อุณหภูมิของไอน้ำ (องศาเซลเซียส)

หลักการการทำงานของเทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ น้ำจากถังน้ำ (water tank) ถูกส่งไปยังถังให้ความร้อน (heater tank) ซึ่งจะมีการให้ความร้อนเกิดขึ้นเพื่อให้น้ำกลายเป็นไอน้ำตามอุณหภูมิหรือความดันที่ต้องการ ไอน้ำถูกส่งต่อไปยังวาล์ว ซึ่งเป็นจุดควบคุมความดันที่ปล่อยเข้าสู่ถังทำปฏิกิริยาที่บรรจุตัวอย่างขึ้นไม้สับอยู่ เมื่อเปิดวาล์ว ไอน้ำเข้าสู่ถังทำปฏิกิริยา จากนั้นจับเวลา ความดันนั้นและควบคุมความดันไอน้ำให้คงที่ตลอดเวลาโดยการปรับปล่อยวาล์ว เมื่อครบเวลาที่กำหนดเปิดวาล์วที่เชื่อมระหว่างถังทำปฏิกิริยา และถัง receiver ความดันจะดันตัวอย่างขึ้นไม้สับที่อยู่ในถังทำปฏิกิริยาไปยังถัง receiver หลังจากนั้นระบายความดันออกจากถัง receiver โดยค่าที่ ball valve จะเป็นตัววัดความดันในเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ รอจนกระทั่งค่าความดันใน ball valve เป็นศูนย์ซึ่งแสดงว่าความดันภายในถังไม่มี จากนั้นจึงทำการเปิดฝาทัน receiver ออกเพื่อเอาน้ำและเชื้อหลังระเบิดออกมา (พิชญ์, 2549)

Li and Chen (2007) นำฟางข้าวโพดที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำมาเข้าสู่กระบวนการ saccharification และ fermentation พร้อมกัน เพื่อผลิตไฮโดรเจน ฟางข้าวโพดที่ใช้จะผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 บาร์ (1.5 MPa) นาน 10 นาที และทำการหมักแบบกะที่ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้ฟางข้าวโพดที่ผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำแล้ว 10 กรัม ต่อการหมักแต่ละกะ เมื่อเปรียบเทียบการหมัก 2 ประเภท คือ การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ก่อนการหมัก

(pre-enzymolysis) และ การย่อยด้วยเอนไซม์พร้อมกับการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation) พบว่าการหมักแบบ Pre-enzymolysis ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าเล็กน้อย แต่ระยะ lag-stage ยาวและอัตราการเกิดไฮโดรเจนจำเพาะน้อยกว่าและช้ากว่า

Holtzaple *et al.* (1991) ใช้แอมโมเนียที่อุณหภูมิสูงให้ความดันสูงระยะหนึ่ง แล้วทำการลดความดันลง 1-2 กรัม แอมโมเนียต่อกรัม น้ำหนักแห้งที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สูญเสียไซแลนน้อยกว่าการระเบิดด้วยกรดไม่มีการสร้างสารยับยั้ง

5.3 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมี (chemical pretreatment) เช่น การใช้กรด (acid hydrolysis) การใช้ด่าง (alkaline hydrolysis) การใช้สารละลายอินทรีย์ (organosolve) เป็นต้น การปรับสภาพด้วยกรดนั้นเพื่อให้ได้น้ำตาลปริมาณสูงจากวัสดุชีวมวล สามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจางเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายของกระบวนการไฮโดรไลซิส (Palmqvist *et al.*, 1996)

Lu *et al.* (2007) ปรับสภาพข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริก ( $H_2SO_4$ ) เข้มข้นร้อยละ 2.4 และ 6 ที่ 80 100 และ 120 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมอยู่ที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 2 ที่เวลา 43 นาที อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงถึงร้อยละ 77 ในขณะที่ให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสเพียงร้อยละ 8.4

การปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 3.419 กรัมต่อลิตรของสารละลายกรด จากผลการทดลองสามารถคาดการณ์ว่า หากใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นในการไฮโดรไลซิสจะทำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น (Karimi *et al.*, 2006)

สำหรับการปรับสภาพด้วยด่าง กลไกการทำงานของด่างจะไปเพิ่มการพองตัวของโมเลกุลภายในต่อสายพันธะภายในของไซแลนในเฮมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้ เมื่อทำการกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อกันภายใน การใช้ด่างเจือจางในวัสดุกลีโนเซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายในเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยา ทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส (McMillan, 1994)

Kim and Holtzaple (2005) ทำการปรับสภาพต้นข้าวโพดด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อัตรา 0.5 กรัมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัมมวลชีวภาพสด ในสถานะที่ไม่ออกซิเดชันและ ออกซิเดชันที่อุณหภูมิ 25 35 45 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่าสถานะที่เหมาะสมคือ การปรับสภาพ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พร้อมด้วยการเติมอากาศ ทำให้กลูแคนร้อยละ 91.3 และไซแลนร้อยละ 51.8 ถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ตามลำดับ เมื่อไฮโดรไลซ์ต้น ข้าวโพดที่ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 15 เอฟฟิยูต่อกรัมเซลลูโลส ลิกนินเริ่มต้นประมาณ ร้อยละ 87.5 รวมถึงกลุ่มอะซิดิลเกือบทั้งหมดก็ถูกกำจัดไปด้วย

5.4 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biological pretreatment) โดยการใช้ เชื้อจุลินทรีย์จำพวกรา เช่น ราขาว ราน้ำตาล เป็นต้น เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยน โครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก (Costa *et al.*, 2002)

กระบวนการปรับสภาพจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้มีความเหมาะสมต่อกระบวนการย่อย กระบวนการ ปรับสภาพมีหลายกระบวนการ ซึ่งแต่ละกระบวนการนั้นก็ส่งผลต่อโครงสร้างของวัตถุดิบ ประเภทลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกกระบวนการปรับสภาพมาใช้ในการปรับปรุง หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบนั้นจำเป็นต้องทราบถึงชนิดของวัตถุดิบ โครงสร้างทางเคมี และองค์ประกอบอื่นๆ ของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดเสียก่อน แล้วจึงทำการเลือก กระบวนการปรับสภาพให้เหมาะสมทั้งนี้เพื่อประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลส นอกจากนี้ยังต้อง คำนึงถึงค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการดำเนินการประกอบกับการตัดสินใจในการเลือกใช้วิธีการปรับสภาพ เพื่อให้ประหยัดและเหมาะสมที่สุด (ภูมิหทัย และประมุข, 2554)

## 6. การไฮโดรไลซิส

กระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis process) เป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับการเปลี่ยน แปลงเซลลูโลสเป็นน้ำตาล ปกติสามารถทำได้โดยการใช้กรดหรือเอนไซม์ แต่ปัจจุบันกระบวนการ ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยม เพราะเมื่อเทียบกันแล้วการ ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์มีความเฉพาะเจาะจงมากกว่าและรุนแรงน้อยกว่า จึงไม่ทำให้น้ำตาลที่ได้ จากกระบวนการลดน้อยลง (Sun and Cheng, 2005) ในปัจจุบันมีเทคโนโลยี 2 แบบที่ได้รับการ

พัฒนาคือ การใช้เอนไซม์และวิธีการเปลี่ยนจุลินทรีย์โดยตรงการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจะเป็นขั้นตอนที่ช้ามากเพราะจะถูกขัดขวางโดย ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และผลึกของเซลลูโลส จึงต้องมีการปรับสภาพชีวมวลด้วยวิธีที่เหมาะสมก่อนเพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลส ลิกนินและลดผลึกของเซลลูโลส นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มความสามารถในการเข้าถึงของเอนไซม์ (Pan *et al.*, 2004)

การย่อยเซลลูโลสขั้นต้นเกิดจากการที่โมเลกุลของเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้แต่ข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์เกิดจากการที่สับสเตรทละลายน้ำได้น้อย เมื่อย่อยได้ก็จะถูกย่อยต่อจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลโมเลกุลคู่

กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็น prohydrolytic step คือสายโซ่ anhydroglucose จะถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นที่สอง เกิด hydrolytic cleavage ของสายโพลีเมอร์ กลไกการทำงานเริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดบวมตัว (swelling) พร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ endoglucanase และ exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระ ส่วน exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลายซึ่งถูกย่อยสลายต่อไปโดย  $\beta$ -glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ (Fan *et al.*, 1987)

กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์มีการทำงานอยู่ 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกการดูดซับเอนไซม์เซลลูเลสบนพื้นผิวของเซลลูโลส ขั้นสองเกิดการย่อยสลายทางชีววิทยาเพื่อให้เกิดการหมักของน้ำตาลและสุดท้ายการดูดซับของเซลลูเลสเกิดขึ้นจนกว่าจะไม่สามารถทำงานได้อีก การทำงานของเซลลูเลสจะลดลงระหว่างที่เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส

6.1 เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ 3 ชนิด ที่ทำงานร่วมกันแบบ “synergistic action” ได้แก่

6.1.1 เอ็นโดกลูคาเนส (endoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์และยังย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (reducing end) ของสายโซ่เซลลูโลส

6.1.2 เอ็กโซกลูคาเนส (exoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์และเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส ตำแหน่งที่ทำงานเป็นแบบสุ่ม (random)

6.1.3 เบต้า-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นดังนี้ เบต้า-กลูโคซิเดสจะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นซึ่งจะมีผลยับยั้งต่อเนื่อง คือทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสและเอ็กโซกลูคาเนส ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด (Selby and Maitland, 1967)

## 6.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

6.2.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารเริ่มต้น การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะต้องมีการรวมตัวกันของเอนไซม์-สารเริ่มต้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของโมเลกุลทั้งสองถ้ามีสารเริ่มต้นพอเพียง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นสองเท่าจะทำให้อัตราเร็วเพิ่มขึ้นไปเป็น 2 เท่าด้วย แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อไปเรื่อย ๆ อัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นแนวระนาบเพราะสารเริ่มต้นเริ่มหมดไป ทำให้เป็นตัวจำกัดการเกิดปฏิกิริยาได้ อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของโมเลกุล ซึ่งจะชนกันมากขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์หรือสารเริ่มต้นมากขึ้น

อัตราการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นนั้น ถ้าให้เอนไซม์เป็นตัวคงที่และเพิ่มปริมาณสารเริ่มต้นขึ้นเรื่อยๆ นั้น ปฏิกิริยาได้เป็น 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของสารเริ่มต้น

ระยะที่ 2 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มลดลงเนื่องจากปริมาณของเอนไซม์เริ่มเป็นตัวจำกัด

### ระยะที่ 3 อัตราเร็วถึงจุดอิ่มตัว

6.2.2 ความเป็นกรดค่า (pH) ของสารละลายจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ในหลายด้าน ตามปกติเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่าความเป็นกรดค่าที่เหมาะสมในการทำงาน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดค่าสูงหรือต่ำกว่าจุดที่เหมาะสม ค่าความเป็นกรดค่าที่เหมาะสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 6-8 การที่มีค่าความเป็นกรดค่าสูงหรือต่ำมาก จะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ

6.2.3 อุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้พลังงานจลน์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วย อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (optimum temperature) เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เซลล์จะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส

6.2.4 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (reaction product) อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สามารถวัดได้จากอัตราการหายไปของสารเริ่มต้นหรืออาจจะวัดจากการปรากฏขึ้นของผลิตภัณฑ์ หรือทำทั้ง 2 วิธีพร้อมกัน แต่ไม่ว่าจะวัดโดยวิธีใด จะพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดช้าลงนี้ เป็นเพราะเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังเกิดเพราะมีการลดลงของสารเริ่มต้น และผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มากขึ้นจนถึงความเข้มข้นหนึ่ง อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ (reversibility) โมเลกุลของผลิตภัณฑ์จะรวมกับเอนไซม์แทนสารเริ่มต้นทำให้ปฏิกิริยาถูกจำกัดได้

6.2.5 สารระงับการทำงานของเอนไซม์ (inhibitors) มีสารหลายชนิดที่สามารถระงับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ สารเหล่านี้ อาจจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น โลหะหนักต่าง ๆ หรือ อาจจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic) หรือ โปรตีน แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

ก. competitive inhibitor เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารเริ่มต้นมาก และเข้าแย่งทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง (active site) ของ

เอนไซม์ เมื่อเกิดการรวมกันเป็นเอนไซม์-สารยับยั้ง (enzyme-inhibitor) จะทำให้ปริมาณของเอนไซม์ลดลง ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงสารชะงักเหล่านี้อาจจะเปลี่ยนหรือไม่เปลี่ยนไปได้ การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นให้มากขึ้นจะลดผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ตัวอย่างของสารยับยั้ง คือ การที่มาโลเนต (malonate) แย่งทำปฏิกิริยากับซักซิเนตไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ปกติจะทำปฏิกิริยากับ ซักซิเนต (succinate) ได้ฟูมาเรต (fumarate) ซึ่งปรากฏในการหายใจ ซึ่งเมื่อมาโลเนต (malonate) รวมกับเอนไซม์แล้วทำให้การหายใจเกิดไม่ได้

ข. non competitive inhibitor สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะเข้าร่วมกับเอนไซม์แต่จะไม่รวมที่บริเวณเร่ง (active site) สารพวกนี้มีลักษณะต่างจากสารเริ่มต้น การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นจะไม่สามารถลบล้างผลของสารเหล่านี้ได้ โลหะที่เป็นพิษทั้งหลายและสารที่รวมหรือทำลายกลุ่มซัลไฟไฮดริลมักจะเป็นสารในกลุ่มนี้ เช่น การที่มีออกซิเจนมากจะทำให้ -SH ถูกออกซิไดซ์ เกิดไดซัลไฟด์บริดจ์ขึ้นมา ซึ่งทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปทำให้บริเวณเร่งรวมกับสารเริ่มต้นไม่ได้ ส่วนโลหะ เช่น  $Hg^{+2}$  และ  $Ag^{+}$  จะเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของกลุ่มซัลไฟไฮดริลเกิดเป็นเมอแคปไทด์ (mercaptides) ซึ่งไม่ละลายน้ำ

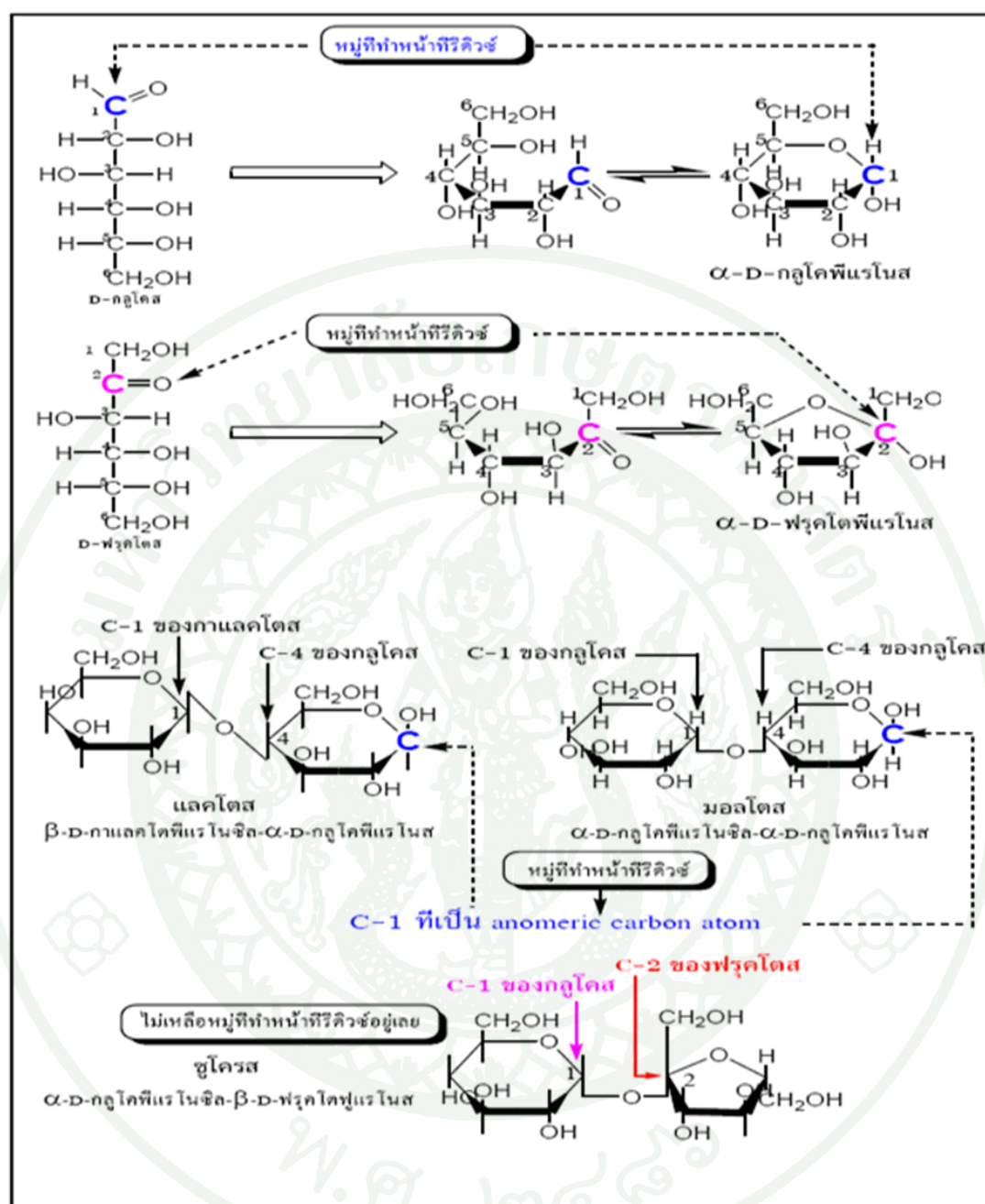
ค. uncompetitive inhibitor สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ไม่รวมกับเอนไซม์อิสระไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์และสารเริ่มต้น แต่จะเข้าร่วมกับเอนไซม์สารเริ่มต้น ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ การชะงักการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีสารเริ่มต้นมากขึ้น สารชะงักชนิดนี้มักจะพบในปฏิกิริยาซึ่งมีสารเริ่มต้นสองชนิด (คณัย, 2539)

## 7. น้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugar)

น้ำตาลรีดิวซิง คือ ส่วนของหมู่อัลดีไฮด์/คีโตนของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว นอกจากจะสามารถรับอิเล็กตรอน (หรือที่เรียกว่าถูกรีดิวซ์) กลายเป็นน้ำตาลอัลกอฮอล์แล้วหมู่ฟังก์ชันนัลทั้งสอง (ซึ่งหมายถึง หมู่อัลดีไฮด์/คีโตนที่ตำแหน่ง C-1/ C-2 ของสูตรโครงสร้างแบบเส้นตรงของน้ำตาลอัลโดส/คีโตสและตำแหน่ง C-1/ C-2 ที่เป็น anomeric carbon atom ที่อยู่ในรูปเฮมิอะซิตาลและเฮมิคีตาลของสูตรโครงสร้างแบบวงแหวนของน้ำตาลอัลโดส/คีโตส) ยังสามารถให้อิเล็กตรอนเพื่อไปรีดิวซ์สารอื่นได้ จึงมักเรียกน้ำตาลใดๆ ที่มีฤทธิ์ดังกล่าวว่า น้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) หมายถึงว่า น้ำตาลชนิดนั้นสามารถไปรีดิวซ์สารอื่นได้ ดังนั้นถ้าพิจารณาจากสูตร โครงสร้างถ้าหากหมู่ฟังก์-

ชั้นน้ำตาลทั้งสองยังคงไม่ได้ถูกแทนที่ด้วยสารอื่นอยู่ น้ำตาลนั้นก็ยังคงมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์อยู่ นั่นหมายถึง น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทุกชนิด น้ำตาลโมเลกุลคู่เกือบทุกชนิด ยกเว้นซูโครส (sucrose) จัดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งสิ้น ดังแสดงในภาพที่ 9

ในปัจจุบันมีการนำคุณสมบัตินี้มาใช้เป็นแบบทดสอบว่าในสารละลายตัวอย่างใดๆ ไม่ว่าจะเป็นน้ำเหลืองหรือปัสสาวะของผู้ป่วยมีน้ำตาลอยู่หรือไม่ โดยการนำมาทำปฏิกิริยากับสารเคมีจำเพาะ เช่น สารละลายเบนเนดิกต์ (Benedict's solution) ซึ่งมักจะมีคอปเปอร์ไอออน ( $\text{Cu}^{2+}$ ) เป็นองค์ประกอบ ถ้าพบว่าการรีดิวซ์  $\text{Cu}^{2+}$  ให้เป็น  $\text{Cu}^+$  นั้นก็แสดงว่ามีน้ำตาลอยู่ในสารละลายตัวอย่างนั้นๆ (ปนัดดา, 2553)



ภาพที่ 9 ลักษณะของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ พร้อมแสดงให้เห็นถึงหมู่ที่ทำหน้าที่รีดิวซ์ รวมทั้งชี้ให้เห็นถึงลักษณะโครงสร้างของ ซูโครส ซึ่งจัดเป็นน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (nonreducing sugar)

## 8. เชื้อจุลินทรีย์และการปรับสภาพ

### 8.1 เชื้อจุลินทรีย์

8.1.1 เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ (pure culture) มีเป็นจำนวนมากที่ถูกใช้ในการผลิตไฮโดรเจน เช่น *Clostridium* *Enterobacter* *Escherichia* *Pseudomonas* *Thermoanaerobacterium* *Thermotoga* และ *Citrobacter* เป็นต้น โดย *Clostridium* และ *Enterobacter* เป็นเชื้อที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด ซึ่งในงานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์สำหรับการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น แต่ความต้องการในการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์กับสารตั้งต้นที่เป็นของเสียอินทรีย์ก็มีขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพราะมีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะนำไปใช้ได้จริงกับภาคอุตสาหกรรมที่มีเป้าหมายที่จะลดของเสียและนำไปใช้เพื่อการผลิตพลังงาน (Wang and Wan, 2009)

8.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ผสม (mixed cultures) ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ มีอยู่อย่างกว้างขวางในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำเสียกากตะกอน ปุ๋ยหมักและอื่น ๆ ดังนั้นวัสดุเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตไฮโดรเจน ปัจจุบันเชื้อผสมของจุลินทรีย์จากกากตะกอนแบบไร้อากาศ กากตะกอนน้ำเสียในเขตเทศบาลเมือง ปุ๋ยหมักและดินได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตไฮโดรเจน (Li and Fang, 2007)

แต่อย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้เชื้อผสมไฮโดรเจนที่ถูกผลิตขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตไฮโดรเจน (hydrogen-producing) อาจจะถูกบริโภคโดยแบคทีเรียที่บริโภคไฮโดรเจน (hydrogen-consuming) ดังนั้นเพื่อที่จะใช้ประโยชน์ไฮโดรเจนจากกระบวนการหมัก จึงควรทำการปรับสภาพเชื้อผสมโดยวิธีการบางอย่างก่อนเพื่อเป็นการยับยั้งกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์บริโภคไฮโดรเจนในขณะเดียวกันก็ส่งเสริมกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตไฮโดรเจนด้วย

### 8.2 การปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์

นอกจากปรับสภาพยับยั้ง (จีเลอ) แล้วยังต้องทำการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์หรือกากตะกอนที่ใช้ในกระบวนการหมักด้วย เพื่อเตรียมเชื้อให้มีความพร้อมในการผลิตไฮโดรเจนและ

ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตมีเทน (methanogen) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนสูงขึ้นด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การปรับสภาพด้วยกรด การปรับสภาพด้วยด่าง และการปรับสภาพด้วยความร้อน เป็นต้น

งานวิจัยของ Ren *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาวิธีการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์จากโรงบำบัดน้ำเสียชุมชน และกลุ่มจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการปรับสภาพ เพื่อการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้วิธีในการปรับสภาพทั้งหมด 5 วิธี คือ การปรับสภาพด้วยความร้อน กรด เบส และการเติมอากาศ พบว่าการปรับสภาพด้วยวิธีการเติมอากาศเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนมากที่สุด ผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้เท่ากับ 1.96 โมลต่อโมลกลูโคส

สำหรับงานวิจัยของ Wang and Wan (2008) เปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 5 วิธี ได้แก่ การปรับสภาพด้วยกรด เบส ความร้อน การเติมอากาศ และคลอโรฟอร์ม ผลคือการปรับสภาพด้วยความร้อนเป็นวิธีที่ดีที่สุด โดยอัตราการผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 221.5 มิลลิลิตรต่อกรัมกลูโคส

จากการศึกษาผลกระทบของการปรับสภาพกากตะกอนจากน้ำเสียซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนด้วยวิธีต่างๆ ที่มีผลไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น พบว่าการปรับสภาพด้วยกรด ด่าง ความร้อน และอัลตราโซนิก สามารถเพิ่มค่าซีโอดีที่ละลายได้ (soluble chemical oxygen demand) ของตะกอนและผลผลิตไฮโดรเจนได้อย่างมีนัยสำคัญทั้ง 4 วิธี โดยการปรับสภาพด้วยด่างให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 11.68 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมของแข็งระเหย ซึ่งการปรับสภาพกากตะกอนด้วยด่างและความร้อนสามารถยับยั้งการกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ผลิตมีเทนได้อย่างสมบูรณ์ในขณะที่การปรับสภาพด้วยกรดและอัลตราโซนิกทำไม่ได้ (Yi and Xin, 2009)

สำหรับการศึกษาการปรับสภาพเชื้อที่ผลิตมีเทนเพื่อทำการหมักไฮโดรเจนของ Hu and Chen (2007) โดยวิธีการใช้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ ร้อยละ 5 2.5 1 0.5 0.25 และ 0.05 ปรากฏว่าการใช้คลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 มีประสิทธิภาพการปรับสภาพมากกว่าการปรับสภาพด้วยกรดและความร้อน เพราะคลอโรฟอร์มสามารถกำจัดจุลินทรีย์ที่ผลิต

มีเทนได้สมบูรณ์ แต่ไม่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมในการผลิตไฮโดรเจนและยัดกิจกรรมของโฮโมอะซิโตเจน (homoacetogens) ออกไปอีก

## 9. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

### 9.1 อุณหภูมิ (temperature)

การย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ 2 ช่วง คือ อุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ทำงานในช่วงนี้เรียกว่า mesophilic bacteria และอุณหภูมิระหว่าง 50-60 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ทำงานในช่วงนี้เรียกว่า thermophilic bacteria อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้กิจกรรมการผลิตไฮโดรเจนเกิดได้ดีขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังทำให้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 20 องศาเซลเซียส เป็น 35 องศาเซลเซียส แต่มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 35 องศาเซลเซียส เป็น 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ความเข้มข้นของกรดบิวทริกและโพรไพโอนิกจะมีการเปลี่ยนแปลงมากเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 35 องศาเซลเซียส เป็น 55 องศาเซลเซียส (Wang and Wan, 2008) แต่การหมักอุณหภูมิที่สูงมีข้อเสียคือ thermophilic bacteria ทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ไม่ดีเท่า mesophilic bacteria (มงคล, 2547)

### 9.2 ความเป็นกรดด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรดด่างเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน เพราะจะส่งผลต่อกิจกรรมไฮโดรจีเนสตลอดจนกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนอาจมีค่าต่างกันได้ เนื่องจากการแตกต่างกันของเชื้อจุลินทรีย์ สารตั้งต้นที่ใช้ รวมไปถึงช่วงความเป็นกรดด่างที่ทำการศึกษา (Wang and Wan, 2009)

Khanal *et al.* (2004) ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม คือ 4.5 ได้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (346 มิลลิลิตรต่อกรัมแป้ง) โดยใช้ rice slurry เป็นซับสเตรทหมักกับกากตะกอนบ่อหมักแบบไร้อากาศ ช่วงความเป็นกรดด่างที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 4.0-7.0

งานวิจัยของ Mu *et al.* (2006) ใช้เชื้อผสมในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน มีจุลินทรีย์เป็น  
 ชับสเตรท ช่วงความเป็นกรดต่างที่ทำการศึกษาคือ 3.4-6.3 พบว่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม  
 เท่ากับ 4.2 ส่งผลให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 1.61 โมลต่อโมลกลูโคส

การหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจนด้วยกากตะกอนแบบไร้อากาศ มีจุลินทรีย์เป็นซับสเตรท  
 ช่วงความเป็นกรดต่างที่ศึกษาอยู่ระหว่าง 4.5-6.5 พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม คือ 5.5 ให้  
 ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 252 มิลลิลิตรต่อกรัมจุลินทรีย์ (Mu *et al.*, 2006)

### 9.3 กรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acid: VFAs)

การเกิดกรดไขมันระเหยง่ายจากกระบวนการหมักจะส่งผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้  
 ตามชนิดของกรดที่เกิดขึ้น โดยการหมักที่เกิดกรดอะซิติก และ กรดบิวทิริก จะทำให้เกิด  
 ไฮโดรเจนขึ้นจากกระบวนการผลิตกรด แต่หากเกิดกรดโพรไพโอนิกจะทำให้ไฮโดรเจนในระบบ  
 ลดลง นอกจากนี้ถ้ามีกรดไขมันระเหยง่ายสะสมอยู่มากจะทำให้สภาวะในการหมักเป็นกรด ทำให้  
 กิจกรรมและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะของความเป็นกรดต่างในขณะนั้น  
 ส่งผลทำให้การเกิดก๊าซไฮโดรเจนเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Ruggeri *et al.*, 2009)

### 9.4 สารอาหาร (nutrients)

สารอาหารแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือสารอาหารหลัก เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน และ  
 ฟอสฟอรัส เป็นต้น และสารอาหารรอง เช่น เหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม และสังกะสี เป็นต้น ถ้า  
 หากมีอัตราส่วน C:N และ C:P ที่เหมาะสมก็จะส่งผลดีต่อการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากเป็นสาร  
 อาหารที่สำคัญและจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Bisaiillon *et al.*, 2006) สำหรับสารอาหารรองก็มีความสำคัญ เช่น เหล็ก ถ้ามากเกินไปก็จะยับยั้งการทำงานของ  
 จุลินทรีย์ แต่ก็ยังเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Li and Fang, 2007)

### 9.5 ระยะเวลาในการกักเก็บในระบบ (hydraulic retention time: HRT)

ระยะเวลาในการกักเก็บเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมประสิทธิภาพของระบบการย่อยสลาย  
 สารอินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน อัตราการย่อยสลายจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการกักเก็บ

ส่งผลให้มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งแล้วการลดลง เนื่องจากเกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มผลิตก๊าซมีเทนที่ใช้ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในการเจริญทำให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนลดลง (มงคล, 2547)

## 10. เทคนิคระดับโมเลกุล (Polymerase Chain Reaction: PCR) และ เทคนิคการแยกความแตกต่างของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยตัวกลางเป็นเจล (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE)

10.1 เทคนิคระดับโมเลกุล (PCR) คือ ปฏิกริยาที่มีการสร้างสาย nucleotide ต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ถือได้ว่าเป็นเทคนิค ที่มีผลกระทบอย่างมากต่องานทางโมเลกุล ตั้งแต่ปี 1985 ที่ Kary Mullis คิดค้นขึ้นมา เพราะทำให้เราสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ได้มหาศาลจากจำนวนเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย ภายในเวลาไม่นาน ด้วยหลักการง่ายๆ

### 10.1.1 ส่วนประกอบของพีซีอาร์

- ก. template คือ ต้นฉบับของ ดีเอ็นเอ ที่เราต้องการจะเพิ่มจำนวน
- ข. primers คือ สายดีเอ็นเอที่เป็น single strand ที่จับคู่ได้กับปลายของเทมเพลต (template) ทั้งสองด้าน โดยจะมีด้าน 3' เป็นกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่จะสามารถต่อกับ nucleotides อื่นได้
- ค. polymerase คือ เอนไซม์ที่จะใช้เพื่อการต่อสายของ ดีเอ็นเอ
- ง. nucleotides ทั้ง 4 ตัว (A-adenine, C-cytosine, G- guanine, T-thymine) ที่เอาไว้ต่อกันเป็นดีเอ็นเอสายใหม่
- จ. PCR machine คือ เครื่องมือที่ใช้สำหรับปรับเปลี่ยนอุณหภูมิไปมา

### 10.1.2 ขั้นตอนพื้นฐานของพีซีอาร์

ปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่วนไปวนมา 30 ถึง 40 รอบ ในเครื่อง thermocycler คือ

ก. denaturation: ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นการทำลายพันธะระหว่างนิวคลีโอไทด์ ทำให้สายดีเอ็นเอที่ม้วนเกลียวอยู่เป็นคู่แยกออกจากกันเป็นเส้นตรง 2 เส้น และที่อุณหภูมินี้ปฏิกิริยาต่างๆจากเอนไซม์ในรอบก่อนหน้านี้จะหยุดลงหมด

ข. annealing: ที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ถึง 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์ไปเกาะติดกับเทมเพลต เพื่อเตรียมตัวตั้งต้นต่อสายคู่ของเทมเพลต

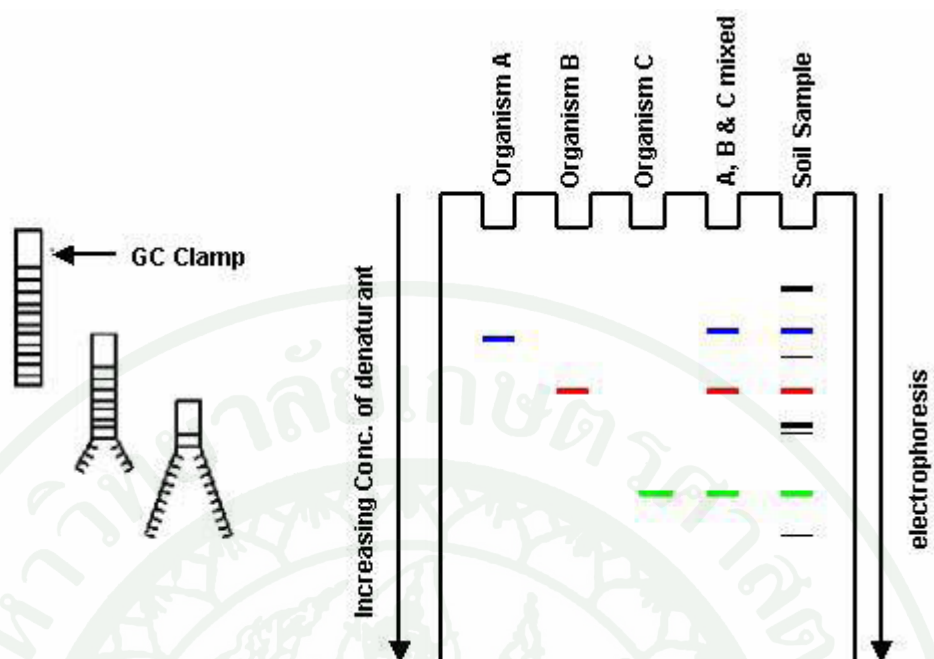
ค. extension: ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โพลีเมอร์เรส (polymerase) ทำให้มีการนำเบสต่างๆมาต่อทางด้าน 3' ของไพรเมอร์ โดยต่อให้ complementary กับซีควเอนซ์ (sequence) บนเทมเพลตที่ไพรเมอร์มาเกาะไว้ แล้วทำให้เกิดการสร้างดีเอ็นเอต่อเนื่องได้มากเพราะเป็นการสร้างแบบเพิ่มจำนวนทวีคูณ คือถ้าเริ่มจากดีเอ็นเอเทมเพลตสายคู่สายเดียว เมื่อถึงวงจรที่สองจะมีจำนวนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) เพิ่มขึ้นเป็น 2 คู่ ซึ่งแต่ละคู่เมื่อผ่านขั้นตอนของพีซีอาร์ในรอบที่สามจะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ออกมาเป็น  $2^3$  คู่ การเพิ่มจะเป็นแบบเอ็กโพเนนเชียล (exponential) ได้ผลิตภัณฑ์ใน n cycle เป็น  $2^n$  คู่ นั่นคือในรอบที่ 30 จะมีจำนวนดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนทั้งหมดถึง  $2^{30}$  เท่ากับ 1,073,741,764 คู่ (อโนทัย, 2549)

10.2 เทคนิคการแยกความแตกต่างของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยตัวกลางเป็นเจล (DGGE) เป็นเทคนิคในการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันได้แม้ว่าขนาดความยาวของดีเอ็นเอจะเท่ากัน ซึ่งจะอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturant) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นของสาร (gradient) จากส่วนบนของเจลที่มีความเข้มข้นน้อยไปสู่ส่วนล่างของเจลที่มีความเข้มข้นมาก รวมไปถึงการใช้อุณหภูมิสูงในการทำลายพันธะระหว่างคู่เบส G-C ซึ่งเป็นการจับกันโดยใช้พันธะที่เหนียวแน่น ซึ่งความเข้มข้นหรือปริมาณของคู่เบส G-C ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละคู่ที่แตกต่างกันนี้ทำให้การเคลื่อนที่ในตัวกลางดังที่กล่าวมาข้างต้นแตกต่างกันจึงสามารถมองเห็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลต่างกัน ดังนั้นวิธีนี้จึง

เป็นเป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถแยกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สนใจได้ แม้สิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะมีลำดับเบสต่างกันเพียงหนึ่งตำแหน่งก็ตาม นอกจากนี้ยังสามารถตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อใช้ศึกษาในระดับที่ลึกลงไปได้

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคดีจีจีจีจะต้องได้ปริมาณดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ เมื่อได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้วจึงนำไปวิเคราะห์รูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนเจลอะคริลาไมด์ (acrylamide) โดยอาศัยปริมาณคู่เบส G-C ที่แตกต่างกันบนสายดีเอ็นเอเป็นตัวกำหนดการเคลื่อนที่ในความเข้มข้นของสาร denaturant ที่ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิการหลอมหรือการแยก (melting temperature) จะแตกต่างกันไปตามลำดับและชนิดของเบส นั่นคือสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะเคลื่อนที่บนเจลต่างกัน (ดังภาพที่ 10) กล่าวคือ การเพิ่มเบส GC ประมาณ 30-50 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (Muyzer *et al.*, 1993) เรียกว่า GC clamp ที่ปลายสาย 5' ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอเพื่อทำหน้าที่เป็น high melting domain บนสายดีเอ็นเอทำให้ไม่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยวเมื่อเคลื่อนที่บนดีจีจีเจล (จิตรพรพรรณ, 2551)

การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ทำได้โดยการแยกชิ้นดีเอ็นเอจากเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส จากนั้นตรวจสอบและหาความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลสากล การเลือกลำดับสายดีเอ็นเอเพื่อนำมาศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกมักจะมุ่งเน้นไปที่ยีนที่อนุรักษ์ไว้ (conserved gene) ในระดับที่เหมาะสม (Page and Holmes, 1998) การศึกษาความหลากหลายทางด้านอนุชีววิทยาส่วนใหญ่ นิยมใช้วิธีการเปรียบเทียบด้วยการอ่านลำดับเบสของดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้โดยตรง ข้อสำคัญในการศึกษาโดยใช้ลักษณะระดับอนุชีววิทยาคือ ต้องเลือกยีนหรือโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) ที่จะใช้ให้มีอัตราการวิวัฒนาการเหมาะสมกับกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษา (เกษญา, 2547)



ภาพที่ 10 การเคลื่อนที่บนโพลีอะคริลาไมด์เจลของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากเชื้อมาตรฐานในการทำดีจีจีอี

ที่มา: Ward and Bora (2004)

10.3 แผนภูมิต้นไม้ทางไฟโลเจเนติก (phylogenetic tree) การจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตจะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ปัจจุบันข้อมูลจากลักษณะทางสรีรวิทยา การวิเคราะห์ทางเคมีและความรู้ทางอนุชีววิทยาถูกนำมาเข้ามาช่วยปรับปรุงการจัดจำแนกแบบดั้งเดิมจากการใช้ข้อมูลของ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และ โปรตีน มาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกที่ออกมาในรูปแบบแผนภูมิ (topology) มีลักษณะแตกเป็นกิ่งก้าน เพื่อแสดงให้เห็นถึงแนวทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งการใช้แนวความคิดนี้มีส่วนสอดคล้องกับการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม โดยพิจารณาการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายกันไว้เป็นกลุ่มเดียวกัน เนื่องมาจากว่าสิ่งมีชีวิตนั้นได้มีวิวัฒนาการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมเดียวกัน

(Page and Holmes, 1998)

เทคนิคดีจีจีจีเป็นหนึ่งในวิธีการวิเคราะห์ส่วนของ 16s rRNA ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการการแยกกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความซับซ้อน และใช้กำหนดวิวัฒนาการของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกลุ่ม (Ferris, 1996)

งานวิจัยของ Sekiguchi *et al.* (2001) ทำการวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของกลุ่มจุลินทรีย์จากแม่น้ำ โดยใช้ 357f และ 518r เป็นไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอหนึ่งลายพิมพ์ที่ปรากฏอยู่ในการทำดีจีจีจี (single DGGE band) อาจไม่ได้เป็นตัวแทนของสายพันธุ์แบคทีเรียเพียงหนึ่งสายพันธุ์

Baghchehsaraee *et al.* (2008) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิในการปรับสภาพเชื้อผสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ดีจีจีจี คือ 349fGC และ 518r พบว่าเชื้อสายพันธุ์ *C. butyricum* เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด นอกจากนี้เป็นเชื้อ *C. acetobutyricum* และ *B. thuringiensis*

งานวิจัยของ O-Thong *et al.* (2011) วิเคราะห์เชื้อผสมชนิดเทอร์โมฟิลิกที่ใช้ผลิตไฮโดรเจนจากน้ำเสียโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง พบว่าเชื้อที่โดดเด่นคือ *T. saccharolyticum*, *T. thermosaccharolyticum*, *Anoxybacillus sp.*, *Geobacillus sp.* และ *Clostridium sp.* โดย *Thermoanaerobacterium sp.* เป็นแบคทีเรียหลักในการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะเทอร์โมฟิลิก (45-65 องศาเซลเซียส) pH 4.0-6.5

Karadag and Puhakka (2010) ศึกษาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการผลิตไฮโดรเจนและกลุ่มจุลินทรีย์ โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 37-65 องศาเซลเซียส ใช้ซับสเตรทเป็นกลูโคส พบว่า ที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่โดดเด่นที่สุดคือ *C. Clostridium* ในขณะที่อุณหภูมิ 50-55 และ 60 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่โดดเด่นได้แก่ *Bacillus coagulans* และ *Thermoanaerobacterium*

## 11. แผนการทดลองแบบแฟกต์เกิ้ล-เบอร์แมน (Plackett and Burman design)

การทดลองที่มีตัวแปรหรือปัจจัยหลายปัจจัยที่ต้องการศึกษา จะมีอุปสรรคเกี่ยวกับสิ่งทดลอง (treatment) เป็นจำนวนมาก เช่น ถ้าจัดสิ่งทดลองแบบ  $2^n$  พบว่า ถ้ามีปัจจัย 7 ปัจจัยจะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 128 สิ่งทดลอง เป็นต้น จึงเป็นการยากที่จะทำการทดลองทั้ง 128 สิ่งทดลอง ดังนั้น Plackett and Burman Design จะใช้สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือก (screening) ปัจจัยที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการทดลองที่จะศึกษา กล่าวคือจากแผนการทดลองนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น ซึ่งการทดลองแบบนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดสิ่งทดลองแบบแฟกต์เรียล (factorial experiment) หรืออาจจัดให้เป็นแฟกต์เรียลบางส่วน (fractional factorial) ที่มีการจัดให้เป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีอยู่หลายปัจจัยจากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1 ถึง 4 ปัจจัย โดยที่ไม่ต้องทำการทดลองขนาดใหญ่และสามารถลดจำนวนการทดลองได้ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถศึกษาถึงผลของปฏิสัมพันธ์ (interaction) ต่างๆ ที่มีในการทดลองได้ การจัดการทดลองจะใช้  $2k$  factorial arrangement เป็นพื้นฐานโดยจะมีแบบแผนมาตรฐาน (ตารางที่ 1) เป็นแถวแรกของการเริ่มต้นในการสร้างสิ่งทดลอง

ตารางที่ 1 แบบมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก  $N-1$  ปัจจัยในการทดลอง  $N$  ครั้ง

| N  | ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง, $k=N-1$ |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |
|----|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
|    | 1                                  | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 8  | +                                  | + | + | - | + | - | - |   |   |    |    |    |    |    |    |
| 12 | +                                  | + | - | + | + | + | + | - | - | +  | +  |    |    |    |    |
| 16 | +                                  | + | + | + | - | + | + | + | + | -  | -  | +  | -  | -  | -  |

หมายเหตุ + หมายถึง ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษาที่มีระดับสูง ซึ่งมีค่าเท่ากับ +1

- หมายถึง ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษาที่มีระดับต่ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ -1

N หมายถึง จำนวนสิ่งทดลอง (treatment)

K หมายถึง จำนวนปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

ที่มา: Plackett and Burman (1946)

ดังนั้นการวางแผนการทดลองให้เลือกจำนวนสิ่งทดลอง (N) ที่มากกว่าจำนวนปัจจัยที่ต้องการ ศึกษาเพื่อสร้าง dummy effect สำหรับใช้คำนวณหาค่าความแปรปรวนของ standard error (SE) ซึ่งต้องใช้ในการคำนวณค่า t ต่อไป ถ้าจำนวน dummy variables มากส่งผลทำให้การประมาณค่า SE ถูกต้องมากยิ่งขึ้น อย่างน้อยควรมีค่า dummy variables 2 ตัว เช่น ต้องการคัดเลือกปัจจัย 4 ถึง 5 ปัจจัย ให้เลือก N เท่ากับ 8 ต้องการคัดเลือกปัจจัย 6 ถึง 9 ปัจจัย ให้เลือก N เท่ากับ 12 และต้องการคัดเลือกปัจจัย 10 ถึง 13 ปัจจัย ให้เลือก N เท่ากับ 16 เป็นต้น

การใช้ Plackett and Burman design ต้องกำหนดสิ่งทดลองแรกเป็นดั่งเมตริกแถวแรก จากนั้นสิ่งทดลองต่อไป กำหนดในลักษณะโครงสร้างวน (cyclic construction) กล่าวคือ นำรหัสสุดท้ายของ initial block ขึ้นมาลำดับหน้าสุด และวนไปจนครบ N-1 รอบ ส่วนสิ่งทดลองสุดท้ายเป็น added block คือ ใช้ระดับต่ำสุดทุกปัจจัย อย่างไรก็ตามในการวนอาจนำรหัสหน้าสุดมาต่อท้าย และวนไปจนครบ N-1 รอบได้เช่นกัน เพียงแต่ในการทดลองให้ใช้ระดับสูงหรือต่ำให้ถูกต้องตามแผนที่กำหนดหรือวางไว้เป็นสำคัญ (ตารางที่ 2) ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง เท่ากับ 7 ซึ่งมีค่า N เท่ากับ 12 จะเห็นว่าเครื่องหมายในแถวต่อมาในเมตริกจะถูกสร้างขึ้นจากการเลื่อนไปทางซ้ายมือ N-2 ครั้ง โดยแถวสุดท้ายของเมตริกจะเป็นเครื่องหมายลบทั้งหมด (อิสรพงษ์, 2550)

ตัวอย่างสิ่งทดลองที่ 1 จะทำการทดลองที่ปัจจัย A มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) ปัจจัย B มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) ปัจจัย C มีระดับต่ำ (เครื่องหมาย -) ปัจจัย D มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) ปัจจัย E มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) ปัจจัย F มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) และปัจจัย G มีระดับต่ำ (เครื่องหมาย -) โดยที่ไม่ต้องสนใจระดับของ dummy variables (H-K)

**ตารางที่ 2** ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรอง  
จำนวน 7 ปัจจัย โดยมีจำนวนสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 12 การทดลอง และมีจำนวน  
dummy variables 4 ตัว

| treatment | factor |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|           | A      | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K |
| 1         | +      | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - |
| 2         | +      | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 3         | -      | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + |
| 4         | +      | + | + | - | - | - | + | - | + | + | - |
| 5         | +      | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + |
| 6         | +      | - | - | - | + | - | + | + | - | + | + |
| 7         | -      | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + |
| 8         | -      | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - |
| 9         | -      | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 10        | +      | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - |
| 11        | -      | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + |
| 12        | -      | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

หมายเหตุ A-G หมายถึง ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

H-K หมายถึง dummy variables

ที่มา: Plackett and Burman (1946)

การคำนวณผลจากปัจจัยโดยใช้สูตร ดังนี้

ค่าเฉลี่ยของผลปัจจัยหลัก (average main effect;  $E_x$ )

$$= [\sum Y (+, \text{สิ่งทดลองที่เป็นระดับสูง}) - \sum Y (-, \text{สิ่งทดลองที่เป็นระดับต่ำ})] / n$$

ค่าเฉลี่ยของผล dummy variables (average dummy variables;  $E_d$ )

$$= [\sum Y (+, \text{สิ่งทดลองที่เป็นระดับสูง}) - \sum Y (-, \text{สิ่งทดลองที่เป็นระดับต่ำ})] / n$$

เมื่อ  $n$  = จำนวนของข้อมูลที่ประกอบเป็นผลรวม

$$SE = \sqrt{\sum (E_d)^2 / n}$$

$$t = E_x / SE$$

การทดสอบนัยสำคัญของปัจจัยหลัก (main effect) โดยการเปรียบเทียบระหว่างค่า  $t$  ที่ได้จากการคำนวณ และค่า  $t$  จากตาราง ที่ degree of freedom ( $df$ ) =  $n$  ถ้าค่า  $t$  ที่ได้จากการคำนวณมีค่ามากกว่าค่า  $t$  จากตาราง แสดงว่าปัจจัยดังกล่าวเป็นปัจจัยหลัก โดยระดับนัยสำคัญที่มักใช้ คือ 0.05 ถึง 0.3 (70 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ความเชื่อมั่น) (อนุวัตร, 2549)

## 12. แผนการทดลองแบบทาคุชิ (Taguchi design)

เทคนิคการออกแบบการทดลองแบบทาคุชิพัฒนา โดย Genichi Taguchi วิศวกรรมาชาวญี่ปุ่นที่เชี่ยวชาญทางด้านวิศวกรรมคุณภาพ นิยมใช้ค่าที่เหมาะสมของปัจจัยหลักที่มี 3 ระดับขึ้นไปหรือการออกแบบเพื่อหาค่าประมาณของปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกันในลักษณะเป็นเส้นโค้ง (non-linear) มากกว่าค่าจริง เป็นการออกแบบเชิงแฟกทอเรียล 3k คือการออกแบบเชิงแฟกทอเรียลที่แต่ละปัจจัยประกอบด้วย 3 ระดับ และระดับทั้ง 3 แต่ละปัจจัยมีค่าเป็นต่ำ ปานกลาง และสูง ดังนั้นถ้าหากสนใจศึกษาผลของปัจจัย 3 ปัจจัย จะมีจำนวนเงื่อนไขการทดลองทั้งสิ้น 27 การทดลอง ( $3^3$ ,  $k =$

3 ปัจจัย) นอกจากนี้การออกแบบการทดลองสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเงื่อนไขที่มีจำนวนปัจจัยและระดับของปัจจัยที่เพิ่มขึ้นได้อีกด้วย (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเงื่อนไขการทดลอง จำนวนปัจจัยที่สนใจศึกษา และจำนวนระดับของปัจจัย

| จำนวนปัจจัย<br>ที่ศึกษา | จำนวนระดับของปัจจัย=2 | จำนวนระดับของปัจจัย=3 | จำนวนระดับของปัจจัย=4 |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2                       | $2^2 = 4$             | $3^2 = 9$             | $4^2 = 16$            |
| 3                       | $2^3 = 8$             | $3^3 = 27$            | $4^3 = 64$            |
| 4                       | $2^4 = 16$            | $3^4 = 81$            | $4^4 = 256$           |
| :                       | :                     | :                     | :                     |
| k                       | $2^k$                 | $3^k$                 | $4^k$                 |

**หมายเหตุ** ตัวอย่างของระดับของปัจจัยในการทดลองมี 2 ระดับ คือ ต่ำ (-) และสูง (+)

ตัวอย่างของระดับของปัจจัยในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ต่ำ (-) กลาง (0) และ สูง (+)

จากตารางแสดงความสัมพันธ์ข้างต้น จะเห็นว่าถ้าจำนวนระดับของปัจจัยที่ศึกษาเพิ่มขึ้น จำนวนเงื่อนไขการทดลองจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่น กรณีสนใจศึกษาผลของปัจจัย 5 ปัจจัย ถ้าจำนวนระดับของแต่ละปัจจัยเพิ่มจาก 2 ระดับเป็น 4 ระดับ จำนวนเงื่อนไขการทดลองจะเพิ่มขึ้นจาก 32 การทดลองเป็น 1,024 การทดลอง ดังนั้นเบื้องต้นอาจเลือกการออกแบบการทดลองโดยใช้จำนวนระดับของปัจจัยแค่ 2 ระดับ ซึ่งอาจให้ข้อมูลน้อยกว่าออกแบบการทดลองที่ใช้จำนวนระดับมากกว่าคือ 4 ระดับ โดยเฉพาะกรณีความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและผลตอบไม่ใช่ความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (Nonlinear) แต่จุดประสงค์เบื้องต้นหรือสำหรับการทดลองเพื่อหาข้อมูลเพื่อประกอบการตัดสินใจเบื้องต้นว่าควรออกแบบอย่างไรต่อไป

การกำหนดระดับของปัจจัยการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัยเริ่มต้นจะต้องกำหนดระดับสูง (+) และระดับต่ำ (-) ของแต่ละปัจจัย การกำหนดระดับของปัจจัยมีผลมากต่อผลการวิเคราะห์และผลสรุปการกำหนดระดับของปัจจัย โดยพิจารณาระดับปกติหรือค่ากลางของแต่ละปัจจัย หลังจากกำหนดค่ากลางแล้วเพิ่มและลดระดับของปัจจัยจากค่ากลาง เพื่อหาช่วงของปัจจัย

ที่เป็นไปได้ หรือสามารถทำการทดลองได้จากช่วงที่เป็นไปได้ของปัจจัย เลือกระดับสูงต่ำให้เหมาะสมกับข้อจำกัดในการทำการทดลอง (ปารเมศ, 2545)

### 13. แผนการทดลองแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Respond surface method; RSM)

การทดลองแบบพื้นที่ผิวตอบสนองเป็นเทคนิคทางสถิติอย่างหนึ่งที่ใช้แผนภาพ surface plot ที่สร้างเป็นแผนภาพ 3 มิติ ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ที่เป็นที่น่าสนใจของนักวิจัย ซึ่งประกอบด้วยตัวแปรร่วมการทดลองหลายปัจจัย การตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะ คือการตอบสนองที่มากที่สุด (maximum) หรือการตอบสนองที่ต่ำสุด (minimum) ขึ้นอยู่กับธรรมชาติการทดลอง ซึ่งเป็นการแสดงหรือตัวแทนทางเรขาคณิตที่ได้รับเมื่อผลตอบสนองของตัวแปร (response) ถูก plot เป็นฟังก์ชันของตัวแปรเหล่านั้นจากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรดังกล่าวทำให้สามารถพิจารณาผลตอบสนองของ ตัวแปรและปัจจัยที่สนใจเหล่านั้นพร้อมๆกัน โดยความรู้พื้นฐานที่ต้องใช้ คือการวางแผนการทดลอง(experimental design) การวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) และความรู้ในการใช้โปรแกรมที่สร้างแผนภาพ surface plot

แบบจำลองทั่วไป;

$$Y = f(X_1 + X_2 + \cdots X_n) + \varepsilon$$

โดย  $Y$  คือ ค่าตอบสนอง (response); dependent variable

$X_1 + X_2 + \cdots X_n$  คือ ตัวแปรที่สนใจ; independent variable

$\varepsilon$  คือ เทอมของค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

แม้ว่ารูปแบบความเที่ยงตรงของฟังก์ชันการตอบสนอง  $f$  มักจะไม่ทราบเสมอ แต่ประสบการณ์มักแสดงให้เห็นว่าโดยทั่วไปสามารถประมาณได้โดยฟังก์ชันเชิงเส้นตรงหรือเส้นโค้งของตัวแปรเชิงปริมาณ

ความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression relationship) เป็นดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_1 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \epsilon$$

ความสัมพันธ์ หรือฟังก์ชันของตัวแปรเหล่านี้มักใช้สมการลำดับที่หนึ่ง (first order) ซึ่งเป็นแบบจำลองพหุนาม (polynomial model) หรือสมการลำดับที่สอง (second order) สำหรับความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) เป็นตัวอธิบาย

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_1 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \beta_{11} X_1^2 + \dots + \beta_{nn} X_n^2 + \beta_{ij} X_1 X_2 + \dots + \beta_{n-1, n} X_{n-1} X_n + \epsilon$$

โดย  $\beta_0$  = จุดตัด (intercept) บนแกน y

$\beta_i$  = เป็นผลเชิงเส้นตรง (linear effect) ของ  $X_i$  เมื่อ  $i = 1, \dots, n$

$\beta_{ii}$  = เป็นผลเชิงเส้นตรง (quadratic effect) ของ  $X_i$  เมื่อ  $i = 1, \dots, n$

$\beta_{ij}$  = เป็นผลของปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction effect) ของ  $X_i$  และ  $X_j$

เมื่อ  $i < j$ ;  $i = 1, \dots, n-1$  และ  $j = 1, \dots, n$

ในทอมของความคลาดเคลื่อนโดยปกติจะถูกกำหนดให้มีการกระจายตัวเทียบกับค่าเฉลี่ยเป็นศูนย์ และมีค่าความแปรปรวนเป็น  $\sigma^2$  ความแปรปรวนในเชิงปริมาณ  $\sigma^2$  ในการกระจายตัวของค่าตอบสนองเกิดขึ้น เนื่องจากความแตกต่างระหว่างจุดต่างๆ ที่ออกแบบกับความคลาดเคลื่อนในการทดลองที่ไม่สามารถควบคุมได้ ความแปรปรวนเนื่องจากความแตกต่างระหว่างจุดต่างๆ ที่ออกแบบสามารถอธิบายได้โดยฟังก์ชันของการตอบสนอง ถ้าทราบความแปรปรวนดังกล่าว โดยปกติฟังก์ชันของการตอบสนองที่เป็นจริงไม่ค่อยทราบมาก่อน ดังนั้นจึงมักต้องประมาณการค่าดังกล่าว เป็นผลให้การกระจายตัวของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนไม่เฉพาะแต่เกิดจากความคลาดเคลื่อนจากการทดลองเพียงอย่างเดียว แต่เกิดเนื่องจากการขาดความสอดคล้องของ

สมการที่ประมาณการขึ้นเรียกว่า “lack of fit of estimated model” ถ้าสมการที่ประมาณการขึ้นมา มีความสอดคล้องในการตอบสนองที่กำลังคาดคะเนแล้ว ผลรวมกำลังสอง (sum of square; SS) ของความคลาดเคลื่อนจะเกิดเนื่องจากความคลาดเคลื่อนในการทดลองเพื่อประเมินความเหมาะสม ของสมการ

วิธีการทางสถิติที่ใช้ คือ วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (the least square method) เพื่อประมาณค่า พารามิเตอร์ต่างๆ ฟังก์ชันที่ใช้เรียกว่า ฟังก์ชันของการตอบสนองที่เหมาะสม (fitted response function) โดยถูกนำมาใช้ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ของฟังก์ชันการตอบสนองของสมการ ถดถอยที่ตั้งสมมติฐานขึ้น เมื่อพารามิเตอร์ของฟังก์ชันการตอบสนองที่ถูกตั้งสมมติฐานขึ้นถูกแทน ด้วยค่าประมาณผลลัพธ์คือ ฟังก์ชันการตอบสนองจะถูกทำให้สอดคล้องขึ้น ดังนี้

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + \dots + b_nX_n$$

สมการดังกล่าวเป็นฟังก์ชันการตอบสนองเชิงเส้นตรงที่ถูกทำให้สอดคล้อง ซึ่งสามารถ นำไปใช้ในการคาดคะเนการตอบสนองที่ต้องการของตัวแปรอิสระ (independent variables) เมื่อ ฟังก์ชันการตอบสนองที่ถูกทำให้สอดคล้อง ได้นำมาสร้างกราฟในลักษณะเป็นฟังก์ชันตัวแปรเชิง ปริมาณ ผลลัพธ์ที่ได้จากการสร้างกราฟนี้ เรียกว่า response surface plot หรือ contour maps (ไพโรจน์, 2544)

#### ขั้นตอนการทำ RSM

1. เลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้างแผนภาพ surface plot คือ factorial in completely randomized design (CRD) หรือ randomized block design (RBD), fractional factorial in CRD หรือ RBD, rotatable design, CCD, Box-Behnken design และ mixture design เป็นต้น
2. สร้างสมการ regression ที่ดีที่สุด สร้าง surface plot จากสมการที่หามาได้
3. ตรวจสอบ optimization

4. Verification โดยทำ independent run ภายใต้ขอบเขตของตัวแปรแต่ละตัว

5. ถ้าแบบจำลองไม่เหมาะสม (invalid) ให้สร้างแบบจำลองใหม่ (อนุวัตร, 2549)



## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. อุปกรณ์

- 1.1 เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (Shimadzu GC 2014)
- 1.2 เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (GB 932)
- 1.3 เครื่อง PCR (Biorad iCycler)
- 1.4 เครื่อง Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE-1001)
- 1.5 ชุดสกัดดีเอ็นเอ (QIAamp DNA mini kit)
- 1.6 ชุดทำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit)
- 1.7 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (balances)
- 1.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 1.9 ตู้อบแห้ง (dry oven)
- 1.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 1.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 1.12 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- 1.13 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)
- 1.14 ปีกเกอร์ (beaker)
- 1.15 กระบอกตวง (cylinder)
- 1.16 ปิเปตต์ (pipette)
- 1.17 ขวดหมัก (bottle)
- 1.18 กรวยกรอง (funnel)
- 1.19 เข็มฉีดยา (syringe)
- 1.20 หลอดทดลอง (test tube)
- 1.21 ตะแกรงร่อน (sieve)

## 2. สารเคมี

### 2.1 สารเคมีทั่วไป

- 2.1.1 สารละลายกรดซัลฟิวริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- 2.1.2 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ( $\text{HCl}$ )
- 2.1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )
- 2.1.4 กรดซิตริก ( $\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COOH})_3$ )
- 2.1.5 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 2.1.6 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 2.1.7 สารละลายไดโนโตรซาลิไซคลิก ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ )
- 2.1.8 ยีสต์สกัด (yeast extract)
- 2.1.9 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase enzyme)
- 2.1.10 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

### 2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 2.2.1 ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (1M Tris-HCl buffer)
- 2.2.2 ซิทีเอบี แอ็กเทร็กชัน บัฟเฟอร์ (CTAB extraction buffer)
- 2.2.3 โซเดียมอะซิเตต (3M sodium acetate)
- 2.2.4 ฟีนอล (phenol)
- 2.2.5 คลอโรฟอร์ม (chloroform)
- 2.2.6 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol)
- 2.2.7 อีดีทีเอ (0.5M ethylenediaminetetra acetic acid; EDTA)
- 2.2.8 เอทานอล (absolute ethanol)
- 2.2.9 ทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer)
- 2.2.10 โซเดียมคลอไรด์ (5M sodium chloride)

## 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และดีจีจีอี

- 2.3.1 ทีเออีบัฟเฟอร์ (TAE buffer)
- 2.3.2 พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (10xPCR buffer)
- 2.3.3 น้ำดีไอ (distilled water)
- 2.3.4 แทคทีเอ็นอีโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase )
- 2.3.5 ดีเอ็นทีพี (deoxyribonucleotide triphosphate; dNTPs)
- 2.3.6 ไพรมเมอร์ (primers: pA pH 357f และ 518r)
- 2.3.7 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)
- 2.3.8 สีโหลด (loading dye)
- 2.3.9 สีโหลดไซเบอร์โกลด์ (SYBR gold)
- 2.3.10 อะกาโรส (agarose)
- 2.3.11 มาร์คเกอร์ (marker: gene ruler DNA ladder mix)

## 3. วิธีการ

### 3.1 วิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นของจีเชื้อ

วิเคราะห์องค์ประกอบของจีเชื้อ ได้แก่ ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส ความชื้น และเถ้า

### 3.2 ศึกษาการปรับสภาพจีเชื้อเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน

#### 3.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพจีเชื้อด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก

การปรับสภาพจีเชื้อด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ตามแผนการทดลองแฟกต์เกต์-เบอร์แมน (Plackett-Burman) ปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก ระยะเวลาในการปรับสภาพ อุณหภูมิในการปรับสภาพ ปริมาณจีเชื้อที่ใช้ในการปรับสภาพ ปริมาณเอนไซม์ในการไฮโดรไลซิส ปริมาณจีเชื้อในการไฮโดรไลซิส และระยะเวลาในการไฮโดรไลซิส โดยปรับสภาพจีเชื้อ (ร้อยละ 10 และ 30) ในสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (ร้อยละ

0.5 และ 6) ที่อุณหภูมิ (30 และ 60 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน (3 และ 10 ชั่วโมง) หลังจากนั้นล้างจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำให้มีสภาพเป็นกลาง แล้วไฮโดรไลซ์จีเลื้อย (ร้อยละ 5 และ 10) ไปไฮโดรไลซิส โดยการเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้รับจากบริษัทอีสต์ เอเซียติก (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) (5 และ 40 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเลื้อยแห้ง) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา (5 และ 15 ชั่วโมง) จากนั้นหมักร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้กากตะกอน 10 กรัมกากตะกอนแห้ง ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 ใช้ปริมาตรตัวอย่าง 80 มิลลิลิตร ในขวดหมักขนาด 120 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วยจุกยางและฝาครอบอะลูมิเนียม เดิมก้าชออาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ขวดหมักมีสภาพไร้อากาศ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ในกระบวนการหมักนอกจากการปรับสภาพจีเลื้อยตามแผนการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้น มีการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการใช้ความร้อน โดยต้มเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำการหมักด้วยค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสในอัตราส่วน C:N:P เท่ากับ 100:5:1

3.2.2 จากการศึกษาสภาวะการปรับสภาพจีเลื้อยตามแผนการทดลองแพล็กเก็ตต์-เบอร์แมน (ข้อ 3.2.1) ศึกษาการปรับสภาพจีเลื้อยด้วยสารเคมีร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำด้วยแผนการทดลองทางสถิติ 2 แผนการทดลอง คือ แผนการทดลองแรกปรับสภาพจีเลื้อยร้อยละ 10 ในสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (ร้อยละ 0.25 0.75 และ 1.25) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างจีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำให้มีสภาพเป็นกลาง นำไประเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน (5 10 และ 15 บาร์) เป็นเวลา 10 นาที ไฮโดรไลซ์จีเลื้อยที่ร้อยละ 10 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (0 10 และ 20 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเลื้อยแห้ง) ) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นหมักร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้กากตะกอน 10 กรัมกากตะกอนแห้ง ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 ใช้ปริมาตรตัวอย่าง 80 มิลลิลิตร ในขวดหมักขนาด 120 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วยจุกยางและฝาครอบอะลูมิเนียม เดิมก้าชออาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ขวดหมักมีสภาพไร้อากาศ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ส่วนแผนการทดลองที่สองปรับสภาพจีเลื้อยร้อยละ 10 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (ร้อยละ

ละ 0 หมายถึง ใช้น้ำแทนสารละลายไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์ 3 และ 6 ) ขึ้นตอนต่อจากนี้ทำเช่นเดียวกันกับแผนการทดลองที่ปรับสภาพจีล้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก

3.2.3 จากผลการศึกษาสภาวะการปรับสภาพจีล้อยตามแผนการทดลองทางสถิติ (ข้อ 3.2.2) ศึกษาการประเมินจุดที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน โดยวิธีการตอบสนอง ที่พื้นที่ผิว (response surface methodology; RSM) โดยปรับสภาพจีล้อยที่ร้อยละ 10 ในสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (ร้อยละ 0.07 0.75 1.75 2.75 และ 3.43) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างจีล้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำให้มีสภาพเป็นกลาง นำไปประบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน (1.59 5 10 15 และ 18.41 บาร์) เป็นเวลา 10 นาที แล้วไฮโดรไลซ์จีล้อยที่ร้อยละ 10 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (1.59 5 10 15 และ 18.41 เอฟฟิยูต่อกรัมจีล้อยแห้ง) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นหมักร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้กากตะกอน 10 กรัมกากตะกอนแห้ง ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 ใช้ปริมาตรตัวอย่าง 80 มิลลิลิตร ในขวดหมักขนาด 120 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วยจุกยางและฝาครอบอะลูมิเนียม เดมก๊าชอาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ขวดหมักมีสภาพไร้อากาศ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

### 3.3 ศึกษาการปรับสภาพกากตะกอนเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกากตะกอนจุลินทรีย์ที่ได้จากบ่อบำบัดน้ำเสียของบริษัท มาลีสามพราน จำกัด ศึกษาการปรับสภาพกากตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายกรดและด่างร่วมกับความร้อน ตามแผนการทดลองทางสถิติ โดยนำกากตะกอนมาปรับสภาพที่ความค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ (2 และ 12) จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ (50 และ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา (1 และ 2 ชั่วโมง) และหมักร่วมกับจีล้อยที่ผ่านการปรับสภาพที่เหมาะสมจากแผนการทดลอง RSM (ข้อ 3.2.3) โดยใช้กากตะกอน 10 กรัมกากตะกอนแห้ง ปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 ใช้ปริมาตรตัวอย่าง 80 มิลลิลิตร ในขวดหมักขนาด 120 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วยจุกยางและฝาครอบอะลูมิเนียม เดมก๊าชอาร์กอนเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ขวดหมักมีสภาพไร้อากาศ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

### 3.4 การวิเคราะห์หาชนิดเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิคพีซีอาร์และดีจีจีอี

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมัก โดยการนำภาคตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ก่อนและหลังกระบวนการหมักตรวจสอบด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล (Polymerase Chain Reaction: PCR) และเทคนิคการแยกความแตกต่างของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยตัวกลางเป็นเจล (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE) เพื่อตรวจสอบหาสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (QIAamp DNA mini kit) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) เริ่มต้นด้วยการแอมพลิฟไค์ 16s โดยใช้ไพรเมอร์ pA (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ pH (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) ต่อด้วยการนำดีเอ็นเอจากขั้นตอนการทำ 16s มาแอมพลิฟไค์ V3 ด้วยไพรเมอร์ 357f (CTCCTACGGGAGGCAGCAG) และ 518r (ATTACCGCGGCTGCTGG)

เมื่อได้ดีเอ็นเอจากกระบวนการพีซีอาร์ (จากขั้นตอนการทำ V3) แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำดีจีจีอีต่อ สำหรับการเตรียมเจลใช้วิธีการของ Muyzer *et al.* (1993) โดยการใช้เปอร์เซ็นต์เจลในการทำดีจีจีอีเท่ากับ 30-60% สำหรับเปอร์เซ็นต์อะครีลาไมด์ใช้เท่ากับ 8% (เตรียมจาก 0% และ 100% Denaturing) เริ่มต้นเดินระบบใช้กระแสไฟฟ้าที่ 20 โวลต์ 20 นาที หลังจากนั้นใช้ 100 โวลต์นาน 16 ชั่วโมง นำผลผลิตที่ได้จากกระบวนการดีจีจีอีไปตรวจสอบ โดยการนำเจลอะครีลาไมด์ไปย้อมด้วย SYBR gold ส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

#### 3.4.1 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ให้บริสุทธิ์

ก่อนส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ต้องนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ก่อนโดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ตาม PCR Clean up Protocol

#### 3.4.2 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ส่งตัวอย่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คัดเลือกไปหาลำดับเบส โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท First BASE Laboratories Sendirian Berhad ประเทศมาเลเซีย

### 3.4.3 การเปรียบเทียบลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้ทำการ BLAST search ในฐานข้อมูลของ NCBI GenBank เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวคล้ายกับยีนใด

การทำ multiple alignment ทำโดยโปรแกรม ChromasPro เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากการ Blast กับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ให้ตรงกันในแต่ละตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์

สำหรับการสร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติก ทำโดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5.0 ด้วยวิธี Neighbor-Joining

## 3.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักจีลื้อเพื่อผลิตไฮโดรเจน

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพจีลื้อตามแผนการทดลองตอบสนองที่พื้นผิว (ข้อ 3.2.3) และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพกากตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ (ข้อ 3.3) นำมาหมักร่วมกันและเติมสารอาหารที่ต้องการศึกษาผลกระทบต่อการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ เหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยทำการหมักแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

## 3.6 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างก๊าซที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักตามระยะเวลาที่กำหนด พร้อมทั้งวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นด้วยหลอดฉีดยาแก้ว (syringe) รวมถึงเก็บตัวอย่างของเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ กรดอินทรีย์ระเหยง่าย และแอลกอฮอล์ ตามชั่วโมงที่ทำการเก็บตัวอย่าง

### 3.7 วิธีการวิเคราะห์

#### 3.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจนรวม ฟอสฟอรัส เถ้า และความชื้นของขี้เลื่อย

วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจนรวม (total kjeldahl nitrogen, TKN) และปริมาณฟอสฟอรัสตามวิธีมาตรฐาน (APHA, 1992) สำหรับปริมาณเถ้าวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน ASTM D 3174 และความชื้นวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน ASTM D 3173 (ASTM, 1998)

#### 3.7.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบก๊าซชีวภาพ

นำตัวอย่างก๊าซที่เก็บวิเคราะห์หาองค์ประกอบของก๊าซด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีด้วยหัววัด Thermal Conductivity Detector (TCD) คอลัมน์ที่ใช้คือ gas activated carbon และ porapak Q column โดยใช้อาร์กอนเป็นก๊าซตัวพา ใช้อุณหภูมิคอลัมน์ หัวฉีดตัวอย่าง และหัววัด เท่ากับ 60 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สำหรับอัตราการไหลของก๊าซตัวพาเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งก๊าซที่วิเคราะห์ ได้แก่ ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไนโตรเจน และก๊าซมีเทน

#### 3.7.3 การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ระเหยง่ายและแอลกอฮอล์

นำตัวอย่างของเหลวที่เก็บได้มาทำการวิเคราะห์หากรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFAs) ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก รวมทั้งเอทานอล โดยนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วแยกส่วนที่ใสไปวิเคราะห์ ซึ่งวิเคราะห์โดยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีด้วยหัววัด Flame-Ionization Detector (FID) คอลัมน์ที่ใช้คือ unisole F-200 30/60 mesh ใช้ไนโตรเจนเป็นก๊าซตัวพา และอุณหภูมิของคอลัมน์ หัวฉีดตัวอย่าง และหัววัดเท่ากับ 140 250 และ 250 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

### 3.7.4 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) โดยการใส่ตัวอย่างของเหลวที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย DNS ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายในหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันที ตามด้วยการเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร (Ghose, 1987)

### 3.8 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ผลที่ได้จากการวิเคราะห์มาทำการสรุปและอภิปรายผลการทดลอง

#### สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

##### 1. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ห้องปฏิบัติการวิจัย Fungal Biotechnology เขตวิจัยและโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยยามากูจิ (Yamaguchi University) ประเทศญี่ปุ่น

##### 2. ระยะเวลาการวิจัย

ระยะเวลาการทำงานวิจัย 18 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2553 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555

## ผลและวิจารณ์

### 1. คุณสมบัติของจีเลื่อย

จีเลื่อยที่ใช้ในการศึกษานี้ นำมาจากกระบวนการตกแต่งชิ้นงานของโรงงานผลิตไฟเบอร์บอร์ด ลักษณะของจีเลื่อยค่อนข้างละเอียด คุณสมบัติเบื้องต้นของจีเลื่อย ได้แก่ ความเข้มข้นของคาร์บอน ในโตรเจน ฟอสฟอรัส ปริมาณความชื้น และปริมาณเถ้า (ตารางที่ 4) โดยพบว่าจีเลื่อยมีปริมาณของคาร์บอนสูงสุด เมื่อเทียบกับองค์ประกอบอื่น นอกจากนี้จีเลื่อยเป็นชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบ (ร้อยละ 47.06 20.00 และ 32.95 ตามลำดับ) (จิรัชศักดิ์, 2553) โดยเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1, 4 ไกลโคซิดิก (β-1, 4 glycosidic) (Martin, 2011) เซลลูโลสจะถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยกระบวนการไฮโดรไลซิส ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นซับสเตรทเพื่อผลิตไฮโดรเจน ดังนั้นก่อนจีเลื่อยเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจนจึงต้องมีการปรับสภาพก่อน เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ลดโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นผลึกของเซลลูโลสและช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการทำปฏิกิริยา (Krishna and Chowdary, 2000) ให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไป (ภูมิหทัย และประมุข, 2554)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของตัวอย่างจีเลื่อยที่ใช้ในการศึกษา

| พารามิเตอร์ | ร้อยละ |
|-------------|--------|
| คาร์บอน     | 53.54  |
| ไนโตรเจน    | 0.12   |
| ฟอสฟอรัส    | 0.008  |
| ความชื้น    | 5.60   |
| เถ้า        | 1.78   |

## 2. การปรับสภาพขี้เลื่อยเพื่อผลิตไฮโดรเจน

การปรับสภาพชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เพื่อให้เซลลูโลสเรียงตัวอย่างหลวมและง่ายต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์และเชื้อจุลินทรีย์ มีวิธีการปรับสภาพหลายวิธี ได้แก่ การปรับสภาพด้วยกรด การปรับสภาพด้วยด่าง การปรับสภาพด้วยการระเหิดด้วยไอน้ำ เป็นต้น การศึกษานี้ใช้วิธีการปรับสภาพขี้เลื่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับความร้อน การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษากันอย่างกว้างขวาง มีประสิทธิภาพในการละลายเฮมิเซลลูโลสและสามารถทำลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสได้ (Zhou *et al.*, 2012) เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลลูโลสให้ง่ายต่อการเข้าถึงของเอนไซม์ในการเปลี่ยนโพลีเมอร์ประเภทคาร์โบไฮเดรตเป็นน้ำตาล รวมถึงกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มความพรุนให้แก่วัสดุ (Mosier *et al.*, 2005) นอกจากนี้ การปรับสภาพเบื้องต้นด้วยกรดช่วยเพิ่มน้ำตาลและเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายชีวมวลได้ (Nguyen, 2000) ส่วนการปรับสภาพโดยใช้ความร้อนมีผลทำให้สามารถละลายเฮมิเซลลูโลสได้ดีที่สุด (Talebnia *et al.*, 2010)

### 2.1 การปรับสภาพขี้เลื่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก

ปัจจัยที่ศึกษาในการปรับสภาพขี้เลื่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกการปรับสภาพขี้เลื่อย ได้แก่ ระยะเวลา (time pretreatment) อุณหภูมิ (temperature pretreatment) ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก (acid concentration) และปริมาณขี้เลื่อย (solid pretreatment) สำหรับส่วนที่สองการไฮโดรไลซิส ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ (enzyme activity) ระยะเวลา (time hydrolysis) และปริมาณขี้เลื่อย (solid hydrolysis) โดยออกแบบแผนการทดลองการปรับสภาพขี้เลื่อยดังกล่าวด้วยวิธีแฟคทอเรียล-เบอร์แมน (Plackett-Burman) (ตารางที่ 5) พบว่า การปรับสภาพขี้เลื่อยนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยใช้ปริมาณขี้เลื่อยร้อยละ 30 หลังจากนั้นไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 40 เอฟพียูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง นาน 15 ชั่วโมง โดยใช้ขี้เลื่อยร้อยละ 5 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 282.85 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย มากกว่าขี้เลื่อยที่ไม่ผ่านการปรับสภาพที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเพียง 5.87 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย

ตารางที่ 5 ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเริ่มต้นจากการหมักขี้เลื่อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีแฟกต์-เกิร์ต-เบอร์แมน

| สภาวะการทดลอง | ระยะเวลา (ชั่วโมง) | กระบวนการปรับสภาพ       |                                          |                          | กระบวนการไฮโดรไลซิส                         |                    |                          | ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | ผลผลิตไฮโดรเจนสะสม (มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย) |
|---------------|--------------------|-------------------------|------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|               |                    | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริก (ร้อยละ) | ปริมาณขี้เลื่อย (ร้อยละ) | ปริมาณเอนไซม์ (เอฟพียูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง) | ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณขี้เลื่อย (ร้อยละ) |                                                |                                                |
| 1             | 3                  | 30                      | 0.5                                      | 30                       | 5                                           | 5                  | 10                       | 1.36±0.00                                      | 84.12±9.64                                     |
| 2             | 3                  | 30                      | 6                                        | 10                       | 40                                          | 15                 | 10                       | 2.96±0.00                                      | 241.10±20.14                                   |
| 3             | 3                  | 30                      | 6                                        | 10                       | 5                                           | 15                 | 5                        | 1.40±0.00                                      | 117.99±6.73                                    |
| 4             | 3                  | 60                      | 0.5                                      | 30                       | 40                                          | 15                 | 5                        | 3.15±0.00                                      | 282.85±31.27                                   |
| 5             | 3                  | 60                      | 0.5                                      | 10                       | 40                                          | 5                  | 10                       | 3.04±0.00                                      | 253.15±4.63                                    |
| 6             | 3                  | 60                      | 6                                        | 30                       | 5                                           | 5                  | 5                        | 0.48±0.00                                      | 55.08±13.30                                    |
| 7             | 10                 | 30                      | 0.5                                      | 10                       | 40                                          | 5                  | 5                        | 2.95±0.00                                      | 243.79±5.49                                    |
| 8             | 10                 | 30                      | 0.5                                      | 30                       | 5                                           | 15                 | 10                       | 1.16±0.01                                      | 59.11±10.80                                    |
| 9             | 10                 | 30                      | 6                                        | 30                       | 40                                          | 5                  | 5                        | 1.53±0.01                                      | 179.79±42.57                                   |
| 10            | 10                 | 60                      | 0.5                                      | 10                       | 5                                           | 15                 | 5                        | 1.27±0.01                                      | 87.78±10.91                                    |
| 11            | 10                 | 60                      | 6                                        | 10                       | 5                                           | 5                  | 10                       | 1.42±0.01                                      | 144.46±25.76                                   |
| 12            | 10                 | 60                      | 6                                        | 30                       | 40                                          | 15                 | 10                       | 3.12±0.01                                      | 256.31±7.96                                    |
| ชุดควบคุม     | -                  | -                       | -                                        | -                        | -                                           | -                  | -                        | 0.17±0.00                                      | 5.87±0.40                                      |

การปรับสภาพทางกายภาพและการปรับสภาพทางกายภาพเคมีขั้นต้นมีจุดประสงค์เพื่อการสลายโครงสร้างเซลลูโลสและทำให้ผลึกของเซลลูโลสลดลง เพื่อให้ง่ายต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป เอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสเป็นหลัก แต่มีน้ำตาลเพนโตสบางส่วนที่เกิดจากการย่อยสลายของเฮมิเซลลูโลส น้ำตาลเหล่านี้จะใช้เป็นซับสเตรทในการผลิตไฮโดรเจนผ่านกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

(ที่สามารถใช้น้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและกระบวนการไฮโดรไลซิสชีวมวลประเภทลิกโน-เซลลูโลส) (Lynd, 1996)

การศึกษาปัจจัยในการปรับสภาพชี้เลื้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ตามแผนการทดลองแฟกต์เกิ้ล-เบอร์แมน โดยแต่ละปัจจัยศึกษา 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ และระดับสูง พบว่ามีผลกระทบต่อการผลิตไฮโดรเจน 2 กรณี คือ ผลกระทบเชิงบวก หมายถึง เมื่อค่าของปัจจัยดังกล่าวเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ผลผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ได้แก่ อุณหภูมิในการปรับสภาพ ปริมาณเอนไซม์ในการไฮโดรไลซิส ระยะเวลาในการไฮโดรไลซิส และปริมาณชี้เลื้อยในการไฮโดรไลซิส ส่วนผลกระทบเชิงลบ หมายถึง ค่าของปัจจัยดังกล่าวหากเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ผลผลิตไฮโดรเจนลดลง ได้แก่ ระยะเวลาในการปรับสภาพ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกในการปรับสภาพ และปริมาณชี้เลื้อยในการปรับสภาพ (ดูจากค่า coefficient estimate) ปัจจัยที่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ในการไฮโดรไลซิส (ตารางที่ 6)

**ตารางที่ 6** การวิเคราะห์ทางสถิติผลของปัจจัยในการปรับสภาพชี้เลื้อยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

| source                                | coefficient estimate | sum of squares | mean square | F value | p-value Prob > F |
|---------------------------------------|----------------------|----------------|-------------|---------|------------------|
| time pretreatment (hr)                | -52.55               | 33134.73       | 33134.73    | 0.22    | 0.6639           |
| temperature pretreatment (°C) +128.10 |                      | 1.97E+005      | 1.97E+005   | 1.30    | 0.3172           |
| acid concentration (%)                | -13.38               | 2148.82        | 2148.82     | 0.01    | 0.9108           |
| solid pretreatment (%)                | -142.52              | 2.44E+005      | 2.44E+005   | 1.61    | 0.2728           |
| enzyme activity (FPU/g)               | +757.04              | 6.88E+006      | 6.88E+006   | 45.54   | 0.0025*          |
| time hydrolysis (hr)                  | +70.61               | 59834.73       | 59834.73    | 0.40    | 0.5632           |
| solid hydrolysis (%)                  | +59.15               | 41982.01       | 41982.01    | 0.28    | 0.6259           |

**หมายเหตุ** ถ้าค่า "Prob > F" น้อยกว่า 0.05 ซึ่งให้เห็นว่าปัจจัยนั้นมีนัยสำคัญ

เครื่องหมาย (-, +) หน้าค่า coefficient estimate คือ ผลกระทบเชิงลบและบวก ตามลำดับ

การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดสามารถกำจัดลิกนิน เฮมิเซลลูโลส ลดผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มความพรุนให้กับวัสดุ (Sun and Cheng, 2005) มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสที่ละลายได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Lu *et al.*, 2007) ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อ

การไฮโดรไลซิส โดยในงานวิจัยของ Mosier *et al.* (2005) พบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดเจือจางที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 2 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ช่วยทำลายโครงสร้างของลิกนินและเพิ่มพื้นที่ผิวในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับเซลลูโลส ดังนั้นการปรับสภาพจี้อยู่ด้วยสารละลายกรดร่วมกับความร้อนจึงส่งผลให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าจี้อยู่ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

จากผลวิเคราะห์ทางสถิติของแต่ละปัจจัยในการปรับสภาพจี้อยู่ที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน (ตารางที่ 6) แสดงว่าการหมักจี้อยู่ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างจี้อยู่ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำเพื่อให้มีสภาพเป็นกลาง นำจี้อยู่ร้อยละ 10 ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 40 เอฟพียูต่อกรัมจี้อยู่แห้ง นาน 15 ชั่วโมง ร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง มีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากกว่าการหมักจี้อยู่ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 ที่อุณหภูมิในการปรับสภาพ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างจี้อยู่ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำเพื่อให้มีสภาพเป็นกลาง นำจี้อยู่ร้อยละ 5 ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 5 เอฟพียูต่อกรัมจี้อยู่แห้ง นาน 5 ชั่วโมง สามารถสรุปความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนได้ดังนี้

#### 2.1.1 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกในการปรับสภาพจี้อยู่ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

การหมักจี้อยู่ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีแนวโน้มให้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นระหว่าง 1.16-3.15 กรัมต่อลิตร และผลผลิตไฮโดรเจนสะสมระหว่าง 59.11-282.85 มิลลิลิตรต่อกรัมจี้อยู่ มากกว่าการหมักจี้อยู่ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 6 ให้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นและผลผลิตไฮโดรเจนอยู่ในช่วง 0.48-3.12 กรัมต่อลิตร และ 55.08-241.10 มิลลิลิตรต่อกรัมจี้อยู่ ตามลำดับ อาจเกิดจากสารยับยั้งที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับสภาพ เพราะความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการปรับสภาพมีมากก่อให้เกิดตัวยับยั้งมากขึ้น (Weiqi *et al.*, 2012) จึงส่งผลทำให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นได้น้อยตามไปด้วย ดังงานวิจัยของนันทิกา และคณะ (2554) กล่าวว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มากเกินไปจะทำลายโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเกิดเป็นสารประกอบ เช่น

ฟูแรน เพอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลฟูแรน และสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นพิษ (Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000) ซึ่งดึงโมเลกุลของไฮโดรเจนและออกซิเจนออกจากโมเลกุลของน้ำตาล ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง (คุชฎี, 2550)

### 2.1.2 ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพชี้เลี้ยงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

การหมักชี้เลี้ยงที่ผ่านการปรับสภาพ โดยใช้ระยะเวลาการปรับสภาพแตกต่างกัน คือ 3 และ 10 ชั่วโมง พบว่าการหมักชี้เลี้ยงที่ปรับสภาพชี้เลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 3 ชั่วโมง ส่งผลให้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (1.36-3.15 กรัมต่อลิตร) และผลผลิตไฮโดรเจนสะสม (84.12-282.85 มิลลิตรต่อกรัมชี้เลี้ยง) มากกว่าการหมักชี้เลี้ยงที่ปรับสภาพชี้เลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 10 ชั่วโมง ให้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นและผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 1.16-3.12 กรัมต่อลิตร และ 59.11-256.31 มิลลิตรต่อกรัมชี้เลี้ยง ตามลำดับ ดังงานวิจัยของ Sindhu *et al.* (2011) การปรับสภาพฟางข้าวเป็นระยะเวลานาน 90 นาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 0.458 กรัมต่อกรัม เมื่อเพิ่มระยะเวลาการปรับสภาพฟางข้าว 120 นาที ส่งผลให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเท่ากับ 0.440 กรัมต่อกรัม ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ถือเป็นสารอาหารสำคัญสำหรับจุลินทรีย์ใช้ผลิตไฮโดรเจน หากน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงทำให้ไฮโดรเจนที่ผลิตได้เกิดขึ้นน้อยเช่นกัน

### 2.1.3 ผลของอุณหภูมิในการปรับสภาพชี้เลี้ยงที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

อุณหภูมิในการปรับสภาพชี้เลี้ยงของการศึกษานี้แบ่งเป็น 2 ระดับ คือ 30 และ 60 องศาเซลเซียส การหมักชี้เลี้ยงที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มให้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (0.48-3.15 กรัมต่อลิตร) และผลผลิตไฮโดรเจนสะสม (55.08-282.85 มิลลิตรต่อกรัมชี้เลี้ยง) มากกว่าการหมักชี้เลี้ยงที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นและผลผลิตไฮโดรเจนสะสมอยู่ระหว่าง 1.16-2.96 กรัมต่อลิตร และ 59.11-243.79 ตามลำดับ เนื่องจากอุณหภูมิในการปรับสภาพสูงมีผลทำให้สารละลายกรดซัลฟิวริกสามารถแพร่เข้าไปในโครงสร้างของชี้เลี้ยงได้เร็วขึ้น การเกิดปฏิกิริยาและการบวมตัวเกิดได้รวดเร็วสามารถละลายเฮมิเซลลูโลสออกมาได้มากขึ้น (Soto *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2011) และการปรับสภาพชี้เลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น (Zhao *et al.*, 2009)

#### 2.1.4 ผลของปริมาณของแฉ่งในการปรับสภาพที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

ปริมาณจีเชื้อที่ใช้ในการปรับสภาพ คือ ร้อยละ 10 และ 30 พบว่าการหมักจีเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้จีเชื้อร้อยละ 10 ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมอยู่ในช่วงประมาณ 80-250 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเชื้อ มากกว่าการหมักจีเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้จีเชื้อร้อยละ 30 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมอยู่ระหว่าง 50-280 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเชื้อ เนื่องจากการปรับสภาพจีเชื้อที่ปริมาณของแฉ่งสูงอาจมีผลทำให้สารละลายกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการปรับสภาพสัมผัสกับจีเชื้อได้ไม่ทั่วถึง ประสิทธิภาพในการทำลายหรือกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสจึงน้อยลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Yang *et al.* (2010) ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อปริมาณของแฉ่งอยู่ระหว่างร้อยละ 4-6.7 และผลผลิตไฮโดรเจนลดลงเมื่อปริมาณของแฉ่งเพิ่มสูงถึงร้อยละ 20

#### 2.1.5 ผลของปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในการไฮโดรไลซิสที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

การไฮโดรไลซิสจีเชื้อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในแผนการทดลองนี้มีการแปรผัน 2 ค่า คือ 5 และ 40 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเชื้อแห้ง พบว่าการหมักจีเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก จากนั้นนำจีเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 40 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเชื้อแห้ง มีแนวโน้มให้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นและผลผลิตไฮโดรเจนอยู่ระหว่าง 1.53-3.15 กรัมต่อลิตร และ 179.79-282.85 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเชื้อตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการหมักจีเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก หลังจากนั้นนำจีเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 5 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเชื้อแห้ง ให้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นและผลผลิตไฮโดรเจนอยู่ระหว่าง 0.48-1.42 กรัมต่อลิตร และ 55.08-144.46 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเชื้อตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการใช้ปริมาณเอนไซม์ในการไฮโดรไลซิสสูงจะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลมีเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการไฮโดรไลซิส (Shen and Agblevor, 2008) ส่งผลให้จุลินทรีย์มีอาหารในการผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น

### 2.1.6 ผลของปริมาณของแข็งในการไฮโดรไลซิสที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

การไฮโดรไลซิสชีเลื่อยโดยใช้ปริมาณชีเลื่อยร้อยละ 5 และ 10 ด้วยเอนไซม์ เซลลูเลส พบว่าการหมักชีเลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสโดยใช้ปริมาณชีเลื่อยร้อยละ 10 มีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากกว่าการหมักชีเลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสชีเลื่อยร้อยละ 5 (253.15 และ 179.79 มิลลิลิตรต่อกรัมชีเลื่อย ตามลำดับ) และในกรณีของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นก็เช่นเดียวกัน เมื่อไฮโดรไลซิสชีเลื่อยร้อยละ 10 ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 3.04 กรัมต่อลิตร มากกว่าการไฮโดรไลซิสชีเลื่อยร้อยละ 5 (1.53 กรัมต่อลิตร) อาจมีสาเหตุมาจากการใช้ชีเลื่อยในการไฮโดรไลซิสในปริมาณที่สูงจะส่งผลให้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสมีมากขึ้นตามไปด้วย งานวิจัยของ *Cara et al.* (2007) ศึกษาอิทธิพลของปริมาณของแข็งที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสผสมกับเบต้า-กลูโคสเคส โดยใช้ปริมาณของแข็งร้อยละ 2-30 พบว่าเมื่อทำการไฮโดรไลซิสถึงโอลิฟมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 20 ส่งผลให้ได้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร ทำให้ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้สูงขึ้น

### 2.1.7 ผลของระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

เมื่อไฮโดรไลซิสชีเลื่อยในช่วงเวลาระหว่าง 5 และ 15 ชั่วโมง ปรากฏว่าเมื่อไฮโดรไลซิสชีเลื่อยนาน 15 ชั่วโมง ก่อให้เกิดผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าที่ 5 ชั่วโมง (282.85 และ 253.25 มิลลิลิตรต่อกรัมชีเลื่อย ตามลำดับ) เพราะเมื่อระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสนานขึ้น ทำให้เอนไซม์สามารถย่อยสลายและเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับชีเลื่อยได้นานและทั่วถึง แต่หากเวลาในการไฮโดรไลซิสนานเกินไปอาจจะส่งผลให้ไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นลดลงได้ จากงานวิจัยของ *Wang et al.* (2010) พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาการไฮโดรไลซิส 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 95.78 มิลลิลิตรต่อกรัม หากเพิ่มระยะเวลาการไฮโดรไลซิสนานกว่านี้ผลผลิตไฮโดรเจนจะลดลง

จากผลการประเมินผลผลิตไฮโดรเจนสะสมที่ได้ด้วยแผนการทดลองแฟกต์เก็ตต์-เบอร์แมน ทำให้ทราบว่าอุณหภูมิในการปรับสภาพชีเลื่อย กิจกรรมของเอนไซม์ และเวลาการไฮโดรไลซิสเป็นสภาวะที่มีผลกระทบเชิงบวกต่อการผลิตไฮโดรเจน (ดังตารางที่ 6)

นอกจากนี้การปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น การบดหรือการตัดเพื่อให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลง ส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาเคมีในขั้นตอนการปรับสภาพทางเคมีที่ส่วนใหญ่ใช้กรดอ่อนหรือด่างสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุด ได้แก่ สารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ปรับสภาพร่วมกับการปรับสภาพทางเคมีได้ เนื่องจากการใช้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิและความดันสูงเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของชีวมวล โดยการทำลายเฮมิเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกันระหว่างเซลลูโลสและลิกนินในระยะเวลาสั้น (เกียรติพงษ์ และคณะ, 2554) ดังนั้นการปรับสภาพด้วยกรดหรือร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส (Saha and Cotta, 2006; Zhang *et al.*, 2007)

## 2.2 การปรับสภาพชี้เลื่อยด้วยสารเคมีร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ

การทดลองการปรับสภาพชี้เลื่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกจากแผนการทดลองแฟกต์เก้ตต์-เบอร์แมน ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส เป็นปัจจัยที่มีนัยสำคัญและส่งผลกระทบเชิงบวกต่อผลผลิตไฮโดรเจน คือ ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส (ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้นผลผลิตไฮโดรเจนสะสมจากการหมักเพิ่มขึ้น) แต่เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสส่งผลต่อค่าใช้จ่ายในการผลิตไฮโดรเจนจึงศึกษาการปรับสภาพชี้เลื่อยเพื่อลดปริมาณเอนไซม์ โดยการปรับสภาพชี้เลื่อยด้วยกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ หลังจากปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก รวมทั้งศึกษาการปรับสภาพชี้เลื่อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ ปัจจัยที่ศึกษาในการปรับสภาพชี้เลื่อยนอกจากปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส มีการศึกษาความดันและระยะเวลาในการระเบิดด้วยไอน้ำรวมทั้งความเข้มข้นของสารละลายกรดหรือสารละลายด่าง โดยออกแบบแผนการทดลองการปรับสภาพชี้เลื่อยดังกล่าวด้วยวิธีทาгуชิ (Taguchi) ดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเริ่มต้นจากการหมักชี้เลี้ยงที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบตามแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ

| สภาวะ<br>การ<br>ทดลอง | ความดัน<br>(บาร์) | ระยะ<br>เวลาการ<br>ระเบิดด้วย<br>ไอน้ำ<br>(นาที) | ความเข้มข้น<br>ของ<br>สารละลาย<br>กรด<br>ซัลฟิวริก<br>(ร้อยละ) | ปริมาณ<br>เอนไซม์<br>เซลลูเลส<br>(เอฟพียู<br>ต่อกรัม<br>ชี้เลี้ยงแห้ง) | ความ<br>เข้มข้นน้ำตาล<br>รีดิวซ์<br>เริ่มต้น<br>(กรัมต่อ<br>ลิตร) | ผลผลิต<br>ไฮโดรเจน<br>สะสม<br>(มิลลิลิตร<br>ต่อกรัม<br>ชี้เลี้ยงแห้ง) |
|-----------------------|-------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|                       |                   |                                                  |                                                                |                                                                        |                                                                   |                                                                       |
| 1                     | 5                 | 2                                                | 0.25                                                           | 0                                                                      | $0.16 \pm 0.00$                                                   | $43.02 \pm 5.80$                                                      |
| 2                     | 5                 | 6                                                | 0.75                                                           | 10                                                                     | $1.42 \pm 0.13$                                                   | $70.99 \pm 5.84$                                                      |
| 3                     | 5                 | 10                                               | 1.25                                                           | 20                                                                     | $2.49 \pm 0.00$                                                   | $179.87 \pm 26.61$                                                    |
| 4                     | 10                | 2                                                | 0.75                                                           | 20                                                                     | $2.59 \pm 0.00$                                                   | $161.67 \pm 3.90$                                                     |
| 5                     | 10                | 6                                                | 1.25                                                           | 0                                                                      | $0.62 \pm 0.00$                                                   | $51.48 \pm 4.53$                                                      |
| 6                     | 10                | 10                                               | 0.25                                                           | 10                                                                     | $2.64 \pm 0.13$                                                   | $225.92 \pm 33.06$                                                    |
| 7                     | 15                | 2                                                | 1.25                                                           | 10                                                                     | $2.69 \pm 0.00$                                                   | $189.76 \pm 20.42$                                                    |
| 8                     | 15                | 6                                                | 0.25                                                           | 20                                                                     | $2.48 \pm 0.01$                                                   | $149.78 \pm 29.56$                                                    |
| 9                     | 15                | 10                                               | 0.75                                                           | 0                                                                      | $2.41 \pm 0.01$                                                   | $101.82 \pm 10.25$                                                    |
| ชุดควบคุม             | -                 | -                                                | -                                                              | -                                                                      | $0.17 \pm 0.00$                                                   | $5.26 \pm 0.99$                                                       |

**ตารางที่ 8** ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักขี้เลื่อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆที่ออกแบบตามแผนการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

| สภาวะการทดลอง | ความดัน (บาร์) | ระยะเวลาการระบิดด้วยไอน้ำ (นาท) | ความเข้มข้น                           | ปริมาณ                                        | ความข                                      | ผลผลิต                                       |
|---------------|----------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|
|               |                |                                 | ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ) | เอนไซม์เซลลูเลส (เอฟฟิยูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง) | เข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | ไฮโดรเจนสะสม (มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง) |
| 1             | 5              | 2                               | 0                                     | 0                                             | $0.43 \pm 0.01$                            | $20.42 \pm 0.91$                             |
| 2             | 5              | 6                               | 3                                     | 10                                            | $1.25 \pm 0.02$                            | $112.50 \pm 4.87$                            |
| 3             | 5              | 10                              | 6                                     | 20                                            | $1.49 \pm 0.01$                            | $102.72 \pm 6.90$                            |
| 4             | 10             | 2                               | 3                                     | 20                                            | $1.52 \pm 0.01$                            | $120.05 \pm 6.62$                            |
| 5             | 10             | 6                               | 6                                     | 0                                             | $1.40 \pm 0.01$                            | $34.95 \pm 1.79$                             |
| 6             | 10             | 10                              | 0                                     | 10                                            | $2.88 \pm 0.01$                            | $237.87 \pm 4.29$                            |
| 7             | 15             | 2                               | 6                                     | 10                                            | $1.94 \pm 0.02$                            | $166.76 \pm 7.45$                            |
| 8             | 15             | 6                               | 0                                     | 20                                            | $1.98 \pm 0.04$                            | $146.56 \pm 18.42$                           |
| 9             | 15             | 10                              | 3                                     | 0                                             | $1.62 \pm 0.00$                            | $23.38 \pm 3.06$                             |
| ชุดควบคุม     | -              | -                               | -                                     | -                                             | $0.42 \pm 0.01$                            | $15.17 \pm 0.43$                             |

### 2.2.1 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพขี้เลื่อยที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

จากแผนการทดลองทางสถิติความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระบิดด้วยไอน้ำที่ใช้ในการปรับสภาพขี้เลื่อยมี 3 ระดับ คือ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่ร้อยละ 0.25 0.75 และ 1.25 (หมายถึง การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.25 0.75 และ 1.25 จากสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น หลังจากนั้นใส่ขี้เลื่อยแห้ง 10 กรัม แล้วเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร) สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ร้อยละ 0 3 และ 6 (สารละลายต่างเตรียมเช่นเดียวกับ

สารละลายกรด) พบว่าการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำให้ผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 43.02-225.92 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อย มากกว่าผลผลิตไฮโดรเจนจากการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 (70.99-161.67 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อย) และร้อยละ 1.25 (51.48-189.76 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อย) และการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 ให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 0.16-2.64 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.25 เท่ากับ 0.62-2.69 กรัมต่อลิตร และมากกว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.75 (1.42-2.59 กรัมต่อลิตร) อาจมีสาเหตุมาจากน้ำตาลรีดิวซ์จะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดที่ใช้ปรับสภาพมากขึ้นแต่น้ำตาลบางส่วนอาจเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบที่เป็นพิษ ได้แก่ อนุพันธ์ของฟูแรนระหว่างกระบวนการปรับสภาพ ส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้มีค่าต่างกันเพียงเล็กน้อยแม้ความเข้มข้นของสารละลายกรดที่ใช้ปรับสภาพจะต่างกัน (นันทิกา และคณะ, 2554) และเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรเจนการปรับสภาพจีลื้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเกิดขึ้นได้เร็วกว่าการปรับสภาพจีลื้อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนั้นการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่เข้มข้นร้อยละ 0.25 จึงเป็นสภาวะเหมาะสมสำหรับการศึกษานี้

สำหรับการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการต้มร่วมกับน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0) ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 20.42-237.87 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อย และ 0.43-2.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มากกว่าการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 และ 6 ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 23.38-120.05 และ 34.95-166.76 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อย ตามลำดับ และความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 1.25-1.62 และ 1.40-1.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงอาจก่อให้เกิดการตกค้างของโซเดียมไอออนในเส้นใยจีลื้อยซึ่งมีผลยับยั้งการเติบโตและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Xiaolong *et al.*, 2006) และส่งผลให้สูญเสียประสิทธิภาพในรูปของคาร์บอนมีผลทำให้ผลผลิตไฮโดรเจนและน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง (Laser *et al.*, 2002) ดังนั้นการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงเกินไป จึงทำให้ผลิตผลไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นมีน้อยลง (Pakarinen *et al.*, 2009) ดังงานวิจัยของ Zheng *et al.* (2009) ศึกษาการปรับสภาพข้าวโพด

แห้ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 24 และ 6 ทำการปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน พบว่าเมื่อปรับสภาพข้าวโพดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 2 ให้ผลผลิตมีเทนสูงสุดรวมทั้งสามารถลดปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลงได้จากร้อยละ 30 และ 8.4 เป็นร้อยละ 25.1 และ 7.5 ตามลำดับ

## 2.2.2 ผลของความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

ความดันที่ใช้ในการระเบิดด้วยไอน้ำตามแผนการทดลองทางสถิติ ทั้งการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 5 10 และ 15 บาร์ โดยนำเชื้อเพลิงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วมาเข้าสู่กระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำตามความดันที่ได้กำหนดในข้างต้น พบว่าการหมักเชื้อเพลิงที่ผ่านการปรับสภาพสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 10 บาร์ ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 51.48-225.92 มิลลิลิตรต่อกรัมเชื้อเพลิง เมื่อเทียบกับการใช้ความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 5 และ 15 บาร์ ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 43.02-179.87 และ 101.82-189.76 มิลลิลิตรต่อกรัมเชื้อเพลิงตามลำดับ เช่นเดียวกับการหมักเชื้อเพลิงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 10 บาร์ ให้ผลผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นสูงสุดเท่ากับ 34.95-237.87 มิลลิลิตรต่อกรัมเชื้อเพลิง มากกว่าการปรับสภาพเชื้อเพลิงโดยใช้ความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำที่ 5 และ 15 บาร์ (20.42-102.72 และ 23.38-166.76 มิลลิลิตรต่อกรัมเชื้อเพลิง ตามลำดับ) สำหรับการไฮโดรไลซิสเชื้อเพลิงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 10 บาร์ เกิดความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 0.62-2.64 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับการไฮโดรไลซิสเชื้อเพลิงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 บาร์ (2.41-2.69 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมากกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 5 บาร์ (0.16-2.49 กรัมต่อลิตร) เช่นเดียวกับการไฮโดรไลซิสเชื้อเพลิงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 10 บาร์ เกิดความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 1.40-2.88 กรัมต่อลิตร มากกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 5 บาร์ และ 15 บาร์ (0.43-1.49 และ 1.62-1.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อาจเป็นเพราะถ้าความรุนแรงในการปรับสภาพน้อยเกินไปจะไม่สามารถย่อยสลายพวกเฮมิเซลลูโลสได้ แต่หากใช้ความรุนแรงในการปรับสภาพสูงขึ้น (ความดันและอุณหภูมิในการระเบิดด้วยไอน้ำสูง) จะส่งผลทำให้เกิดด้วยยัง

เช่น เพอร์ฟูรอล และฟูแรนเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Hsu *et al.*, 2010) ส่งผลเสียต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

### 2.2.3 ผลของระยะเวลาในการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

การศึกษานี้ใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำเป็น 3 ค่า ได้แก่ 2 6 และ 10 นาที ผลคือการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ระยะเวลาการระเบิดด้วยไอน้ำนาน 10 นาที ให้ผลผลิตไฮโดรเจน เท่ากับ 101.82-225.92 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อย มากกว่าการใช้ระยะเวลาการระเบิดด้วยไอน้ำนาน 2 และ 6 นาที ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 43.02-189.76 และ 51.48-149.78 มิลลิลิตรต่อลิตร จีลื้อย ตามลำดับ สอดคล้องกับการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพจีลื้อยด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ระยะเวลาการระเบิดด้วยไอน้ำนาน 10 นาที ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 23.38-237.87 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อย มากกว่าการใช้ระยะเวลาการระเบิดด้วยไอน้ำนาน 2 และ 6 นาที ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 20.42-166.76 และ 34.95-146.56 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อย ตามลำดับ) เนื่องจากการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยการระเบิดด้วยไอน้ำเป็น ระยะเวลาานและใช้ความร้อนมากอาจส่งผลให้เกิดสารประกอบยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น เพอร์ฟูรอล เอชเอฟเอ็ม และพวกฟีนอล เป็นต้น (Datar *et al.*, 2007) สำหรับความเข้มข้น น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเมื่อหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพจีลื้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ระยะเวลาการระเบิดด้วยไอน้ำนาน 10 นาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ และ 2.41-2.64 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพ จีลื้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ระยะเวลาการระเบิดด้วยไอน้ำ นาน 2 นาที (0.16-2.69 กรัมต่อลิตร) และมากกว่าการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพจีลื้อยด้วย สารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ระยะเวลาการระเบิดด้วยไอน้ำนาน 6 นาที (0.62-2.48 กรัมต่อลิตร) และเมื่อหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพจีลื้อยด้วยสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ระยะเวลาการระเบิดด้วยไอน้ำนาน 10 นาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 1.49-2.88 กรัมต่อลิตร มากกว่าการหมักจีลื้อยที่ผ่านการปรับ สภาพจีลื้อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ระยะเวลาการระเบิด ด้วยไอน้ำนาน 2 และ 6 นาที (0.43-1.94 และ 1.25-1.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) สอดคล้องกับ ระยะเวลาการปรับสภาพขึ้นไม้ *Salix* ในการศึกษาของ Horn *et al.* ( 2011) ทำการทดลองปรับ

สภาพขึ้นไม้ที่อุณหภูมิ 170-230 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที พบว่าการระเบิดด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที คือสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพขี้เลื่อย

## 2.2.4 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองตามแผนการทดลองทางวิชาการของการปรับสภาพขี้เลื่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ (0-20 เอฟฟิยูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง) ลดลงจากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในแผนการทดลองแพล็คเก็ตต์-เบอร์แมน (5-40 เอฟฟิยูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง) การหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำโดยการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ 10 เอฟฟิยูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง ให้ผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 70.99-225.92 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย มากกว่าผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากการหมักขี้เลื่อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำและไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 20 เอฟฟิยูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง (149.78-179.87 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย) สำหรับการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ หลังจากนั้นไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 10 เอฟฟิยูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 112.50-237.87 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย ซึ่งมากกว่าผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 20 เอฟฟิยูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง (102.72-146.56 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย) กรณีของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ พบว่าเมื่อไม่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลสในการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อย (ปริมาณเอนไซม์ 0 เอฟฟิยูต่อกรัม) เกิดความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุด (0.16 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 10 เอฟฟิยูต่อกรัม เกิดความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นสูงสุดเท่ากับ 1.42-2.69 กรัมต่อลิตร มากกว่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 20 เอฟฟิยูต่อกรัม (2.48-2.59 กรัมต่อลิตร) ในส่วนของการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 10 เอฟฟิยูต่อกรัม ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นสูงสุดเท่ากับ 1.25-2.88 กรัมต่อลิตร มากกว่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการไฮโดรไลซิสขี้เลื่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 20 เอฟฟิยูต่อกรัม (1.49-1.98 กรัมต่อลิตร) แสดงให้เห็นได้ว่า

การปรับสภาพโดยใช้สารเคมีร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำสามารถช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์เซลลูเลสได้ เนื่องจากการระเบิดด้วยไอน้ำจะช่วยใหเอนไซม์เซลลูเลสมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้มากขึ้น (Hahn *et al.*, 2006; Mosier *et al.*, 2005)

การเปรียบเทียบสภาวะของการปรับสภาพจีเื้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำและการปรับสภาพจีเื้อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ส่งผลให้เกิดผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดจากการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองตามแผนการทดลองทางทฤษฎี (ตารางที่ 9) พบว่าการปรับสภาพจีเื้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำและการปรับสภาพจีเื้อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำให้ผลผลิตไฮโดรเจนใกล้เคียงกัน (238.32 และ 237.87 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเื้อยตามลำดับ) ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพจีเื้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำมีส่วนช่วยทำให้ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้สูงขึ้น โดยปัจจัยในการปรับสภาพทั้ง 2 วิธีนี้มี 2 ปัจจัยที่ส่งผลให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเหมือนกันได้แก่ ความดัน (ที่ 10 บาร์) และระยะเวลาในการระเบิดด้วยไอน้ำ (นาน 10 นาที) แต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาปรับตัว (lag time) และอัตราการผลิตไฮโดรเจน (rate) ที่ได้จากการหมักจีเื้อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำมีค่าเท่ากับ 6 ชั่วโมง และ 40.67 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งเร็วและมากกว่าระยะเวลาปรับตัว (lag time) และอัตราการผลิตไฮโดรเจน (rate) ที่ได้จากการหมักจีเื้อยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำมีค่าเท่ากับ 12 ชั่วโมง และ 18.59 มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษาดังกล่าวคือการปรับสภาพจีเื้อยด้วยวิธีตอบสนองที่พื้นผิว (RSM) จึงเลือกวิธีการปรับสภาพจีเื้อยโดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ

**ตารางที่ 9** ผลผลิตไฮโดรเจนและอัตราการเกิดไฮโดรเจนจากแผนการทดลองทางสถิติที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพจีลื้อด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำจากการทำซ้ำเพื่อยืนยันผล

| สภาวะการทดลอง                                  | ระยะ           |                               | ความเข้มข้น                                                | ปริมาณ                                      | ผลผลิต                                      | อัตรา                                        |
|------------------------------------------------|----------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|
|                                                | ความดัน (บาร์) | เวลาการระเบิดด้วยไอน้ำ (นาที) | ของสารละลายกรดซัลฟิวริก/สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละ) | เอนไซม์เซลลูเลส (เอฟฟิยู่ต่อกรัมจีลื้อแห้ง) | ไฮโดรเจนสูงสุด (มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อแห้ง) | การเกิดไฮโดรเจน (มิลลิลิตรต่อลิตรต่อชั่วโมง) |
| การปรับสภาพจีลื้อด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก      | 10             | 10                            | 1.25                                                       | 10                                          | 238.32                                      | 40.67                                        |
| การปรับสภาพจีลื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ | 10             | 10                            | 0                                                          | 10                                          | 237.87                                      | 18.59                                        |

การศึกษาตามแผนการทดลองต่อไป คือ วิธีการปรับสภาพจีลื้อด้วยวิธีการตอบสนองที่พื้นผิว เลือกการปรับสภาพจีลื้อด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีการปรับสภาพจีลื้อ เนื่องจากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นที่นิยมมาก เพราะสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี นอกจากนี้ น้ำตาลส่วนใหญ่ที่ละลายน้ำได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเป็นโมโนเมอร์ จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย (Asghari *et al.*, 1996; Ingram and Doran, 1995) ส่วนการปรับสภาพด้วยน้ำร้อนหรือไอน้ำสามารถลดค่าสารเคมีและเกิดของเสียน้อยลงแต่บางส่วนของลิกนินจะแตกออกหรือถูกย่อยไม่สมบูรณ์ (Alvira *et al.*, 2010) ในขณะที่การกำจัดเฮมิเซลลูโลสและการแตกตัวของเซลลูโลสจะมีขีดจำกัด (Liu and Wyman, 2004) ส่งผลให้ผลตอบแทนที่ได้มีขีดจำกัด (Shen and Wyman, 2011)

## 2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพจีลื้อด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ

การประเมินจากแผนการทดลองทางสถิติทำให้ทราบช่วงที่เหมาะสมของความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก ความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำ และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน จึงศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาจุดที่เหมาะสมของปัจจัยดังกล่าวในการผลิตไฮโดรเจนด้วยวิธีการตอบสนองที่พื้นผิว (Response surface methodology; RSM)

การศึกษานี้ปรับสภาพจีลื้อด้วยกรดซัลฟิวริกก่อนการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำหลังจากนั้นไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและหมักแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษานี้มี 3 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริก ความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำ และปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส (ดังตารางที่ 10) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพจีลื้อด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ปริมาณจีลื้อที่ใช้ในการปรับสภาพร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ระยะเวลาในการไฮโดรไลซิส 15 ชั่วโมง ระยะเวลาในการระเบิดด้วยไอน้ำ 10 นาที และปริมาณจีลื้อที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก (ใช้ตามแผนการทดลองก่อนหน้านี้)

**ตารางที่ 10** ผลผลิตไฮโดรเจนและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเริ่มต้นจากการหมักกล้วยที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำและการไฮโดรไลซิสที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองที่พื้นผิว

| สภาวะการทดลอง | ความเข้มข้น                   |                | ปริมาณเอนไซม์                           |                                     | ความเข้มข้น | ผลผลิตไฮโดรเจนสะสม (มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง) |
|---------------|-------------------------------|----------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------|
|               | สารละลายกรดซัลฟิวริก (ร้อยละ) | ความดัน (บาร์) | เซลล์ูเลส (เอฟฟิยูต่อกรัมขี้เลื่อยแห้ง) | น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | น้ำตาล      |                                                    |
| 1             | 0.07                          | 10             | 10                                      | 2.78±0.01                           |             | 137.50±8.61                                        |
| 2             | 0.75                          | 5              | 5                                       | 1.43±0.01                           |             | 53.50±16.49                                        |
| 3             | 0.75                          | 5              | 15                                      | 2.41±0.01                           |             | 107.14±0.90                                        |
| 4             | 0.75                          | 15             | 5                                       | 1.50±0.00                           |             | 84.94±16.38                                        |
| 5             | 0.75                          | 15             | 15                                      | 2.83±0.01                           |             | 124.80±5.71                                        |
| 6             | 1.75                          | 1.59           | 10                                      | 1.41±0.01                           |             | 81.64±9.88                                         |
| 7             | 1.75                          | 10             | 1.59                                    | 2.79±0.01                           |             | 78.42±2.72                                         |
| 8             | 1.75                          | 10             | 10                                      | 3.09±0.01                           |             | 215.77±0.72                                        |
| 9             | 1.75                          | 10             | 18.41                                   | 2.80±0.01                           |             | 124.52±11.58                                       |
| 10            | 1.75                          | 18.41          | 10                                      | 2.32±0.01                           |             | 43.84±22.51                                        |
| 11            | 2.75                          | 5              | 5                                       | 1.38±0.13                           |             | 63.92±1.75                                         |
| 12            | 2.75                          | 5              | 15                                      | 2.73±0.01                           |             | 96.80±2.05                                         |
| 13            | 2.75                          | 15             | 5                                       | 1.36±0.01                           |             | 72.62±26.30                                        |
| 14            | 2.75                          | 15             | 15                                      | 2.73±0.01                           |             | 121.90±2.93                                        |
| 15            | 3.43                          | 10             | 10                                      | 2.80±0.01                           |             | 136.61±2.85                                        |
| ชุดควบคุม     | -                             | -              | -                                       | 0.83±0.01                           |             | 14.02±0.15                                         |

### 2.3.1 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกในการปรับสภาพขี้เลื่อยที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการปรับสภาพขี้เลื่อยตามแผนการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองที่พื้นผิวมีทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ สารละลายกรดซัลฟิว-

ริกเข้มข้นร้อยละ 0.07 0.75 1.75 2.75 และ 3.43 โดยปริมาตร ผลจากการทดลองพบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.75 โดยปริมาตร ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 43.84-215.77 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย มากกว่าผลผลิตไฮโดรเจนสะสมของการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.07 3.43 0.75 และ 2.75 ตามลำดับ เช่นเดียวกันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่ได้จากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.75 โดยปริมาตร ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นระหว่าง 1.41-3.09 กรัมต่อลิตร มากกว่าหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3.43 0.75 0.77 และ 2.75 ตามลำดับ เนื่องจากหากปรับสภาพด้วยสารละลายกรดที่มีความเข้มข้นน้อยเกินไปทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายได้ไม่ดีหรือบางส่วนที่ตายได้กลายเป็นน้ำตาลที่อยู่ในรูปโอลิโกเมอร์มากกว่าโมโนเมอร์ (Zhang *et al.*, 2011) ซึ่งยากต่อการที่จุลินทรีย์นำไปใช้เป็นสับสเตรทและปริมาณน้ำตาลจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายกรดที่ใช้ปรับสภาพ แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดจนเกินจุดเหมาะสมปริมาณน้ำตาลที่ได้จะลดลงเนื่องจากน้ำตาลบางส่วนอาจถูกย่อยสลายไปเป็นตัวยับยั้ง ได้แก่ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลและเฟอรัล

### 2.3.2 ผลของความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

แผนการทดลองนี้แปรผันความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำ 5 ระดับ ได้แก่ 1.59 5 10 15 และ 18.41 บาร์ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นการใช้ความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำเท่ากับ 10 บาร์ เป็นค่าความดันในการปรับสภาพขี้เลื่อยที่ส่งผลให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงที่สุด 215.77 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย เนื่องจากความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำจะแปรผันตามอุณหภูมิการระเบิดด้วยไอน้ำเมื่อความดันหรืออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณของสารยับยั้ง เช่น สารประกอบฟูแรนจะเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากสารยับยั้งดังกล่าวถูกสร้างขึ้นโดยการสลายตัวของน้ำตาลที่ผลิตในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย (Zhang *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2008) จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้ลดลง โดยเมื่อใช้ความดันในการปรับสภาพขี้เลื่อยตั้งแต่ 1.59-10 บาร์ แนวโน้มในของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 1.41-3.09 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความดันในการปรับสภาพขี้เลื่อยจาก 10-18.41 บาร์ ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นลดลงจาก 3.09 เหลือ 2.32 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 10)

### 2.3.3 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน

ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสที่เปลี่ยนในแผนการทดลองนี้ แปรผันปริมาณเอนไซม์เป็น 5 ค่า ดังนี้ 1.59 5 10 15 และ 18.41 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเลื่อยแห้ง พบว่า การหมักจีเลื่อยที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปริมาณ 10 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเลื่อยแห้ง ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมประมาณ 43-215 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเลื่อย และความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น เท่ากับ 1.41-3.09 กรัมต่อลิตร มากกว่าการหมักจีเลื่อยที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปริมาณ 1.59 5 15 และ 18.41 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเลื่อยแห้ง โดยผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากการหมักจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสจีเลื่อยเพิ่มขึ้นแต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในการไฮโดรไลซิสมากเกินไปเอนไซม์เซลลูเลสจะกระจายและถูกดูดซับลงบนพื้นผิวของเซลลูโลสเกิดเป็นสารตัวกลางที่ซับซ้อนจึงไม่สามารถทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ (Ran *et al.*, 2012) หรืออาจมีสาเหตุมาจากเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาในการย่อยสลายเซลลูโลสจะเริ่มลดลง เพราะสารตั้งต้นเริ่มหมดไปเกิดเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอาจรวมกับเอนไซม์แทนสารตั้งต้นปฏิกิริยาในการย่อยสลายเซลลูโลสจึงถูกจำกัด

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้ง 3 ของการปรับสภาพจีเลื่อยก่อนการหมัก (ความดัน ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริก และปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส) ที่ส่งผลให้ได้ปริมาณไฮโดรเจนสูงสุด ความสัมพันธ์ระหว่างความดันที่ 10 บาร์ และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1.75 (ภาพที่ 11) ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเลื่อย และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1.75 (ภาพที่ 12) และความสัมพันธ์ของความดันและปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 บาร์ และ 10 เอฟฟิยูต่อกรัมจีเลื่อย (ภาพที่ 13) ส่งผลให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 215.77 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเลื่อย และจากการทำนายด้วยแบบจำลองทางสถิติ พบว่าการหมักจีเลื่อยโดยปรับสภาพจีเลื่อยที่ร้อยละ 10 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.69 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 9.81 บาร์ นาน 10 นาที จากนั้นไฮโดรไลซ์จีเลื่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ 11.15 เอฟฟิยูต่อกรัม นาน 15 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไฮโดรเจน 217.80 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเลื่อย ซึ่งความสัมพันธ์ของปัจจัยความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก ความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำ และปริมาณเอนไซม์ในการไฮโดรไลซิสที่มีผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนแสดงเป็นสมการได้ดังนี้

$$Y = -12.18 A + 14.16B + 185.39C - 19.13AB - 14.17AC + 3.27BC - 284.05A^2 - 546.79B^2 - 409.86C^2$$

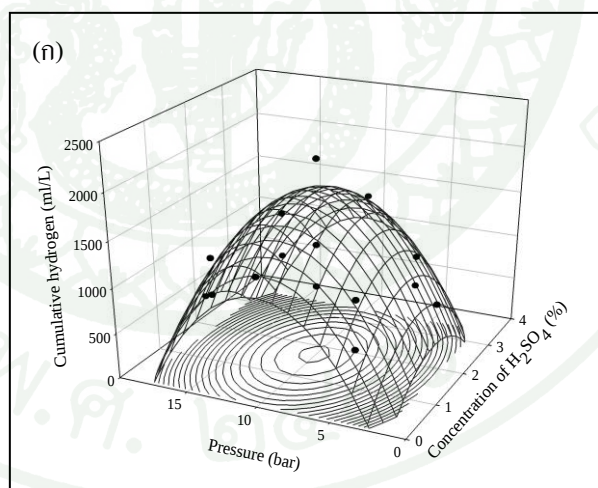
จากสมการ Y คือ ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด (มิลลิลิตรต่อกรัมจีเลื่อย)

A คือ ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริก (ร้อยละ)

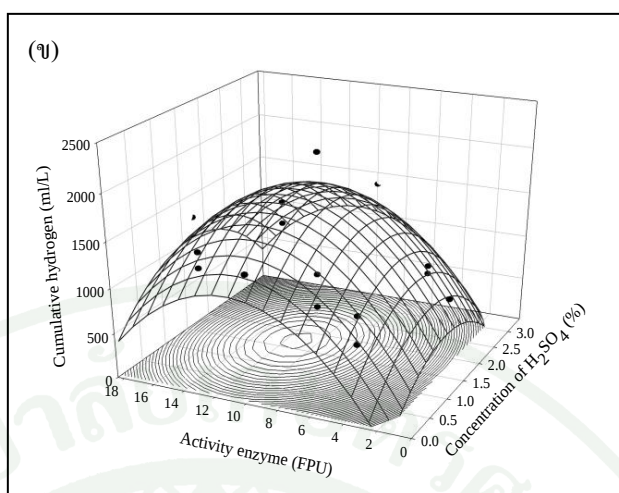
B คือ ความดันในการระเบิดด้วยไอน้ำ (บาร์)

C คือ ปริมาณเอนไซม์ (เอฟฟิยูต่อกรัมจีเลื่อย)

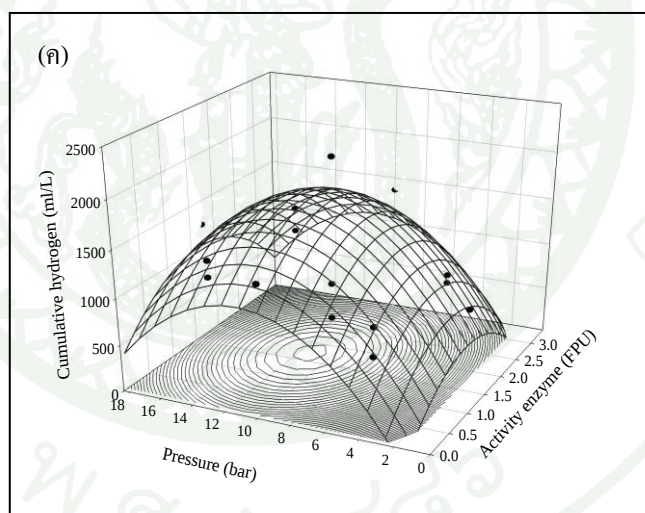
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพจีเลื่อยตามแผนการทดลองตอบสนองที่พื้นผิว คือ การหมักจีเลื่อยโดยปรับสภาพจีเลื่อยที่ร้อยละ 10 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.75 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 10 บาร์ นาน 10 นาที หลังจากนั้นไฮโดรไลซ์จีเลื่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 10 เอฟฟิยูต่อกรัม นาน 15 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไฮโดรเจน 215.77 มิลลิลิตรต่อกรัมจีเลื่อย ขณะที่ตารางเปรียบเทียบการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการปรับสภาพวัตถุดิบต่อการผลิตไฮโดรเจนแสดงดังตารางที่ 11



ภาพที่ 11 ความดันและความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม



ภาพที่ 12 ปริมาณเอนไซม์และความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม



ภาพที่ 13 ผลของความดันและปริมาณเอนไซม์เซลล์ูเลสที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม

ตารางที่ 11 ผลผลิตไฮโดรเจนจากการหมักชีวมวลที่ปรับสภาพโดยวิธีต่างๆ

| เชื้อ                     | ขั้วเสตกรท                       | วิธีการปรับสภาพ                                      | อุณหภูมิ<br>(องศา<br>เซลเซียส) | ผลผลิต<br>ไฮโดรเจน<br>(มิลลิลิตร<br>ต่อกรัม) | อ้างอิง                           |
|---------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|
| mix culture               | wheat straw                      | HCl                                                  | 36                             | 62.8                                         | Fan <i>et al.</i> , (2006)        |
| mix culture               | corn stalk                       | 0.5%NaOH at 36°C                                     | 36                             | 57                                           | Zhang <i>et al.</i> , (2007)      |
| mix culture               | corn cob                         | 1%HCl at 100 °C<br>30 min                            | 36                             | 107.9                                        | Pan <i>et al.</i> , (2009)        |
| <i>C. butyricum</i>       | corn straw                       | 1.5 MPa, 10 min                                      | 35                             | 68                                           | Li and Chen (2007)                |
| <i>C. saccharolyticus</i> | maize leaves                     | 130°C, 30 min                                        | 70                             | 42                                           | Ivanova <i>et al.</i> ,<br>(2009) |
| <i>C. saccharolyticus</i> | Sweet<br>sorghum<br>plant        | 130°C, 30 min                                        | 70                             | 32.4                                         | Ivanova <i>et al.</i> ,<br>(2009) |
| <i>C. saccharolyticus</i> | sugarcane<br>bagasse             | 130°C, 30 min                                        | 70                             | 19.6                                         | Ivanova <i>et al.</i> ,<br>(2009) |
| <i>C. saccharolyticus</i> | siphium<br>trifoliatum<br>leaves | 130°C, 30 min                                        | 70                             | 10.3                                         | Ivanova <i>et al.</i> ,<br>(2009) |
| <i>C. saccharolyticus</i> | wheat straw                      | 130°C, 30 min                                        | 70                             | 49                                           | Ivanova <i>et al.</i> ,<br>(2009) |
| mix culture               | corn stover                      | 220°C, 3 min                                         | 35                             | 49                                           | Datar <i>et al.</i> , (2007)      |
| mix culture               | corn stover                      | 1.2% HCl at 200°C<br>1 min                           | 35                             | 66                                           | Datar <i>et al.</i> , (2007)      |
| mix culture               | wheat straw                      | 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> at 120°C<br>90 min | 36                             | 41.9                                         | Nasirian (2012)                   |
| mix culture               | wheat straw                      | 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> at 120°C<br>90 min | 36                             | 141                                          | Nasirian (2012)                   |
| mix culture               | sawdust                          | 2.2%NaOH at 100°C<br>447 min + enzyme 5<br>FPU/g     | 35                             | 351.53                                       | จีรศักดิ์ (2553)                  |

ตารางที่ 11 (ต่อ)

| เชื้อ       | ซับสเตรท | วิธีการปรับสภาพ                                                          | อุณหภูมิ<br>(องศา<br>เซลเซียส) | ผลผลิต<br>ไฮโดรเจน<br>(มิลลิลิตร<br>ต่อกรัม) | อ้างอิง     |
|-------------|----------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|-------------|
| mix culture | sawdust  | 0.5% $H_2SO_4$ at 60°C<br>120 min + enzyme 40 FPU/g                      | 55                             | 282.85                                       | งานศึกษานี้ |
| mix culture | sawdust  | 1.25% $H_2SO_4$ at 60°C<br>120 min + 10 bar, 10 min<br>+ enzyme 10 FPU/g | 55                             | 238.32                                       | งานศึกษานี้ |
| mix culture | sawdust  | boiled at 60°C, 120 min<br>+10 bar, 10 min + enzyme<br>10 FPU/g          | 55                             | 237.87                                       | งานศึกษานี้ |
| mix culture | sawdust  | 1.75% $H_2SO_4$ at 60°C<br>120 min +10 bar, 10 min<br>+ enzyme 10 FPU/g  | 55                             | 215.77                                       | งานศึกษานี้ |

### 3. การปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ผสม ในกากระบอบการหมักแบบน้ำเสียแบบไร้อากาศ เชื้อจุลินทรีย์ผสมอาจมีประโยชน์ในการช่วยในการเผาผลาญของกระบวนการเมแทบอลิซึมสำหรับวัตถุดิบที่มีความซับซ้อนทำให้การย่อยสลายมีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ แต่อย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้เชื้อผสมไฮโดรเจนที่ถูกผลิตขึ้นแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน (hydrogen-producing bacteria) อาจจะถูกบริโภคโดยแบคทีเรียที่บริโภคไฮโดรเจน (hydrogen-consuming bacteria) ดังนั้นจำเป็นต้องมีการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ก่อนเพื่อกำจัดเชื้อที่ผลิตมีเทนและส่งเสริมประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน เช่น การปรับสภาพด้วยความร้อน การปรับสภาพด้วยกรด การปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ก่อน เช่น การปรับสภาพด้วยความร้อน การปรับสภาพด้วยกรด และต่าง เป็นต้น (Ren *et al.*, 2008) โดยทำการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ตามแผนการทดลองทางสถิติ (ตารางที่ 12)

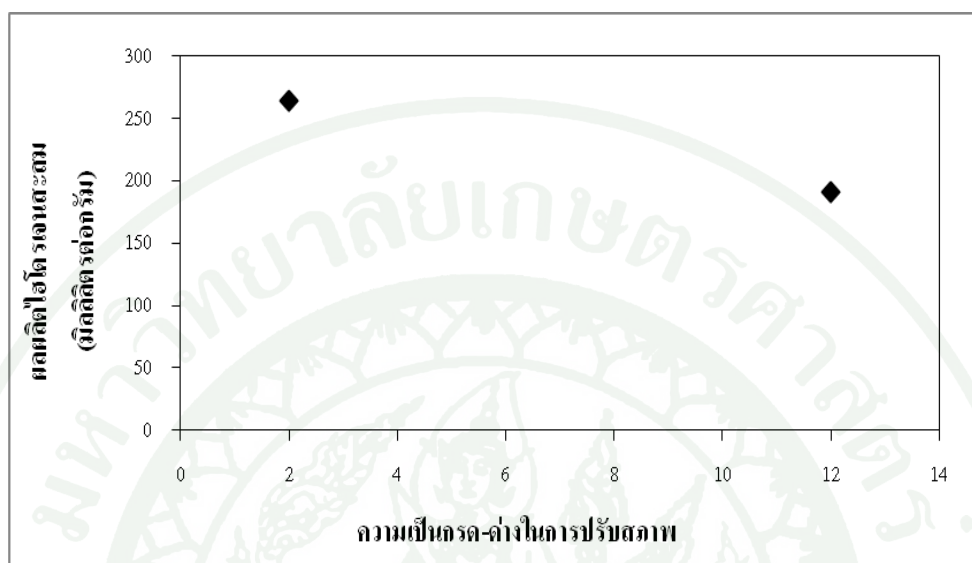
**ตารางที่ 12** ผลผลิตไฮโดรเจนจากการหมักจี๊เลี้ยงที่ผ่านการปรับสภาพร่วมกับกากตะกอนที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างร่วมกับความร้อนที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ

| สภาวะการทดลอง | การปรับสภาพกากตะกอน |                            |                       | ผลผลิตไฮโดรเจนสะสม<br>(มิลลิลิตรต่อกรัมจี๊เลี้ยงแห้ง) |
|---------------|---------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|
|               | ความเป็นกรด-ด่าง    | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | ระยะเวลา<br>(ชั่วโมง) |                                                       |
| 1             | 2                   | 50                         | 1                     | 191.03±2.70                                           |
| 2             | 2                   | 50                         | 2                     | 228.77±15.46                                          |
| 3             | 2                   | 100                        | 1                     | 264.68±0.25                                           |
| 4             | 2                   | 100                        | 2                     | 184.39±13.60                                          |
| 5             | 12                  | 50                         | 1                     | 123.84±4.26                                           |
| 6             | 12                  | 50                         | 2                     | 93.23±7.81                                            |
| 7             | 12                  | 100                        | 1                     | 191.06±8.58                                           |
| 8             | 12                  | 100                        | 2                     | 103.49±20.04                                          |
| ชุดควบคุม     | -                   | -                          | -                     | 72.77±4.24                                            |

### 3.1 ผลของความเป็นกรดด่างในการปรับสภาพกากตะกอนที่มีต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

การปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 และ 12 ตามลำดับ พบว่ากากตะกอนถูกปรับสภาพให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 264.68 มิลลิลิตรต่อกรัมจี๊เลี้ยง (ดังตารางที่ 12) ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 มีแนวโน้มที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมมากกว่าที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 12 (ดังภาพที่ 14) อาจเพราะสภาวะการปรับสภาพจี๊เลี้ยงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจนจึงมีความทนต่อสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 ได้มากกว่าสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 12 และการปรับสภาพกากตะกอนในสภาวะที่เป็นกรดจะเพิ่มความสามารถในการย่อยของเชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนและช่วยยับยั้งเชื้อที่ไม่ผลิตไฮโดรเจนได้ ดังนั้นจึงทำให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นและลดการสูญเสียไฮโดรเจน (Liu *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chang *et al.* (2011) ได้ทำการปรับสภาพกากตะกอนจากถังตกตะกอนน้ำเสียชุมชนด้วยด้วยกรด ด่าง ความร้อนคลอโรฟอร์ม การเติมอากาศ และสาร 2-โบร

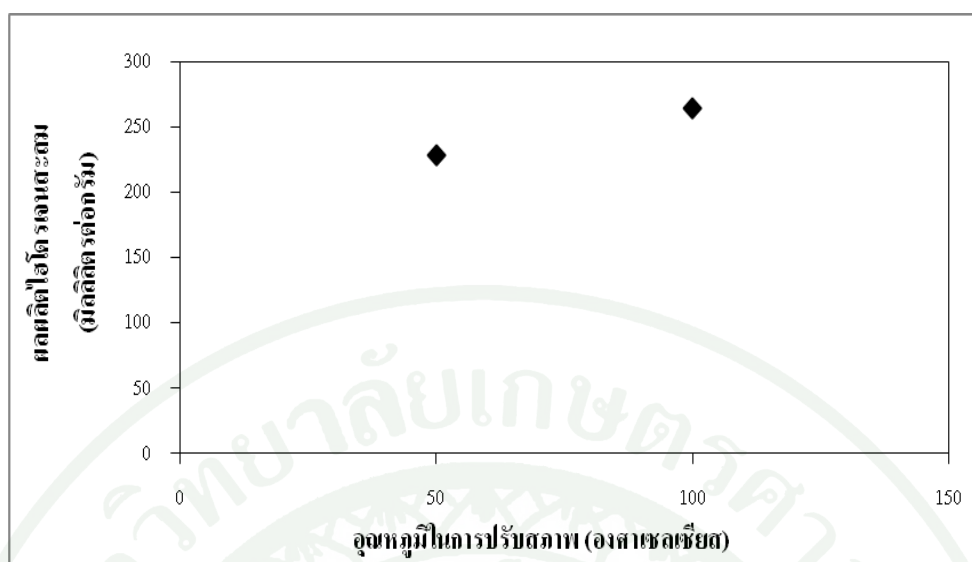
โมอีเทนซัลโฟรเนต พบว่าเมื่อปรับสภาพกากตะกอนด้วยกรดส่งผลให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 1.51 โมลต่อโมลกลูโคส



ภาพที่ 14 ความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนที่มีผลต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม

### 3.2 ผลของอุณหภูมิในการปรับสภาพกากตะกอนต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

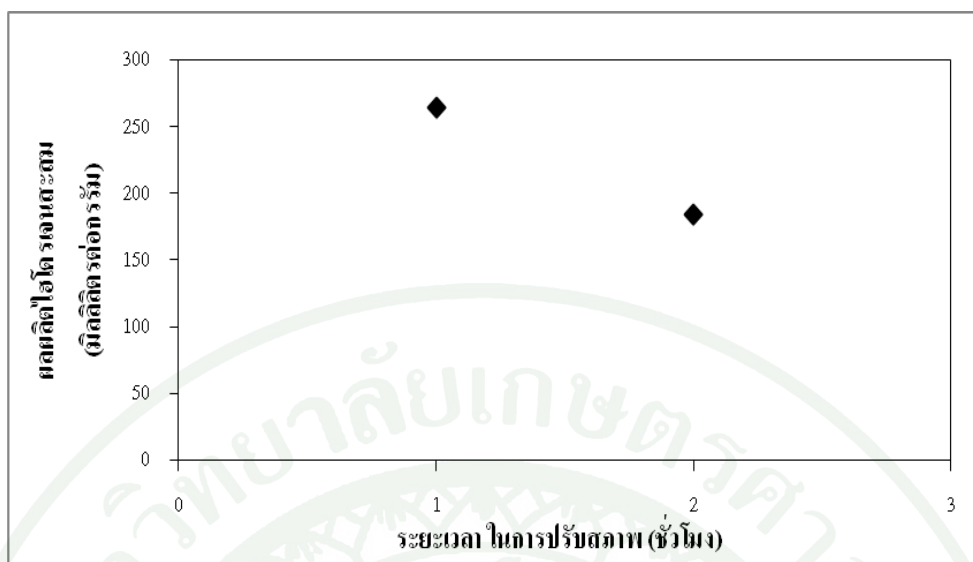
อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอน คือ 50 และ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งการใช้ อุณหภูมิหรือความร้อนในการปรับสภาพกากตะกอนนั้น เป็นวิธีที่พบมากที่สุดสำหรับการคัดเลือกเชื้อ จุลินทรีย์ที่ผลิตไฮโดรเจน เพราะความร้อนจะช่วยกำจัดเชื้อที่ไม่สร้างสปอร์ เช่น จุลินทรีย์ที่ผลิต มีเทน (Hawkes *et al.*, 2007; Duangmanee *et al.*, 2007) การปรับสภาพกากตะกอนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนเท่ากับ 264.68 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย มากกว่าการ ปรับสภาพที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (228.77 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย) (ดังภาพที่ 15) อาจเป็น เพราะการปรับสภาพกากตะกอนที่อุณหภูมิสูงมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อที่ผลิตมีเทนหรือเชื้อที่ บริโภคไฮโดรเจนได้ดีกว่าการปรับสภาพกากตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ



ภาพที่ 15 อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนที่มีผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

### 3.3 ระยะเวลาในการปรับสภาพกากตะกอนต่อปริมาณไฮโดรเจนสะสม

การปรับสภาพกากตะกอนในแผนการทดลองนี้มีระยะเวลาในการปรับสภาพ คือ 1 และ 2 ชั่วโมง จากผลการทดลองปรากฏว่า ระยะเวลาในการปรับสภาพกากตะกอนนาน 1 ชั่วโมง เป็นเวลาที่ดีที่สุดที่ส่งผลให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนสูง คือ 264.68 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย (ดังภาพที่ 16) คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Vasconcelos *et al.* (2011) ได้ทำการปรับสภาพกากตะกอนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการทำงานของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิต มีเทนและเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนและหากใช้ความร้อนในการปรับสภาพนานเกินไปความร้อนจะไปทำลายหรือลดจำนวนกลุ่มจุลินทรีย์ลง (Zhu and Beland, 2006) บางกรณีสามารถทำลายเชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนที่ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ เช่น *Enterobacter sp.* (Watanabe *et al.*, 1997)



ภาพที่ 16 ระยะเวลาในการปรับสภาพกากตะกอนที่มีผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพกากตะกอนในงานวิจัยนี้ คือ การปรับสภาพกากตะกอนความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นศึกษาความเข้มข้นกรดอินทรีย์ระเหยง่ายในสารละลายที่ได้หลังจากการหมักก็เหลือ 168 ชั่วโมง

#### 4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักขี้เลื่อยเพื่อผลิตไฮโดรเจน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักขี้เลื่อย ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของเหล็ก ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ความเข้มข้นของแคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ความเข้มข้นของแมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ความเข้มข้นของสังกะสี ( $\text{Zn}^{2+}$ ) และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ทำการแปรผันแต่ละปัจจัยตามแผนการทดลองทากูชิ (ดังตารางที่ 13) ปัจจัยดังกล่าวข้างต้นเป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการใช้สำหรับการเจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Lin and Lay, 2004) ส่งเสริมประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในกิจกรรมการย่อยสลายสารอินทรีย์ละลายน้ำให้เป็นไฮโดรเจน (Lin and Lay, 2005) ถ้าได้รับมากหรือน้อยเกินไปอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมต่างๆ ในการย่อยสลายซับซ้อนหรือวัตถุดิบเริ่มต้นได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ควรจะได้รับสารอาหารในปริมาณที่เหมาะสม

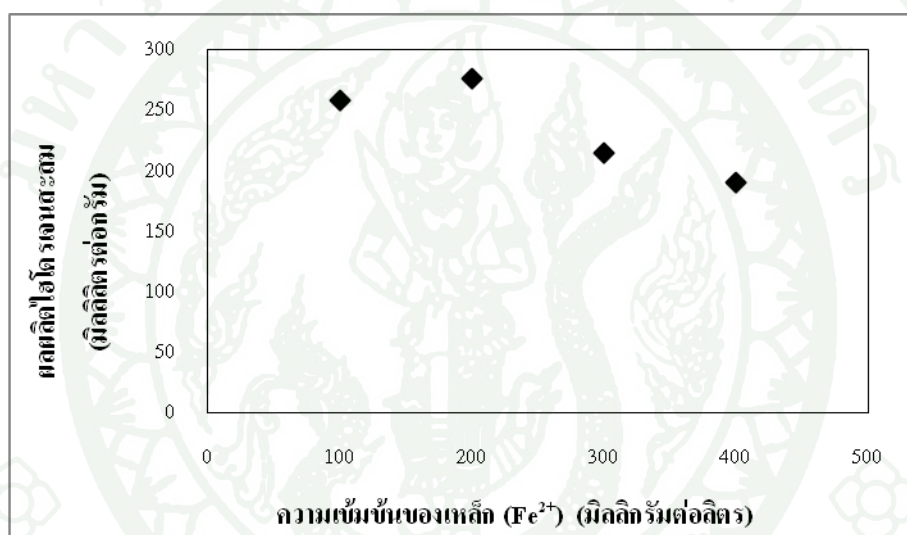
**ตารางที่ 13** ผลของความเข้มข้นของเหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจนตามแผนการทดลองทางสถิติ

| สถานะการทดลอง | ปัจจัยที่ทำการศึกษา                                |                                                    |                                                    |                                                    | อัตราส่วน C:N | ผลผลิตไฮโดรเจนสะสม (มิลลิลิตรต่อกรัม) |
|---------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------|
|               | ความเข้มข้นของ $\text{Fe}^{2+}$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ความเข้มข้นของ $\text{Ca}^{2+}$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ความเข้มข้นของ $\text{Mg}^{2+}$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | ความเข้มข้นของ $\text{Zn}^{2+}$ (มิลลิกรัมต่อลิตร) |               |                                       |
| 1             | 100                                                | 150                                                | 50                                                 | 0.25                                               | 15            | 223.32±8.99                           |
| 2             | 100                                                | 400                                                | 100                                                | 0.50                                               | 30            | 257.67±10.51                          |
| 3             | 100                                                | 650                                                | 150                                                | 0.75                                               | 45            | 193.88±4.52                           |
| 4             | 100                                                | 900                                                | 200                                                | 1.00                                               | 60            | 111.36±23.76                          |
| 5             | 200                                                | 150                                                | 100                                                | 0.75                                               | 60            | 275.77±3.70                           |
| 6             | 200                                                | 400                                                | 50                                                 | 1.00                                               | 45            | 230.42±0.25                           |
| 7             | 200                                                | 650                                                | 200                                                | 0.25                                               | 30            | 216.36±1.91                           |
| 8             | 200                                                | 900                                                | 150                                                | 0.50                                               | 15            | 204.18±8.14                           |
| 9             | 300                                                | 150                                                | 150                                                | 1.00                                               | 30            | 213.79±9.26                           |
| 10            | 300                                                | 400                                                | 200                                                | 0.75                                               | 15            | 214.85±1.94                           |
| 11            | 300                                                | 650                                                | 50                                                 | 0.50                                               | 60            | 211.59±12.15                          |
| 12            | 300                                                | 900                                                | 100                                                | 0.25                                               | 45            | 161.49±1.84                           |
| 13            | 400                                                | 150                                                | 200                                                | 0.50                                               | 45            | 190.45±0.76                           |
| 14            | 400                                                | 400                                                | 150                                                | 0.25                                               | 60            | 177.83±1.91                           |
| 15            | 400                                                | 650                                                | 100                                                | 1.00                                               | 15            | 190.33±1.95                           |
| 16            | 400                                                | 900                                                | 50                                                 | 0.75                                               | 30            | 151.34±3.11                           |
| ชุดควบคุม     | -                                                  | -                                                  | -                                                  | -                                                  | 20            | 159.69±1.14                           |

#### 4.1 ผลของความเข้มข้นเหล็กที่มีต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

เหล็กเป็นองค์ประกอบจำเป็นที่มีอยู่ในเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการผลิตไฮโดรเจนของจุลินทรีย์แบบไร้อากาศ (Lin and Lay, 2005) ในการทดลองนี้ศึกษาความเข้มข้นของเหล็ก 4 ค่า 100 200 300 และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของเหล็กเท่ากับ 200

มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด 275.77 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย (ดังภาพที่ 17) ใกล้เคียงกับงานวิจัยของจิสักดี (2553) ศึกษาปริมาณเหล็ก ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจน ในช่วงความเข้มข้นของเหล็กระหว่าง 58.58 – 341.42 พบว่าความเข้มข้นของเหล็กเท่ากับ 209.03 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 394.94 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัม อาจเป็นเพราะหากจุลินทรีย์ได้รับเหล็กมากเกินไปก็จะทำให้เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (Yang and Shen, 2006) ในทำนองเดียวกันหากได้รับน้อยเกินไปก็จะทำให้จุลินทรีย์ทำงานได้ไม่เต็มที่หรืออ่อนแอลง (Zhang and Shen, 2006) ถึงแม้เหล็กจะเป็นเพียงธาตุอาหารรองแต่ก็เป็นสิ่งจำเป็นต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Li and Fang, 2007)

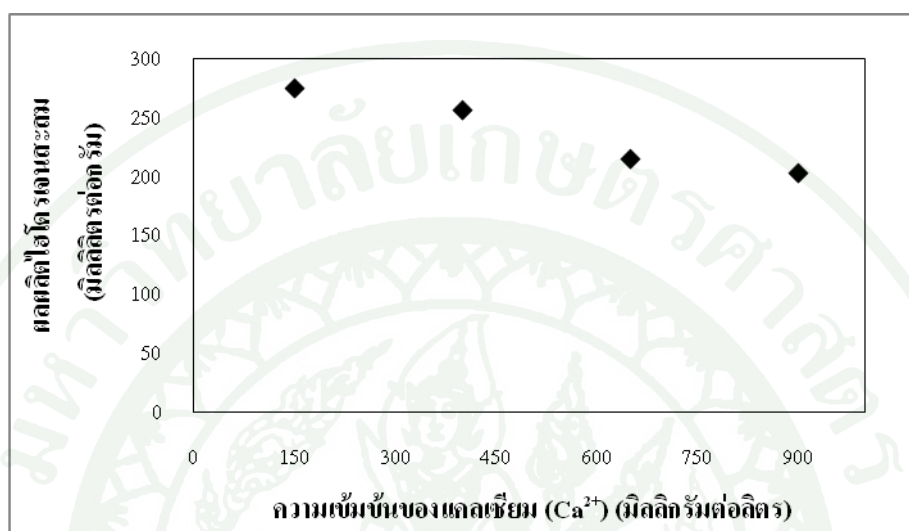


ภาพที่ 17 ความเข้มข้นของเหล็กที่มีผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

#### 4.2 ผลของความเข้มข้นแคลเซียมที่มีต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

แคลเซียมไอออนเป็นธาตุอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการเจริญเติบโต จากผลการทดลองความเข้มข้นของแคลเซียมทั้ง 4 ระดับ ได้แก่ 150 400 650 และ 900 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมเท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มในการให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมมากที่สุด 275.77 มิลลิลิตรต่อกรัมขี้เลื่อย เมื่อเทียบกับความเข้มข้นทั้งหมด (ดังภาพที่ 18) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chang and Lin (2006) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนอยู่ระหว่าง 75-150 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต

ไฮโดรเจนให้สูงขึ้นแต่เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมสูงมากเกินไป (300 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่งผลให้ผลผลิตไฮโดรเจนน้อยลงและที่ความเข้มข้นของแคลเซียมเท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด (807 มิลลิโมลไฮโดรเจนต่อลิตรต่อวัน)



ภาพที่ 18 ความเข้มข้นของแคลเซียมที่มีผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

#### 4.3 ผลของความเข้มข้นแมกนีเซียมที่มีต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

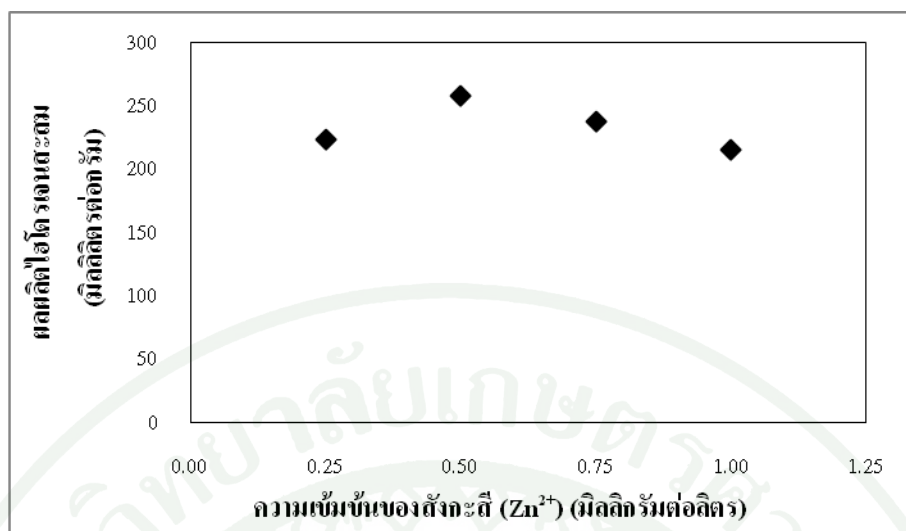
แมกนีเซียมเป็นธาตุตัวหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์โคแฟกเตอร์ กระบวนการขนส่งและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส (Lin and Lay, 2005) และยังเป็นที่ต้องการของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตเช่นเดียวกันกับแคลเซียม ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ศึกษาในการทดลองนี้มี 4 ระดับ ได้แก่ 50 100 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นแมกนีเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 275.77 มิลลิลิตรต่อกรัมเชื้อ (ดังภาพที่ 19) ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Lin and Lay (2005) เมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศเท่ากับ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 3.52 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ถ้าหากเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมสูงหรือต่ำกว่านี้จะส่งผลให้ผลผลิตไฮโดรเจนลดลง เนื่องจากแมกนีเซียมไม่ได้เป็นเพียงโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์ต่างๆ เท่านั้นแต่ยังเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย หากปริมาณแมกนีเซียมมีไม่เพียงพอก็อาจมีผลต่อกระบวนการไกลโคไลซิสและความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ (Wang *et al.*, 2007)



ภาพที่ 19 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่มีผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนอะตอม

#### 4.4 ผลของความเข้มข้นสังกะสีที่มีต่อผลผลิตไฮโดรเจนอะตอม

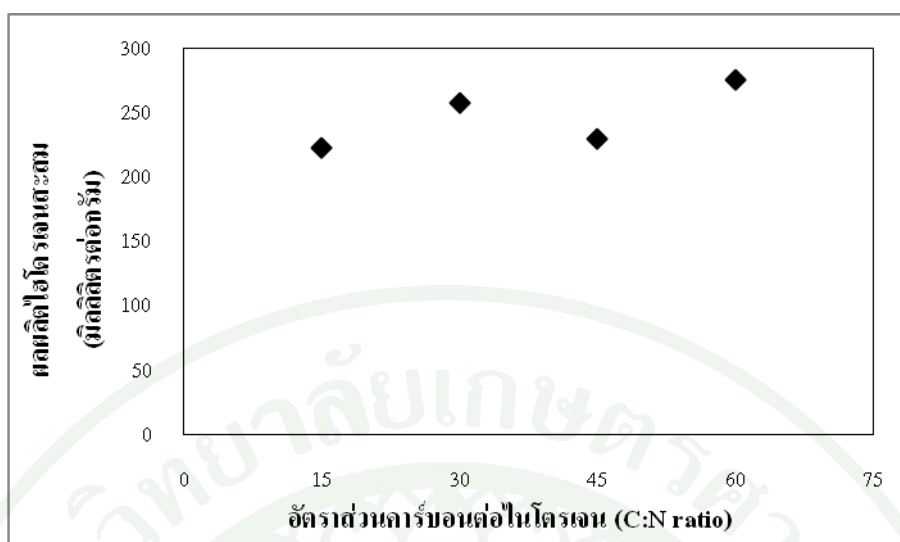
สังกะสีถือเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญสำหรับการผลิตไฮโดรเจนโดยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกซิเจน จากความเข้มข้นของสังกะสีทั้ง 4 ระดับ 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งชี้ให้เห็นว่าผลผลิตไฮโดรเจนอะตอมสูงสุดเท่ากับ 275.77 มิลลิลิตรต่อกรัม ซึ่งเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของสังกะสีเท่ากับ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดังภาพที่ 20) เนื่องจากว่าหากความเข้มข้นของสังกะสีมีมากจะยับยั้งกระบวนการสร้างกรด (acidogenesis) (Yu and Fang, 2001) ส่งผลกระทบต่อการผลิตไฮโดรเจน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lin and Lay (2005) พบว่าไฮโดรเจนมีมากที่สุด 3.43 โมลไฮโดรเจนต่อโมลซูโครส เมื่อความเข้มข้นของสังกะสีเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 20 ความเข้มข้นของสังกะสีที่มีผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

#### 4.5 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

การผลิตไฮโดรเจนมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง รวมถึงธาตุอาหารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เป็นต้น) หรือธาตุอาหารรอง (เหล็ก แคลเซียม สังกะสี และแมกนีเซียม เป็นต้น) ในบรรดาธาตุอาหารดังกล่าวไนโตรเจนเป็นสิ่งที่ต้องการมากที่สุดสำหรับจุลินทรีย์ และกระบวนการเมแทบอลิซึมอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงได้หากได้รับธาตุดังกล่าวมากหรือน้อยเกินไป (Peixoto, 2008) เนื่องจากไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีนกรดนิวคลีอิกและเอนไซม์ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตไฮโดรเจน ถ้าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ในระดับที่เหมาะสมจะมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจน (Argun *et al.*, 2008; Chuang *et al.*, 2012) สำหรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ศึกษามีทั้งหมด 4 ระดับ (15 30 45 และ 60) ปรากฏว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60 มีแนวโน้มให้ผลผลิตไฮโดรเจนสะสมสูงสุด คือ 275.77 มิลลิกรัมต่อกรัมชี้เลี้ยง (ดังภาพที่ 21) เพราะอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำจะมีส่วนยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนสำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจนค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10-90 ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 30 (Kayhanian and Tchobanglous, 1992; Yen and Brune, 2007) ทั้งนี้ความแตกต่างของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่แตกต่างกันจะขึ้นอยู่กับประเภทของวัตถุดิบและชนิดของจุลินทรีย์ (Sreela-or *et al.*, 2011)



ภาพที่ 21 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีผลต่อผลผลิตไฮโดรเจนสะสม

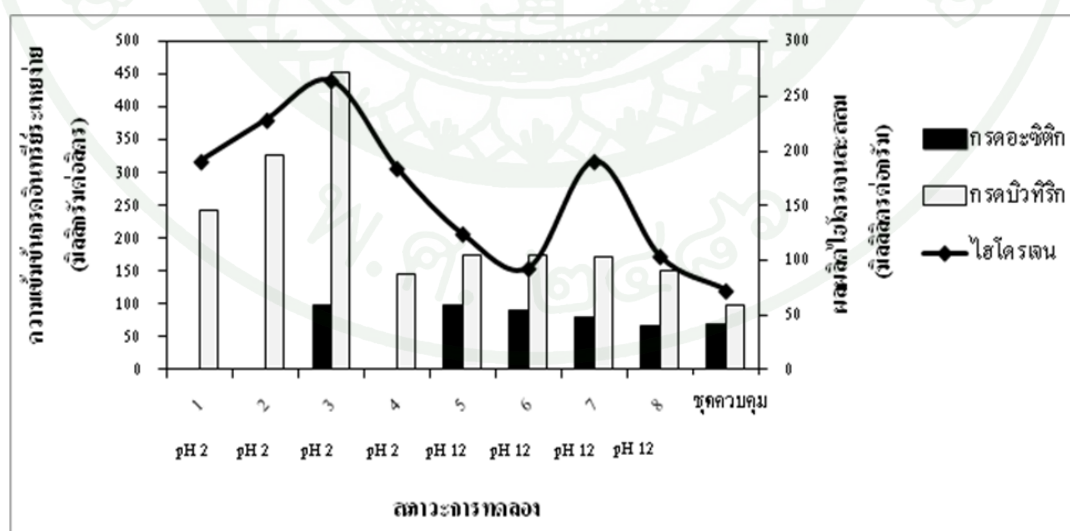
ผลการศึกษาสภาวะการหมักก็ขึ้นอยู่กับแผนการทดลองทางจุลชีววิทยาที่สามารถสรุปปัจจัยที่เหมาะสมได้ดังนี้ ความเข้มข้นของเหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 150 100 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 60 ตามลำดับ

##### 5. ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายจากระบวนการหมักก็ขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่าน การปรับสภาพในสภาวะต่างๆ

กระบวนการสร้างกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเกิดจากการหมักกลูโคสด้วยจุลินทรีย์แบบไม่ใช้ออกาศ โดยจุลินทรีย์จะใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร เมื่อกลูโคสได้รับพลังงาน ATP จะถูกเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) และจะถูก G3P dehydrogenase ย่อยเพื่อผลิต NADH และไพรูเวตถูกออกซิไดซ์โดย pyruvate: Fd oxidoreductase (PFOR) เปลี่ยนเป็น acetyl-CoA ทำหน้าที่ขนถ่ายอิเล็กตรอนเพื่อสร้างเฟอร์รีดอกซิน (Fd) และ acetyl-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Kraemer and Bagley, 2007) จำนวนคาร์บอนไม่เกิน 5 อะตอม เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก เป็นต้น (Yuan *et al.*, 2011; กรมควบคุมมลพิษ, 2546)

การศึกษการเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายใช้ตัวอย่างหลังจากการหมักก็ขึ้นอยู่กับแผนการทดลองที่แสดงในตารางที่ 12 ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายตอนเริ่มต้นการ

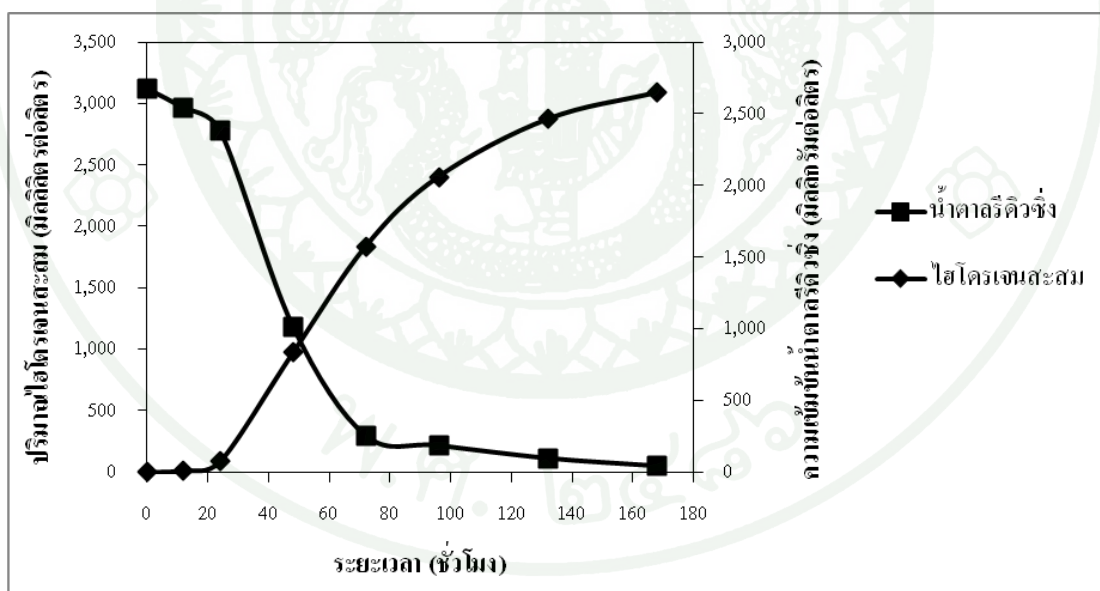
ทดลอง พบว่ามีเพียงกรดอะซิดิกเพียงชนิดเดียวที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 168 ชนิดของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่เกิดขึ้นมี 2 ชนิด คือ กรดอะซิดิกและกรดบิวทิริก สำหรับกรดโพไฟฟอนิกไม่มีการตรวจพบ ในสภาวะการทดลองที่ 3 (การปรับสภาพกากตะกอนที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง) เกิดความเข้มข้นของกรดอะซิดิกและกรดบิวทิริกเท่ากับ 99.05 และ 452.58 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นสภาวะการทดลองที่ทำให้ความเข้มข้นของกรดอะซิดิกและกรดบิวทิริกรวมกันมากที่สุดสอดคล้องกับผลผลิตไฮโดรเจนสะสมที่เกิดขึ้นเท่ากับ 264.68 มิลลิลิตรต่อกรัมชี้เลี้ยง ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดเช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการทดลองอื่น (ภาพที่ 22) สำหรับการเกิดกรดอะซิดิกและกรดบิวทิริกมากนั้นส่งผลดีต่อการเกิดไฮโดรเจน เนื่องจากการหมักกลูโคส 1 โมล เมื่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นกรดอะซิดิกและกรดบิวทิริกส่งผลให้ได้ไฮโดรเจน 4 โมล และ 2 โมล ตามลำดับ (Guo *et al.*, 2008; Ruggeri *et al.*, 2009) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wijekoon *et al.* (2011) พบว่ากรดอะซิดิกและกรดบิวทิริกเป็นกรดสองตัวในกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่เด่นที่สุดที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบไร้อากาศภายใต้สภาวะเทอร์โมฟิลิก สำหรับงานวิจัยของ Komemoto *et al.* (2009) พบว่ากรดอะซิดิกนั้นถูกผลิตขึ้นตั้งแต่เริ่มต้นการทดลองเป็นต้นไป ในทางตรงกันข้ามกรดบิวทิริกจะเกิดขึ้นช้ากว่า ในขณะที่กรดโพไฟฟอนิกมีปริมาณน้อยมากใกล้เคียงกับการศึกษานี้อาจมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการปรับสภาพชี้เลี้ยงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักจึงมีความทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้มากกว่าสภาวะที่เป็นด่าง



ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างกรดอินทรีย์ระเหยง่ายในสารละลายหลังจากการหมักชี้เลี้ยงที่ปรับสภาพกากตะกอน (ชั่วโมงที่ 168) กับผลผลิตไฮโดรเจนสะสมตามแผนการทดลองทางจุลชีวะ

## 6. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนสะสมและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์

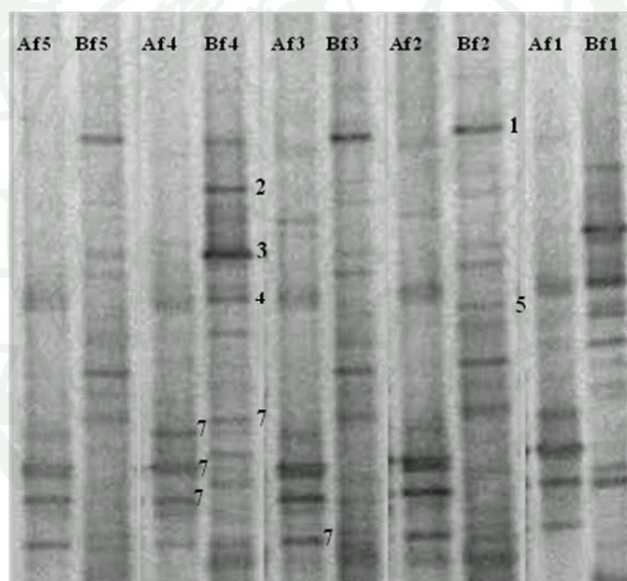
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ใช้ตัวอย่างหลังการหมักจีลื้อตามแผนการทดลองที่แสดงในตารางที่ 12 โดยเลือกสภาวะการทดลองที่ 3 (การปรับสภาพกากตะกอนที่ความเข้มข้นต่างเท่ากับ 2 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง) เป็นตัวแทนในการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนสะสมและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการหมักจีลื้อแบบไร้อากาศเกิดจากขั้นตอนการไฮโดรไลซิสจีลื้อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ภาพที่ 23) พบว่าตอนเริ่มต้นการทดลองน้ำตาลรีดิวซ์มีความเข้มข้นมาก เมื่อเวลาผ่านไปน้ำตาลรีดิวซ์มีจำนวนน้อยลง (ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่ 24-72) ในทางตรงกันข้ามปริมาณไฮโดรเจนมีเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่ 24-96 และปริมาณไฮโดรเจนเกิดขึ้นช้าลงตามความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีลดลงตามลำดับ เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสไปเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ขึ้นมาในกรณีนี้คือไฮโดรเจน หากสารอาหารที่ต้องการมีลดลงปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะลดลงด้วย



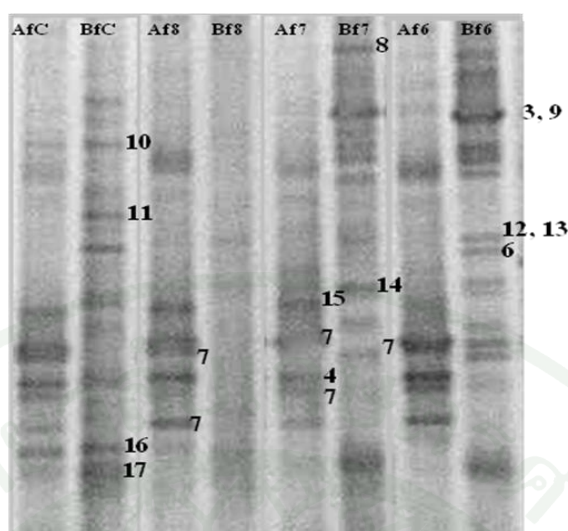
ภาพที่ 23 ความสัมพันธ์ปริมาณไฮโดรเจนสะสมและความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักจีลื้อที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด-ด่าง ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

## 7. การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อนและหลังกระบวนการหมักด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และเทคนิคดีจีจีจี (DGGE)

การสกัดดีเอ็นเอจากกากตะกอนก่อนและหลังการปรับสภาพในสภาวะต่างกันและกากตะกอนหลังการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจน ซึ่งสัญลักษณ์กำกับบนแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างกากตะกอนที่ศึกษาแสดงในตารางที่ 14 โดยขั้นแรกใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน 16s RNA จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ คือ 357f และ 518r (Muyzer *et al.*, 1993) และเมื่อได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้วนำไปวิเคราะห์รูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอบนเจลอะครีลาไมด์โดยใช้เทคนิคดีจีจีจี (ดังภาพที่ 24 และภาพที่ 25)



**ภาพที่ 24** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีจีจีจีของกากตะกอนก่อนและหลังการหมักที่สภาวะการทดลองที่ 1-5 ของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายกรดและต่างตามแผนการทดลองทางจุลชี (AF; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอก่อนการหมัก BF; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลังการหมัก)



**ภาพที่ 25** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีจีจีของกากตะกอนก่อนและหลังการหมักที่สภาวะการทดลองที่ 6-8 และชุดควบคุมของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายกรดและด่างตามแผนการทดลองทางภูมิ (AF; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอก่อนการหมัก BF; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลังการหมัก)

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้มาจากการซีควเन्ซ์ในตารางที่ 15 พบว่า ตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์จากกากตะกอนก่อนกระบวนการหมัก (G1\_1\_2 G1\_3\_4 G1\_5\_6 G1\_7\_8 G1\_9 G1\_10 G1\_15 G1\_17 G1\_18 G1\_19 G1\_20 G2\_5 G2\_6-1 G2\_6-2 G2\_8 G2\_12 G2\_13-1 G2\_13-2 G2\_14 G2\_17 G2\_18 G2\_20 G2\_21 G2\_22 G2\_23 G2\_24 และ G2\_25) มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ทั้งหมด 9 จินัส ได้แก่ *Uncultured Clostridium* *Bacterium* *Bacillus* *Lactococcus* *Thermoanaerobacterium* *Verrucomicrobia* *Bacteroidetes* และ *Acinetobacter* (ดังภาพที่ 26) สำหรับกากตะกอนหลังกระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจน (G1\_5\_6 G1\_7\_8 G1\_15 G1\_17 G1\_18 G1\_19 G1\_20 G2\_8 G2\_12 G2\_16 G2\_18 G2\_20 G2\_21 G2\_22 G2\_23 G2\_24 G2\_25 และ G2\_26) (ดังภาพที่ 27) พบตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์มีทั้งหมด 5 จินัส (ตารางที่ 16) ได้แก่ *Thermoanaerobacterium* *Bacillus* *Acinetobacter* *Clostridium* และ *Uncultured* ซึ่งกากตะกอนทั้งก่อนและหลังกระบวนการหมักมีเชื้อจุลินทรีย์ในจินัส *Thermoanaerobacterium* มากที่สุด สำหรับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่พบก่อนการปรับสภาพแต่พบหลังการปรับสภาพ คือ G1\_1\_2 และ G1\_3\_4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ G1\_9 ที่พบเพียงหลังการปรับสภาพ และ G2\_16 ที่พบแต่หลังการหมัก เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าวปรากฏขึ้นจางมากจึงไม่ถูกเลือกมาตรวจสอบ

**ตารางที่ 14** สัญลักษณ์กำกับบนแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างกาต้มน้ำที่ศึกษา

| สัญลักษณ์กำกับบนแถบดีเอ็นเอ | สภาวะการทดลอง |
|-----------------------------|---------------|
| AF1 และ BF1                 | 3             |
| AF2 และ BF2                 | 5             |
| AF3 และ BF3                 | 6             |
| AF4 และ BF4                 | 2             |
| AF5 และ BF5                 | 8             |
| AF6 และ BF6                 | 4             |
| AF7 และ BF7                 | 1             |
| AF8 และ BF8                 | 7             |
| AFC และ BFC                 | ชุดควบคุม     |

**หมายเหตุ** สภาวะการทดลองที่ถูกอ้างอิงในตารางที่ 14 คือ สภาวะการทดลองการปรับสภาพกาต้มน้ำด้วยสารละลายกรดและด่างร่วมกับความร้อน (แสดงในตารางที่ 13)

ตารางที่ 15 รหัสลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกากตะกอนก่อนและหลังการปรับสภาพ และหลังการหมัก

| ลำดับ | รหัสลายพิมพ์ดีเอ็นเอ                    |                                                                               |                                                                               |                              |
|-------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
|       | ก่อนการปรับสภาพ                         | หลังการปรับสภาพ                                                               | หลังการหมัก                                                                   | กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์         |
| 1     | -                                       | G1_1_2                                                                        | -                                                                             | <i>Verrucomicrobia</i>       |
| 2     | -                                       | G1_3_4                                                                        | -                                                                             | <i>Bacterium</i>             |
| 3     | G2_6_2                                  | G1_5_6, G2_6_2                                                                | G1_5_6                                                                        | <i>Acinetobacter</i>         |
| 4     | G2_22                                   | G1_7_8, G2_22                                                                 | G1_7_8, G2_22                                                                 | <i>Thermoanaerobacterium</i> |
| 5     | -                                       | G1_9                                                                          | -                                                                             | <i>Bacillus</i>              |
| 6     | G2_14                                   | G1_10, G2_14                                                                  |                                                                               | <i>Lactococcus</i>           |
| 7     | G2_18, G2_20,<br>G2_21, G2_23,<br>G2_24 | G1_15, G1_17,<br>G1_18, G1_19, G1_20,<br>G2_18, G2_21, G2_20,<br>G2_23, G2_24 | G1_15, G1_17,<br>G1_18, G1_19, G1_20,<br>G2_18, G2_21, G2_20,<br>G2_23, G2_24 | <i>Thermoanaerobacterium</i> |
| 8     | G2_5                                    | G2_5                                                                          | -                                                                             | <i>Lactococcus</i>           |
| 9     | G2_6_1                                  | G2_6_1                                                                        | -                                                                             | <i>Acinetobacter</i>         |
| 10    | G2_8                                    | G2_8                                                                          | G2_8                                                                          | Uncultured                   |
| 11    | G2_12                                   | G2_12                                                                         | G2_12                                                                         | <i>Bacillus</i>              |
| 12    | G2_13_1                                 | G2_13_1                                                                       | -                                                                             | <i>Bacteroidetes</i>         |
| 13    | G2_13_2                                 | G2_13_2                                                                       | -                                                                             | Uncultured                   |
| 14    | -                                       | -                                                                             | G2_16                                                                         | <i>Bacillus</i>              |
| 15    | G2_17                                   | G2_17                                                                         | -                                                                             | <i>Clostridium</i>           |
| 16    | G2_25                                   | G2_25                                                                         | G2_25                                                                         | <i>Clostridium</i>           |
| 17    | G2_26                                   | G2_26                                                                         | G2_26                                                                         | <i>Clostridium</i>           |

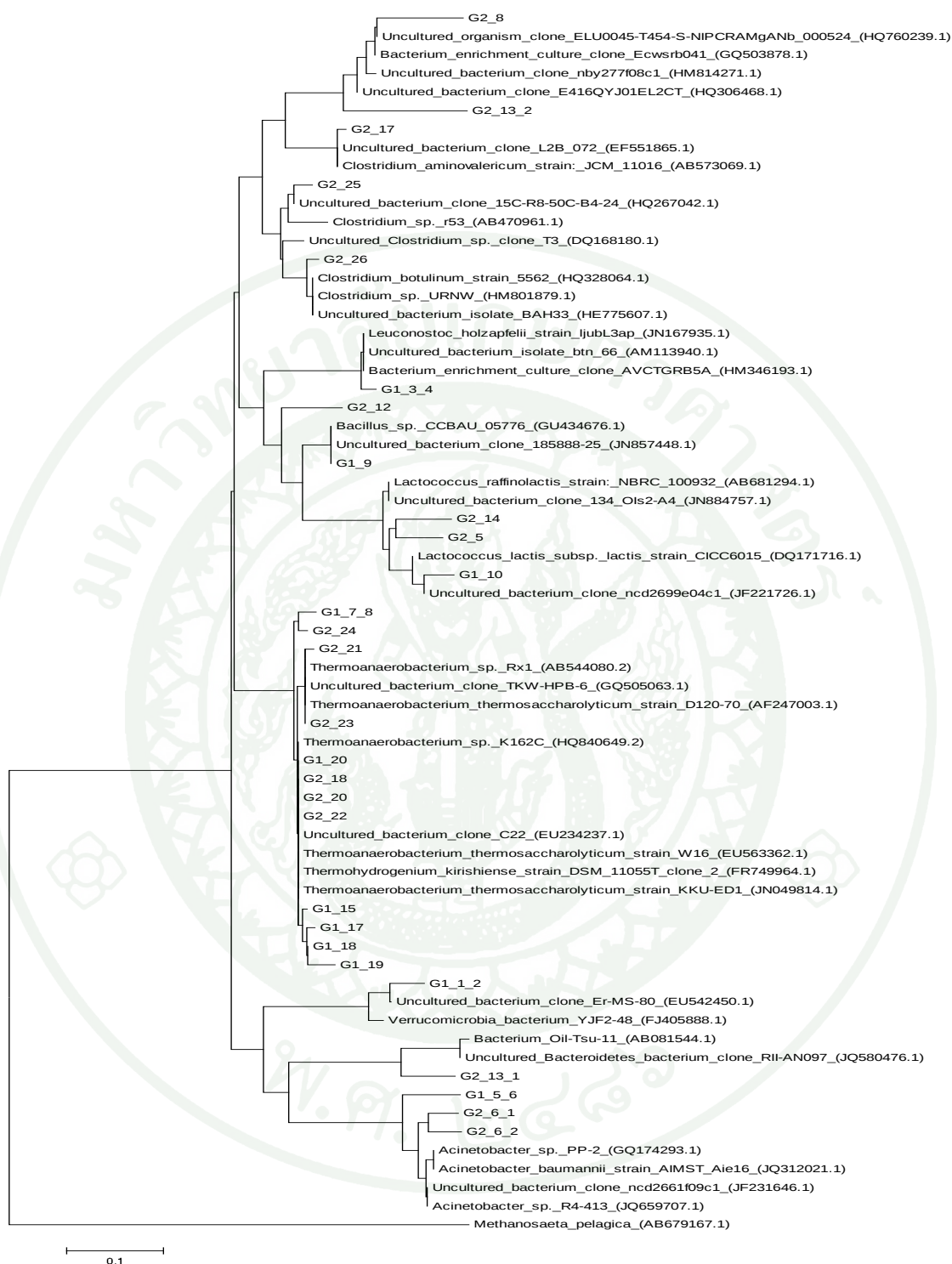
หมายเหตุ รหัสลายพิมพ์ดีเอ็นเอ G1\_15 G1\_17 G1\_18 G1\_19 G1\_20 G2\_18 G2\_21 G2\_20

G2\_23 G2\_24 เป็นเชื้อกลุ่มเดียวกัน

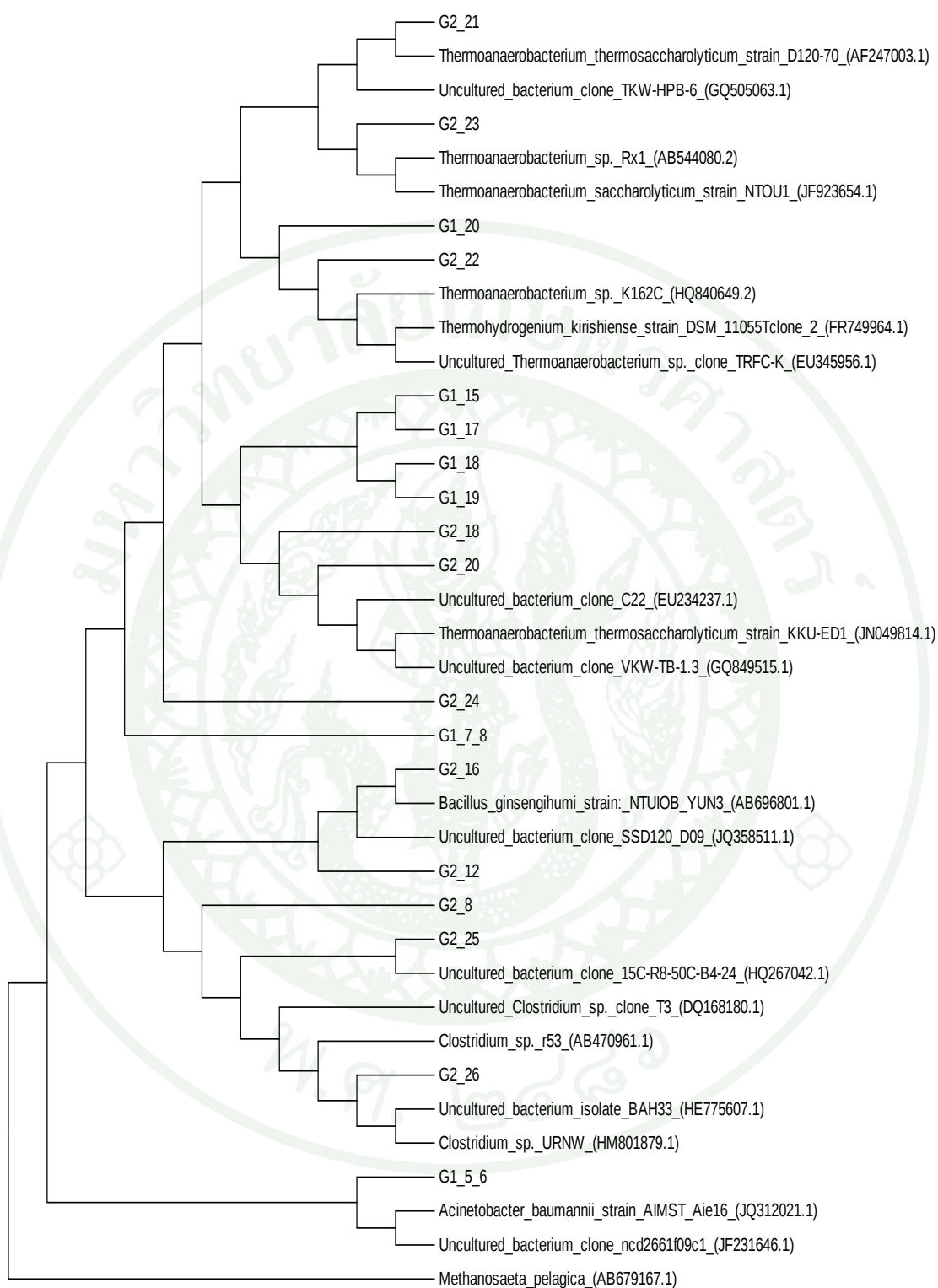
รหัสลายพิมพ์ดีเอ็นเอ G1\_5\_6 G2\_6\_2 เป็นเชื้อกลุ่มเดียวกัน

รหัสลายพิมพ์ดีเอ็นเอ G1\_7\_8 G2\_22 เป็นเชื้อกลุ่มเดียวกัน

รหัสลายพิมพ์ดีเอ็นเอ G1\_10 G2\_14 เป็นเชื้อกลุ่มเดียวกัน



ภาพที่ 26 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ก่อนกระบวนการหมัก โดย  
การวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbour-Joining



ภาพที่ 27 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้หลังกระบวนการหมัก โดย  
การวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbour-Joining

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบจีโนมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบก่อนและหลังการปรับสภาพ และหลังกระบวนการหมัก

| ชื่อสกุล                     | ก่อนการปรับสภาพ | หลังการปรับสภาพ | หลังกระบวนการหมัก |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Uncultured                   | ✓               | ✓               | ✓                 |
| <i>Clostridium</i>           | ✓               | ✓               | ✓                 |
| <i>Bacterium</i>             | ✓               | ✓               | -                 |
| <i>Bacillus</i>              | ✓               | ✓               | ✓                 |
| <i>Lactococcus</i>           | ✓               | ✓               | -                 |
| <i>Thermoanaerobacterium</i> | ✓               | ✓               | ✓                 |
| <i>Verrucomicrobia</i>       | -               | ✓               | -                 |
| <i>Bacteroidetes</i>         | ✓               | ✓               | -                 |
| <i>Acinetobacter</i>         | ✓               | ✓               | ✓                 |

เมื่อเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อจุลินทรีย์ก่อนการหมักมีทั้งหมด 9 จีโนม มีความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบหลังการหมักมีทั้งหมด 5 จีโนม (ดังตารางที่ 17-18) การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อนกระบวนการหมักเชื้อจุลินทรีย์ในจีโนม

*Thermoanaerobacterium* เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุด รองลงมาคือเชื้อจุลินทรีย์ในจีโนม *Clostridium* สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดหลังกระบวนการหมัก ได้แก่ จีโนม *Thermoanaerobacterium* เช่นเดียวกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกตรวจพบก่อนกระบวนการหมักและตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus ginsengihumi* strain: NTUIOB YUN3 (G2\_16) เป็นสายพันธุ์ที่เกิดขึ้นหลังจากกระบวนการหมัก สังเกตได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์หลังกระบวนการหมักมีจำนวนจีโนมลดลงอาจเป็นเพราะสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ที่คงอยู่หรือมีชีวิตอยู่ได้จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถทนหรือชอบสภาวะแวดล้อมในการหมัก ส่วนจุลินทรีย์กลุ่มที่ทนไม่ได้จะค่อยๆ ลดลงในที่สุดและเหตุที่จุลินทรีย์ในจีโนม *Thermoanaerobacterium* มีอยู่มากที่สุด เนื่องจากจุลินทรีย์ในจีโนม

*Thermoannrobacteriales* มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนในระบบการหมักแบบไม่ใช้แสงภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง (Basile *et al.*, 2010) สภาวะเหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ที่อุณหภูมิ 55-70 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.2-7.8 (Zhang *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะในการทดลองในงานวิจัยนี้ (อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ

5.5) และใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Yossan *et al.* (2012) พบว่าที่สภาวะการหมักที่ 55 องศาเซลเซียส ให้ไฮโดรเจนสูงสุด แต่บางครั้งกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะหรือองค์ประกอบเหมือนกันกลับให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกัน อาจบ่งชี้ได้ว่ากระบวนการผลิตนั้นไม่ได้ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุลินทรีย์ แต่เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงวิธีการเพาะเลี้ยงที่ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อม (Hawkes *et al.*, 2002) สำหรับจุลินทรีย์ในจีโนส *Clostridium* ถือเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่มีความโดดเด่นในการผลิตไฮโดรเจน (Wu *et al.*, 2006; Levin *et al.*, 2004) และสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็น กรดบิวทิริก กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน (Andreesen *et al.*, 1989) งานวิจัยของ Lin *et al.* (2007) ทดลองโดยใช้จุลินทรีย์ในจีโนส *Clostridium* ทั้ง 4 สายพันธุ์ (*C. acetobutylicum* M121 *C. butyricum* ATCC19398 *C. tyrobutyricum* FYa102 และ *C. beijerinckii* L9) พบว่าจากการหมักน้ำตาลกลูโคสสามารถผลิตกรดบิวทิริกได้เป็นส่วนใหญ่ (0.37-0.67 มิลลิโมลต่อมิลลิโมลกลูโคส) กรดอะซิติก (0.34-0.42 มิลลิโมลต่อมิลลิโมลกลูโคส) และ *C. beijerinckii* L9 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด 2.81 มิลลิโมลต่อมิลลิโมลกลูโคส สายพันธุ์จุลินทรีย์จำนวนมากที่อยู่จีโนส *Enterobacter Clostridium* และ *Bacillus* มักจะมีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน (Nandi and Sengupta, 1998) กลุ่มจุลินทรีย์ที่โดดเด่นการปรับสภาพด้วยกรด ได้แก่ จุลินทรีย์ในจีโนส *Clostridium* sp. และ *Bacillus* sp. แต่อย่างไรก็ตามหลังจากการปรับสภาพด้วยความร้อนจุลินทรีย์ที่โดดเด่น ได้แก่ จีโนส *Clostridium* sp. และ *Enterococcus* sp. ในทางตรงกันข้ามกลุ่มจุลินทรีย์ที่โดดเด่นหลังจากการถูกปรับสภาพด้วยด่างหรือการแช่แข็ง ได้แก่ จีโนส *Clostridium* sp. และ *Lactobacillus* sp. สังเกตได้ว่าจุลินทรีย์ในจีโนส *Clostridium* จะถูกพบทุกสภาวะการปรับสภาพ เช่น ความร้อน กรด ด่าง การแช่แข็งและการทำให้ละลาย (Liu *et al.*, 2009) ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ในจีโนส *Acinetobacter* ในงานวิจัยหนึ่งได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงงานเส้นทำขนมจีน 4 แห่งในจังหวัดอุบลราชธานี พบว่าเชื้อหนึ่งในจำนวน 65 ไอโซเลต มี 12 ไอโซเลตที่สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ซึ่งเชื้อ BKC3 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ถึง 97% (สังวาลย์ และสุพัชรี, 2548) สำหรับเชื้อ *Lactococcus lactis* เป็นกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกสูงมาก (ทองยศ, 2527) เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นจีโนสหลักในการผลิตกรดแลคติก คือ *Lactobacillus* รองลงมา คือ *Leuconostoc* *Lactococcus* เป็นต้น (สุพรรณนิการ์ และคณะ, 2555) และ *Lactococcus* เป็นหนึ่งในจีโนสที่สามารถสลายน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกเท่านั้น (Axelsson, 1993) เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มของ *Verrucomicrobia* จัดเป็นชนิดที่มีการบริโภคมีเทนเป็นอาหาร (Methanotrophic bacteria) แล้วยังมีความสามารถในการทนความร้อนได้ดีที่สุด (hardest “methanotrophic” bacterium) (Dunfiele *et al.*, 2007) สำหรับ *Bacteroides* spp. ถือเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพอลิแซคคาไรด์ไปเป็นน้ำตาล โปรตีน

ถูกสลายเป็นกรดอะมิโนและไขมันถูกสลายเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล จากนั้นน้ำตาลและกรดอะมิโนจะถูกสลายเป็นอะซิเตตและโพรพิเนตด้วยจุลินทรีย์หมักกรด (คู่มือสารชีวมวลเอเชีย, 2551) งานวิจัยของ Yasin *et al.* (2011) ตรวจพบไฟลัม *Bacteroidetes* ในตัวอย่างหลังจากที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนแต่ไม่พบระหว่างกระบวนการหมัก สอดคล้องกับการศึกษาที่พบเชื้อจุลินทรีย์ในจินัส *Bacteroidetes* หลังจากการปรับสภาพแต่ไม่พบในกระบวนการหมัก

จากแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกของกากตะกอนก่อนกระบวนการหมักและหลังกระบวนการหมัก ได้ทำการแยกออกเป็นตารางตามกลุ่มจุลินทรีย์ที่อยู่ในจินัสเดียวกัน พร้อมทั้งแสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนรวมถึง accession number ที่ได้จากฐานข้อมูลของ NCBI โดยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนจะมีตั้งแต่ 95-99% สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในจินัส *Thermoanaerobacterium* ส่วนใหญ่ถือว่ามีความเหมือนสูง (97-99%) (ดังตารางที่ 17-18) และเป็นจินัสที่พบมากที่สุด

ตารางที่ 17 กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์และค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของภาค  
ตะกอนก่อนกระบวนการหมักกับข้อมูลใน NCBI

| จีแนส              | ตัวอย่าง | เชื้อจุลินทรีย์                                                   | ความ<br>เหมือน | accession<br>number |
|--------------------|----------|-------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------|
| Uncultured         | G2_8     | Uncultured organism clone ELU0045 T454-s-<br>NIPCRAMgANb 000524   | 92             | HQ760239.1          |
|                    |          | Uncultured bacterium clone nby277f08c1                            | 92             | HM814271.1          |
|                    |          | Bacterium enrichment culture clone Ecwsrb040                      | 92             | GQ503877.1          |
|                    | G2_13-2  | Uncultured bacterium clone E416QYJ01EL2CT                         | 91             | HQ306468.1          |
| <i>Clostridium</i> | G2_17    | Uncultured bacterium clone L2B 072                                | 97             | EF551865.1          |
|                    |          | <i>Clostridium aminovalericum</i> strain JCM 11016                | 96             | AB573069.1          |
|                    | G2_25    | Uncultured bacterium clone 15C-R8-50C-B4-24                       | 97             | HQ267042.1          |
|                    |          | <i>Clostridium</i> sp. R53                                        | 92             | AB470961.1          |
|                    | G1_26    | <i>Clostridium botulinum</i> strain 5562                          | 95             | HQ328064.1          |
|                    |          | <i>Clostridium</i> sp. URNW                                       | 95             | HM801879.1          |
| <i>Bacterium</i>   |          | Uncultured bacterium isolate BAH33                                | 95             | HE775607.1          |
|                    | G1_3,4   | Bacterium enrichment culture clone<br>AVCTGRB5A                   | 97             | HM346193.1          |
|                    |          | Uncultured bacterium isolate btn 66                               | 97             | AM113940.1          |
|                    |          | <i>Leuconostoc holzapfelii</i> strain ljubL3ap                    | 97             | JN167935.1          |
| <i>Bacillus</i>    | G2_12    | <i>Bacillus subtilis</i> strain rif200879                         | 88             | FJ527657.1          |
|                    | G1_9     | Uncultured bacterium clone 185888-25                              | 98             | JN857448.1          |
|                    |          | <i>Bacillus</i> sp. CCBAU 05776                                   | 97             | GU434676.1          |
| <i>Lactococcus</i> | G2_5     | Uncultured bacterium clone 134 Ols2-A4                            | 93             | JN884757.1          |
|                    |          | <i>Lactococcus raffinolactis</i> strain NBRC 100932               | 93             | AB681294.1          |
|                    | G2_14    | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> strain<br>CICC6015 | 95             | DQ171716.1          |
|                    | G1_10    | Uncultured bacterium clone ncd2699e04c1                           | 96             | JF221726.1          |

ตารางที่ 17 (ต่อ)

| จีโนม                        | ตัวอย่าง | เชื้อจุลินทรีย์                                                   | ความเหมือน | Accession number |
|------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------|------------|------------------|
| <i>Thermoanaerobacterium</i> | G1_7,8   | Uncultured bacterium clone C22                                    | 95%        | EU234237.1       |
|                              | G2_24    | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. K162C                            | 95%        | HQ840649.2       |
|                              |          | <i>Thermoanaerobacterium Kirishiense</i> strain DSM 11055T        | 95%        | FR749964.1       |
|                              | G2_21    | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain D120-70 | 97%        | AF247003.1       |
|                              |          | Uncultured bacterium clone TKW-HPB-6                              | 97%        | GQ505063.1       |
|                              | G2_23    | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. Rx1                              | 98%        | AB544080.2       |
|                              | G1_20    | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. K162C                            | 99%        | HQ840649.2       |
|                              |          | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i> strain DSM 11055T            | 98%        | FR749964.1       |
|                              | G2_18    | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain KKU-ED1 | 97%        | JN049814.1       |
|                              | G2_20    | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain KKU-ED1 | 99%        | JN049814.1       |
|                              |          | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain W16     | 99%        | EU563362.1       |
|                              | G2_22    | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i> strain DSM 11055T            | 98%        | FR749964.1       |
|                              |          | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. Rx1                              | 98%        | AB544080.2       |

ตารางที่ 17 (ต่อ)

| จีโนส                        | ตัวอย่าง | เชื้อจุลินทรีย์                                                   | ความเหมือน | Accession number |
|------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------|------------|------------------|
| <i>Thermoanaerobacterium</i> | G1_15    | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain KKU-ED1 | 98%        | JN049814.1       |
|                              |          | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i> strain DSM 11055T            | 98%        | FR749964.1       |
|                              | G1_17    | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain KKU-ED1 | 97%        | JN049814.1       |
|                              |          | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i> strain DSM 11055T            | 97%        | FR749964.1       |
|                              | G1_18    | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i> strain DSM 11055T            | 98%        | FR749964.1       |
|                              |          | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. Rx1                              | 98%        | AB544080.2       |
|                              | G1_19    | Uncultured bacterium clone C22                                    | 96%        | EU234237.1       |
|                              |          | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i> strain DSM 11055T            | 96%        | FR749964.1       |
|                              | G1_1,2   | Uncultured bacterium clone Er-MS-80                               | 94%        | EU542450.1       |
|                              |          | <i>Verrucomicrobia bacterium</i> YJF2-48                          | 90%        | FJ405888.1       |
| <i>Bacteroidetes</i>         | G2_13-1  | Bacterium Oil-Tsu-11                                              | 91%        | AB081544.1       |
|                              |          | Uncultured Bacteroidetes bacterium clone RII-AN097                | 88%        | JQ580476.1       |
| <i>Acinetobacter</i>         | G1_5,6   | Uncultured bacterium clone ncd2661f09c1                           | 92%        | JF231646.1       |
|                              |          | <i>Acinetobacter baumannii</i> strain AIMST Aie16                 | 92%        | JQ312021.1       |
|                              | G2_6-1   | <i>Acinetobacter</i> sp. R4-413                                   | 96%        | JQ659707.1       |
|                              | G2_6-2   | <i>Acinetobacter baumannii</i> strain AIMST Aie16                 | 93%        | JQ312021.1       |
|                              |          | <i>Acinetobacter</i> sp. PP-2                                     | 93%        | GQ174293.1       |
|                              |          |                                                                   |            |                  |

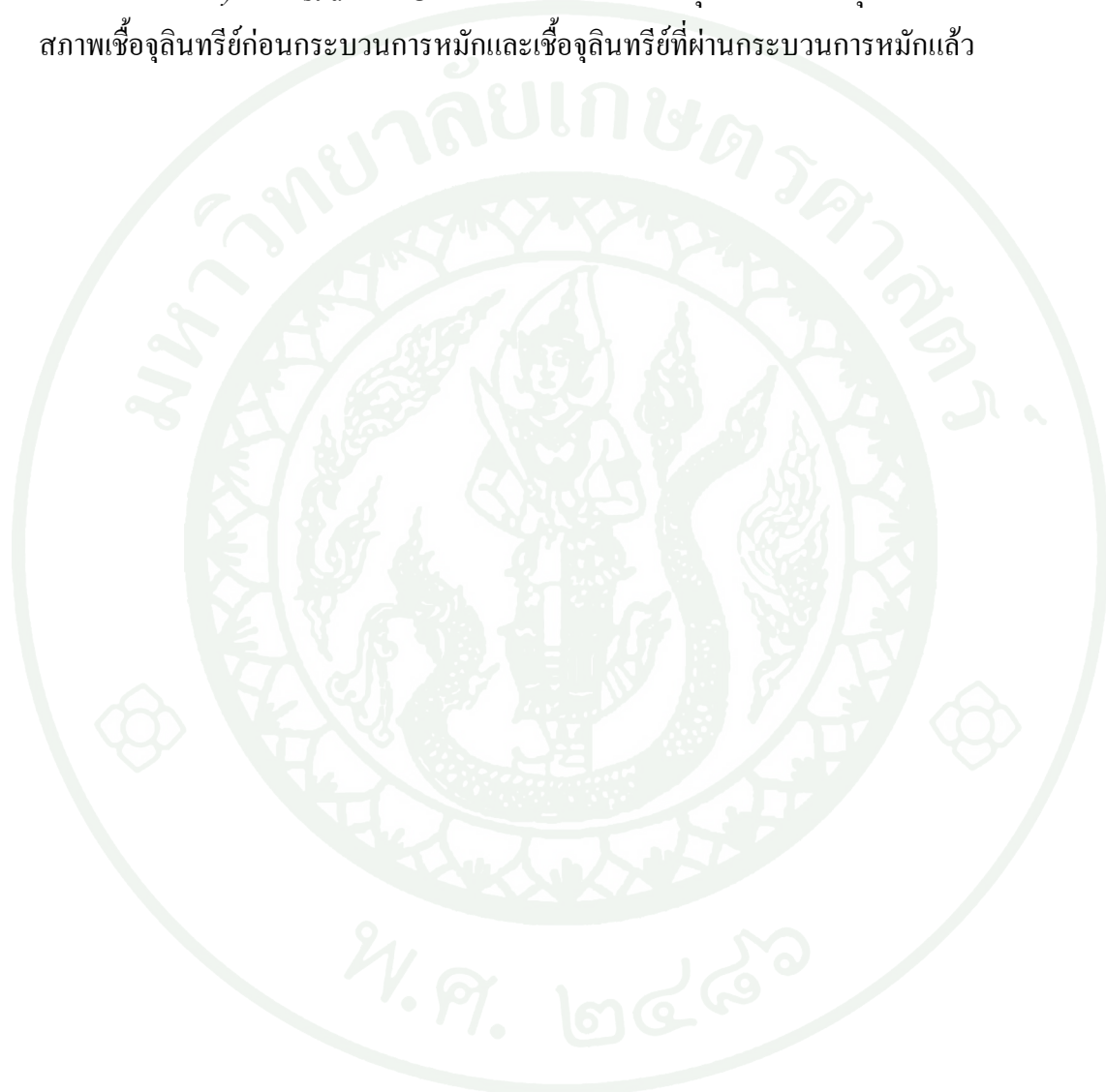
ตารางที่ 18 กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์และค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของภาค  
ตะกอนหลังกระบวนการหมักกับข้อมูลใน NCBI

| จีโนส                 | ตัวอย่าง | เชื้อจุลินทรีย์                                                                | ความ<br>เหมือน | accession<br>number |
|-----------------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------------|
| Thermoanaerobacterium | G2_21    | <i>Thermoanaerobacterium</i><br><i>thermosaccharolyticum</i> strain D120-7     | 97%            | AF247003.1          |
|                       |          | Uncultured bacterium<br>clone TKW-HPB-6                                        | 97%            | GQ505063.1          |
|                       | G2_23    | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. Rx1                                           | 98%            | AB544080.2          |
|                       |          | <i>Thermoanaerobacterium</i><br><i>saccharolyticum</i> strain NTOU1            | 98%            | JF923654.1          |
|                       | G1_20    | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. K162C                                         | 99%            | HQ840649.2          |
|                       | G2_22    | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i><br>strain DMS 11055T clone 2              | 98%            | FR749964.1          |
|                       | G1_7,8   | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i><br>strain DMS 11055T clone 2              | 94%            | FR749964.1          |
|                       |          | Uncultured bacterium clone C22                                                 | 95%            | EU234237.1          |
|                       | G2_24    | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. K162C                                         | 95%            | HQ840649.2          |
|                       |          | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i><br>strain DMS 11055T clone 2              | 95%            | FR749964.1          |
|                       | G1_18    | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i><br>strain DMS 11055T clone 2              | 98%            | FR749964.1          |
|                       |          | <i>Thermoanaerobacterium</i> sp. K162C                                         | 98%            | HQ840649.2          |
|                       | G1_19    | <i>Thermohydrogenium kirishiense</i><br>strain DMS 11055T clone 2              | 96%            | FR749964.1          |
|                       |          | Uncultured bacterium clone C22                                                 | 96%            | EU234237.1          |
|                       | G2_18    | <i>Thermoanaerobacterium</i><br><i>thermosaccharolyticum</i><br>strain KCU-ED1 | 97%            | JN049814.1          |

ตารางที่ 18 (ต่อ)

| จีโนม                        | ตัวอย่าง | เชื้อจุลินทรีย์                                                   | ความเหมือน | Accession number |
|------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------|------------|------------------|
| <i>Thermoanaerobacterium</i> | G2_20    | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain KKU-ED1 | 99%        | JN049814.1       |
|                              |          | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain W16     | 99%        | EU563362.1       |
|                              | G1_15    | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain KKU-ED1 | 98%        | JN049814.1       |
|                              | G1_17    | <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> strain KKU-ED1 | 97%        | JN049814.1       |
|                              | G2_16    | <i>Bacillus ginengihumi</i> strain NTUIOB YUN3                    | 97%        | AB696801.1       |
|                              | G2_12    | Uncultured bacterium clone SSD12 D09                              | 88%        | JQ358511.1       |
| <i>Bacillus</i>              |          | <i>Bacillus subtilis</i> strain rif200879                         | 88%        | FJ527657.1       |
| <i>Acinetobacter</i>         | G1_5,6   | Uncultured bacterium clone ncd2661f09c1                           | 92%        | JF231646.1       |
|                              |          | <i>Acinetobacter baumannii</i> strain AIMST Aie16                 | 92%        | JQ312021.1       |
| Uncultured                   | G2_8     | Uncultured organism clone ELU0045-T454-S-NIPCRAMgANb 000524       | 92%        | HQ760239.1       |
|                              |          | Uncultured bacterium clone nby277f08c1                            | 92%        | HM814271.1       |
| <i>Clostridium</i>           | G2_25    | Uncultured bacterium clone 15C-R8-50C-B4-24                       | 97%        | HQ267042.1       |
|                              |          | Uncultured <i>Clostridium</i> sp. Clone T3                        | 93%        | DQ168180.1       |
|                              |          | <i>Clostridium</i> sp. R53                                        | 92%        | AB470961.1       |
|                              | G2_26    | <i>Clostridium</i> sp. URNW                                       | 95%        | HM801879.1       |
|                              |          | <i>Clostridium botulinum</i> strain 5562                          | 95%        | HQ328064.1       |

จากผลการศึกษาการพบว่ามีจุลินทรีย์หลายกลุ่มหลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนได้ แต่สำหรับการศึกษานี้กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความโดดเด่นและเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมในกระบวนการหมักที่สุดคือ จินัส *Thermoanaerobacterium* และสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ *Thermoanaerobacterium Kirishiense* strain DSM 11055T และ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain KKU-ED1 ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ที่พบทั้งในกรณีที่ปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ก่อนกระบวนการหมักและเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว



## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

การผลิตไฮโดรเจนด้วยการหมักแบบไร้อากาศ โดยใช้จีลื้อเป็นวัตถุดิบจำเป็นต้องปรับสภาพจีลื้อที่ประกอบด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายจีลื้อได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การปรับสภาพกากตะกอนเป็นสิ่งสำคัญเพื่อยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่ผลิตมีเทนและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน จากการศึกษาการปรับสภาพจีลื้อตามแผนการทดลองแฟล็กเก็ตต์-เบอร์แมน ปัจจัยที่มีนัยสำคัญ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส สภาพที่เหมาะสมตามแผนการทดลองทางจุลชี คือ การหมักจีลื้อโดยปรับสภาพจีลื้อที่ร้อยละ 10 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 0.25 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 10 บาร์ นาน 10 นาที จากนั้นไฮโดรไลซ์จีลื้อที่ร้อยละ 10 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 10 เอฟฟิยูต่อกรัม นาน 15 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไฮโดรเจน 238.63 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อ สภาพที่เหมาะสมตามแผนการทดลองตอบสนองที่พื้นผิว คือ การหมักจีลื้อโดยปรับสภาพจีลื้อที่ร้อยละ 10 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.75 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 10 บาร์ นาน 10 นาที หลังจากนั้นไฮโดรไลซ์จีลื้อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 10 เอฟฟิยูต่อกรัม นาน 15 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไฮโดรเจน 215.77 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อ และจากการทำนายด้วยแบบจำลองทางสถิติพบว่า การหมักจีลื้อโดยปรับสภาพจีลื้อที่ร้อยละ 10 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.69 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่ความดัน 9.81 บาร์ นาน 10 นาที จากนั้นไฮโดรไลซ์จีลื้อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ 11.15 เอฟฟิยูต่อกรัม นาน 15 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไฮโดรเจน 217.80 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อ นอกจากนี้ได้ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายกรดและด่างร่วมกับความร้อนด้วยแผนการทดลองทางจุลชี โดยการปรับสภาพกากตะกอนที่ค่าความเป็นกรด่างเท่ากับ 2 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ให้ผลผลิตไฮโดรเจน 264.68 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อ สำหรับการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการหมักของจีลื้อที่ปรับสภาพร่วมกับกากตะกอนที่ปรับสภาพที่เหมาะสม ดังที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อทำการหมักจีลื้อที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 60 ความเข้มข้นของเหล็ก แคลเซียม แมกนีเซียม และสังกะสี เท่ากับ 200 150 100 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 275.77 มิลลิลิตรต่อกรัมจีลื้อ โดยเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Thermoanaerobacterium* มีความโดดเด่นทั้งก่อนและหลังกระบวนการหมัก

### ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำจี้เลื่อยมาเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจน และการนำวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำมาใช้ร่วมกับสารเคมีในการปรับสภาพจี้เลื่อยสามารถลดปริมาณการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการไฮโดรไลซิสลงได้ในระดับที่น่าพอใจ หากมีการศึกษาเพิ่มเติมควรศึกษาในระดับที่ใหญ่ขึ้น เพื่อพัฒนาไปสู่การผลิตพลังงานใช้เองภายในโรงงาน



## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกียรติพงษ์ สงพรหม, นิคม แหยมสั๊ก, สาโรจน์ ศิริสันตนิยกุล, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และประมุข กระจกสุขสถิตย์. 2554. การปรับปรุงองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมันโดยการระเบิดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยต่าง. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรม เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กรมควบคุมมลพิษ. 2546. คู่มือวิชาการระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ เล่มที่ 1. กระทรวง ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ เพื่อเพิ่มมูลค่า. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรม การเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. คุณสมบัติของไฮโดรเจน. แหล่งที่มา: [http://www.dede.go.th/dede/index.php?option=com\\_content&view=article&id=123](http://www.dede.go.th/dede/index.php?option=com_content&view=article&id=123), 1 พฤษภาคม 2554.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. ยุทธศาสตร์พลังงานไฮโดรเจนและเซลล์ เชื้อเพลิง. แหล่งที่มา: <http://www.dede.go.th/dede/index.php?id=120>, 23 ธันวาคม 2554.

กระทรวงพลังงาน. คู่มือความรู้ด้านพลังงานไฮโดรเจน. แหล่งที่มา: [http://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/fuelcells/fc\\_types.html](http://www1.eere.energy.gov/hydrogenandfuelcells/fuelcells/fc_types.html), 1 พฤษภาคม 2555.

ขนิษฐา หมูโสภิญ. 2553. ไปโอไฮโดรเจน พลังงานทางเลือกใหม่. วารสารศูนย์บริการวิชาการ 18(3-4): 15-20.

จิตรพรรณ มงคล. 2551. การติดตามตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียกรดแลก-  
ติกระหว่างการหมักแหมนโดยใช้เทคนิคดีจีจีอี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จิรศักดิ์ ปานเดช. 2553. สภาพที่เหมาะสมของการผลิตไฮโดรเจนจากของเสียโรงงานไฟเบอร์บอร์ด  
โดยวิธีการตอบสนองที่พื้นผิว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิตติมา คำไชยใหญ่, สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย และสุกรินทร์ ไชยกลางเมือง. 2554. การปรับสภาพต้น  
ข้าวโพดด้วยไอน้ำ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางเพื่อผลิตเอทานอล. การ  
ประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21, อำเภอ  
หาดใหญ่, สงขลา.

ดนัย บุญเกียรติ . 2539. **สรีรวิทยาของพืช**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

คุณฤ อดุภาพ. 2550. **Carbohydrate technology**. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพ  
และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

ทองยศ อนะกะเวียง. 2527. **ผลิตภัณฑ์นม**. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,  
กรุงเทพฯ.

ธรรมบุญ ศรีทะวงศ์. 2550. **ผลิตพลังงานไฮโดรเจนโดยกระบวนการเร่งปฏิกิริยาเคมี**. วารสาร  
ส่งเสริมเทคโนโลยี 34(195): 136-143.

นริศรา อินทรจันทร์. 2552. **แก๊สไฮโดรเจน: พลังงานอนาคต (ตอนที่ 2)**. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี  
คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร, กรุงเทพฯ.

นันทิกา คล้ายชม, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และอนุสิทธิ์ ชนะพิมพ์เมธา. 2554. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จาก  
ซางข้าวฟ่างหวาน โดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด. วิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์ 24(75): 91-102.

ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์. 2553. เมตาบอลิซึมของสารอาหารเชิงบูรณาการ. ชีวเคมีทางการแพทย์.

ปารเมศ ชุตินา. 2545. การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

พิชญา ภูมิภัทร. 2549. การศึกษากระบวนการผลิตไฮโดรไลสจากกระบวนการเปิดต้นปาล์มน้ำมันด้วยไอน้ำสำหรับการหมักไซลิทอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพโรจน์ วิริยาริ. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ภูมิหทัย คูประเสริฐยิ่ง และ ประมุข ภระกฤษสถิตย์. 2554. การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอล. สารสารเทคโนโลยีชีวภาพ 1(2): 5.

มงคล งามเจริญวงศ์. 2547. การใช้แป้งดิบเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมสารชีวมวลเอเชีย. 2551. แนวทางสำหรับการผลิตและการใช้สารชีวมวล. คู่มือสารชีวมวลเอเชีย.

สังวาล แก่นโส และ สุพัชรี ศิริวงศ์. 2548. การคัดเลือกเชื้อและการศึกษาคุณลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียที่ผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานทำเส้นขนมจีน. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 31 เทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง สุตสาย ตรีวานิช วรณิ จิรภาคย์กุล และ อรอนงค์ นัยวิกุล. 2555. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์และคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อขนมจีนแป้งหมัก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อโนทัย โกคาธิกรณ. 2549. **Introduction to Real time-PCR and its applications**. เอกสารประกอบประชุมเชิงปฏิบัติการ.

อนวัตร แจ่มชัด. 2549. **สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์**. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อิสรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2550. **การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร**. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาลิขสิทธิ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Alvira, P., T.M. Ballesteros and M.J. Negro. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology** 101: 4851-4861.

Andreesen J.R., H. Bahl and G. Gottschalk. 1989. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. pp. 27-62. In N.P. Minton, D.J. Clarke, eds. **Biotechnology handbooks: Clostridia**, Plenum Press, New York.

APHA. 1992. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18<sup>th</sup> ed. American public health association, Washington, DC.

Argun, H., F. Kargi, I.K. Kapdan and R. Oztekin. 2008. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution : Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy** 33: 1813-1819.

Asghari, A., R.J. Bothast, J.B. Doran and L.O. Ingram. 1996. Ethanol production from hemicelluloses hydrolysates of agricultural residues using genetically engineered *Escherichia coli* strain KO11. **Journal of Industrial Microbiology** 16: 42-47.

ASTM. 1998. **Standard test method for ash in the analysis sample of coal and coke D3174-04**. United State of America.

ASTM. 1998. **Standard test method for moisture in the analysis sample of coal and coke D3173-03**. United State of America.

Axelsson, L. T. 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **Marcel Dekker** xxx: 1-63.

Baghchehsaraee, B., G. Nakhla, D. Karamanev, A. Margaritis and G. Reid. 2008. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy** 33: 4064-4073.

Baharuddin, A.Z., N. Kazunori, S.A. Aziz, M. Tabatabaei, A.R. Nor'Aini and M.A. Hassan. 2009. Characteristics and microbial succession on co-composting of oil palm empty fruit bunch and partially treated palm oil mill effluent. **Open Biotechnology Journal** 3: 87-95.

Bak, T., J. Nowotny, M. Rekas and C.C. Sorrell. 2002. Photo-electrochemical hydrogen generation from water using solar energy. materials-related aspects. **International Journal of Hydrogen energy** 27: 991-1022.

Basile, M.A., L. Dipasquale, A. Gambacorta, M.F. Vella, A. Calarco, P. Cerruti, M. Malinconico and G. Gomez d'Ayala. 2010. The effect of the surface charge of hydrogel supports on thermophilic biohydrogen production. **Bioresource Technology** 101: 4386-4394.

Bisalllon, A., J. Turcot and P.C. Hallenbeck. 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. **International Journal of Hydrogen Energy** 31: 1504-1508.

- Cara, C., M. Moya, I. Ballesteros, M.J. Negro, A. Gonzalez and E. Ruiz. 2007. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry** 42: 1003-1009.
- Chang, F.Y. and C.Y. Lin. 2006. Calcium effect on fermentative hydrogen production in an anaerobic up-flow sludge blanket system. **Water Science Technology** 54: 105-112.
- Chang, S., J.Z. Li and F. Liu. 2011. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy** 36: 1517-1522.
- Cheong, D. Y. and C. L. Hansen. 2007. Acidogenesis characteristics of natural mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. **Process Biochemistry** 41: 1736-1745.
- Chuang, Y.S., C.C. Chen, C.H. Lay, I.Y. Sung, J.H. Wu, S.C. Lee, B. Sen and C.Y. Lin. 2012. Optimization of incubation factors for fermentative hydrogen production from agricultural wastes. **Sustainable Environment Research** 22(2): 99-106.
- Costa, A., I. Conget and R. Gomis. 2002. Impaired glucose tolerance: is there a case for pharmacologic intervention. **Treatment in Endocrinology** 1: 205-210.
- Datar, R., J. Huang, P.C. Maness, A. Mohagheghi, S. Czernik and E. Chorent. 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy** 32: 932-939.
- Duangmanee, T., S. Padmasiri, J. Simmons, L. Raskin and S. Sung. 2007. Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatment. **Water Environment Research** 79: 683-692.

- Dunfield, P.F., A. Yuryev, P. Senin, A.V. Smirnova, M.B. Stott, S. Hou, B. Gy, J.H. Saw, Z. Zhou, Y. Ren, J. Wang, B.W. Mountain, M.A. Crowe, T.M. Weatherby, P.L.E. Bodelier, W. Liesack, L. Feng, L. Wang and M. Alam. 2007. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. **Nature** 450: 879-882.
- Estrela, C., F.C. Pimenta, I.Y. Ito and L.L. Bammann. 1998. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **Journal of Endodontics** 24: 1-3.
- Fan, L.T., M.M. Gharpuray and Y.H. Lee. 1987. **Cellulose Hydrolysis**. 1<sup>st</sup> edition Springer-Verlag Berlin, Germany: 1-68.
- Fan, Y., Y.H. Zhang, S.F. Zhang, H.W. Hou and B.Z. Ren. 2006. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. **Bioresource Technology** 97: 500-505.
- Fang, H.H.P., H. Liu and T. Zhang. 2005. Phototropic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy** 30: 785-793.
- Ferris, M.J., G. Muyzer and D.M. Ward. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA defined populations in habiting a hot spring microbial mat community. **Applied and Environmental Microbiology** 62: 340-346.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. **International Union of Pure and Applied Chemistry** 59: 257-268.
- Guo, W.Q., N.Q. Ren, X.J. Wang, W.S. Xiang, Z.H. Meng, J. Ding, Y.Y. Qua and L.S. Zhang. 2008. Biohydrogen production from ethanol type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy** 33: 4981-4988.

- Hahn, H.B., M. Galbe, M.F. Gorwa-grauslund, G. Linden and G. Zacchi. 2006. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnology** 24: 549-556.
- Hallenbeck, P.C. and J.R. Benemann. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy** 27: 1185-1193.
- Hawkes, F.R., I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale and D.L. Hawkes. 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy** 32: 172-184.
- Hawkes, F.R., R. Dinsdale, D.L. Hawkes and I. Hussy. 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy** 27: 1339-1347.
- Holtzapple, M.T., J. Jun, G. Ashok, S.L. Patibandla and B.E. Dale. 1991. The ammonia freeze explosion (AFEX) process—a practical lignocellulose pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 28/29: 59–74.
- Horn, S.J., M.M. Estevez, H.K. Nielsen, R. Linjordet and V.G.H. Eijsink. 2011. Biogas production and saccharification of *Salix* pretreated at different steam explosion condition. **Bioresource Technology** xxx: 1-25.
- Hsu, T.C., G.L. Guo, W.H. Chen and W.S. Hwang. 2010. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology** 101: 4907-4913.
- Hu, B. and S. Chen. 2007. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** 32: 3266-3273.

Ingram, L.O. and J.B. Doran. 1995. Conversion of cellulosic materials to ethanol. **Ferms Microbiology Reviews** 16: 235-241.

Ivanova, G., G. Rakhely and K.L. Kova. 2009. Thermophillic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparision with related studies. **International Journal of Hydrogen Energy** 34(9): 3659-3970.

Karadag, D. and J.A. Puhakka. 2010. Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy** 35: 10954-10959.

Karimi, K., S. Kheradmandinia and M.J. Taherzadeh. 2006. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass Bioenergy** 30: 247-253.

Kayhanian, M. and G. Tchobanglous. 1992. Computation of C/N ratios for various organic fractions. **BioCycle** xxx: 55-68.

Khanal, S.K., W.H. Chen, L. Li and S. Sung. 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy** 29: 1123-1131.

Kim, S. and M.T. Hotlzapple. 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource Technology** 96: 1994-2006.

Komemoto, K., Y.G. Lim, N. Nagao, Y. Onoue, C. Niwa and T. Toda. 2009. Effect of temperature on VFA's and biogas production in anaerobic solubilization of food waste. **Waste Management** 29: 2950-2955.

Kraemer, J.T. and D.M. Bagley. 2007. Improving the yield from fermentative hydrogen production. **Biotechnology Letters** 29: 685-695.

- Laser, M., D. Schulman, S.G. Allen, J. Lichwa, M.J. Antal and L.R. Lynd. 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology** 81: 33-44.
- Levin, D.B., L. Pitt and M. Love. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy** 29: 173-185.
- Li, C.L. and H.H.P. Fang. 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid by mixed cultures. **Environmental Science and Technology** 37: 1-39.
- Li, D. and H. Chen. 2007. Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** 32: 1742-1748.
- Lin, C.Y. and C.H. Lay. 2004. Effects of carbonate and phosphate concentration on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. **International Journal of Hydrogen Energy** 29: 275-281.
- Lin, C.Y. and C.H. Lay. 2005. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. **International Journal of Hydrogen Energy** 30: 285-292.
- Lin, P.Y., L.M. Whang, Y.R. Wu, W.J. Ren, C.J. Hsiao, S.L. Li and J.S. Chang. 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy** 32: 1728-1735.
- Liu, C. and C.E. Wyman. 2004. Impact of fluid velocity on hot water only pretreatment of corn stover in a flowthrough reactor. **Humana Press Inc** 113-116: 977-987.

- Liu, H., G. Wang, D. Zhu and G. Pan. 2009. Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy** 34: 9696-9701.
- Lu, X.B., Y.M. Zhang, J. Yang and Y. Liang. 2007. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chemical Engineering and Technology** 30: 938–944.
- Lynd, L.R., R.T. Elander and C.E. Wyman. 1996. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 57/58: 741-761.
- Martin, C. 2011. **Cellulose**. แหล่งที่มา: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycelh.html>, 10 มิถุนายน 2554.
- McMillan, J.D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. **ACS Symposium Series** 566: 292–324.
- Melis, A., L. Zhang, M. Forestier, M.L. Ghirardi and M. Seibert. 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology** 122: 127-135.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple and M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** 96: 673-686.
- Mu, Y., G. Wang and H.Q. Yu. 2006. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. **Enzyme and Microbial Technology** 38: 905–913.

- Mu, Y., H.Q. Yu and Y. Wang. 2006. The role of pH in the fermentative H<sub>2</sub> production from an acidogenic granule-based reactor. **Chemosphere** 64: 350–358.
- Muyzer, G., E.C. Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology** 59: 695-700.
- Nandi, R. and S. Sengupta. 1998. Microbial production of hydrogen-an overview. **Critical Reviews in Microbiology** 24: 61-84.
- Nasirian, N. 2012. Biological hydrogen production from acid-pretreated straw by simultaneous saccharification and fermentation. **African Journal of Agricultural Research** 7(6): 876-882.
- Nguyen, L.M. 2000. Organic matter composition microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewater. **Ecological Engineering** 16: 199-221.
- Ni, M., D.Y.C. Leung, M.K.H. Leung and K. Sumathy. 2006. An overview of hydrogen production from biomass. **Fuel Processing technology** 87: 461-472.
- Ooshima, H., S. Takakuwa, T. Katsuda, M. Okuda, T. Shirasawa, A. Azuma and J. Kato. 1998. Production of hydrogen by a hydrogenase-deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 85: 470-475.
- O-Thong, S., A. Hniman, P. Prasertsan and T. Imai. 2011. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy** 36: 3409-3416.

- O-Thong, S., P. Prasertsan and N.K. Birkeland. 2009. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology** 100: 909-918.
- Page, R.D.M. and E.C. Homes. 1988. Molecular evolution: a phylogenetic approach. **Blackwell Scientific Publications Oxford**.
- Pakarinen, O.M., H.P. Tahti and J.A. Rintala. 2009. One-stage H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> and two-stage H<sub>2</sub>+CH<sub>4</sub> production from grass silage and from solid and liquid fractions of NaOH pre-treated grass silage. **Biomass and Bioenergy** 33: 1419-1427.
- Palmqvist, E. and B. Hahn-Hagerdal. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology** 74: 25-33.
- Palmqvist, E., B.H. Hagerdal, M. Galbe and G. Zacchi. 1996. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzymatic and Microbial Technology** 19: 470-476.
- Pan, C., S. Zhang, Y. Fan and H. Hou. 2009. Bioconversion of corncob to hydrogen using anaerobic mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy** 34: 1-7.
- Pan, X., N. Gilkes and J.N. Saddler. 2006. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Walter de Gruyter Journals** 60: 398-401.
- Pan, X., X. Zhang, D.J. Gregg and J.N. Saddler. 2004. Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exploded douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 115: 1103-1114.
- Peixoto, G. 2008. Producao de hidrogenio em reator anaerobio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de agua residuaria de industria de refrigerantes. **Universidade de Sao Paulo**.

Plackett, R.L. and J.P. Burman. 1946. The design of optimum multifactorial experiments.

**Biometrika** 33: 305-325.

Ran, Y., Y.Z. Wang, Q. Liao, X. Zhu, R. Chen, D.J. Lee and Y.M. Wang. 2012. Effects of operation conditions on enzymatic hydrolysis of high-solid rice straw. **International Journal of Hydrogen Energy** 37: 13660-13666.

Ren, N.Q., W.Q. Gao, X.J. Wang, W.S. Xiang, B.F. Liu, X.Z. Wang, J. Ding and Z.B. Chen. 2008. Effect of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy** 33: 4318-4324.

Ruggeri, B., T. Tommasi and G. Sassi. 2009. Experimental kinetics and dynamics of hydrogen production on glucose by hydrogen forming bacteria (HFB) culture. **International Journal of Hydrogen Energy** 34: 753-763.

Ruiz, E., C. Cara, P. Manzanares, M. Ballesteros and E. Castro. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme and Microbial Technology** 42: 160-166.

Saha, B.C., Cotta, M.A., 2006. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. **Biotechnology Progress** 22: 449-453.

Selby, K. and C.C. Maitland. 1967. The cellulase of *Trichoderma viride* separation of the components involved in the solubilization of cotton. **Biochemical Journal** 1967: 716-724.

Shen, J and F.A. Agblevor. 2008. Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. **Biochemical Engineering Journal** 41: 241-250.

- Shen, J. and C.E. Wyman. 2011. A novel mechanism and kinetic model to explain enhanced xylose yields from dilute sulfuric acid compared to hydrothermal pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology** 102: 9111-9120.
- Sindhu, R., M. Kuttiraja, P. Binod, K.U. Janu, R.K. Sukumaran and A. Pandey. 2011. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. **Bioresource Technology** 102: 10915-10921.
- Soto, M.L., H. Dominguez, M.J. Nunez and J.M. Lema. 1994. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresource Technology** 49: 53-59.
- Sreela-or, C., P. Plangklang, T. Imai and A. Reungsang. 2011. Co-digestion of food waste and sludge for hydrogen production by anaerobic mixed cultures: statistical key factors optimization. **International Journal of Hydrogen Energy** xxx: 1-11.
- Sun, Y. and J.J. Cheng. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology** 96: 1599-1606.
- Telebnia, F., D. Karakashev and I. Angelidaki. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology** 101: 4744-4753.
- Torget, R., Werdene, P., Himmel, M., Grohmann, K. 1990. Dilute acid pretreatment of short rotation woody and herbaceous crops. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 24(5): 115-126.
- Troshina, O., L. Serebryakove, M. Sherwmetieva and P. Lindblad. 2002. Production of H<sub>2</sub> by the unicellular *Cyanobacterium gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy** 27: 1283-1289.

- Vasconcelos de Sa, L.R., T.C.D. Oliveira, T.F.D. Santos, A. Matos, M.C. Cannarota, E.M.M. Oliveira and V.S.F. Leitaó. 2011. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance. **International Journal of Hydrogen Energy** 36: 7543-7549.
- Wang, H., J. Wang, Z. Fang, X. Wang and H. Bu. 2010. Enhanced bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of apple pomace with enzyme hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy** 35: 8303-8309.
- Wang, J. and W. Wan. 2008. Optimization of fermentative hydrogen production process by response surface methodology. **International Journal of Hydrogen Energy** 33: 6976-6984.
- Wang, J. and W. Wan. 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy** 34: 799-811.
- Wang, X.J., N.Q. Ren, W.S. Xiang and W.Q. Guo. 2007. Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. **International Journal of Hydrogen Energy** 32: 748-754.
- Ward, A. and N. Bora. 2004. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. **Current Opinion in Microbiology** 9: 279-286.
- Watanabe, H., T. Kitamura, S. Ochi and M. Ozaki. 1997. Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic condition. **Water Science and Technology** 36: 25-32.

- Weigi, W., W. Shubin and L. Ligu. 2012. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. **Bioresource Technology** xxx: 1-7.
- Wijekoon, K.C., C. Visvanathan and A. Abeynayaka. 2011. Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two- stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource Technology** 102: 5353-5360.
- Winkler, M., B. Heil and T. Happe. 2002. Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*. **Biochemica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression** 1576: 330-334.
- Wu, L., M. Arakane, M. Ike, M. Wada, T. Takai, M. Gau and K. Tokuyasu. 2011. Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. **Bioresource Technology** 102: 4793-4799.
- Wu, S.Y., C.H. Hung, C.N. Lin, H.W. Chen, A.S. Lee and J.S. Chang. 2006. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. **Biotechnology Bioengineering** 93: 934-946.
- Xiaolong, H., Z. Minghua, Y. Hanqing, S. Qinqin and L. Lecheng. 2006. Effect of sodium ion concentration on hydrogen production from sucrose by anaerobic hydrogen producing granular sludge. **Chinese Journal Chemistry Engineering** 14: 511-517.
- Yang, H. and J. Shen. 2006. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. **International Journal of Hydrogen Energy** 31: 2137-2146.

- Yang, Z., R. Guo., X. Xu., X. Fan. and X. Li. 2010. Thermo-alkaline pretreatment of lipid-extracted microalgal biomass residues enhances hydrogen production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 86: 454-460.
- Yasin, N.H.M., N.A.A. Rahman, H.C. Man, M.Z.M. Yusoff and M.A. Hassan. 2011. Microbial characterization of hydrogen producing bacteria in fermented food waste at different pH values. **International Journal of Hydrogen Energy** 36: 9571-9580.
- Yen, J.W. and D.E. Brune. 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. **Bioresource Technology** 98: 130-134.
- Yi, X.B. and L.J. Xin. 2006. pH dependency of hydrogen fermentation from alkali pretreated sludge. **Chinese Science Bulletin** 51: 399-404.
- Yi, X.B. and L.J. Xin. 2009. Effects of various pretreatments on biohydrogen production from sewage sludge. **Chinese Science Bulletin** 54: 2038-2044.
- Yossan, S., S. O-Thong and P. Prasertsan. 2012. Effect of initial pH, nutrients and temperature on hydrogen production from palm oil mill effluent using thermotolerant consortia and corresponding microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy** xxx: 1-9.
- Yu, H.Q. and H.H.P. Fang. 2001. Inhibition on acidogenesis of dairy waster by zinc and copper. **Environmental Technology** 22: 1459-1465.
- Yuan, Q., R. Sparling and J.A. Oleszkiewicz. 2011. VFA generation from waste active sludge: Effect of temperature and mixing. **Chemosphere** 82: 603-607.

- Zhang, M.L., Y.T. Fan, Y. Xing, C.M. Pan, G.S. Zhang and J.J. Lay. 2007. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. **Biomass and Bioenergy** 3: 250-254.
- Zhang, Q., L. Tang, J. Zhang, Z. Mao and L. Jiang. 2011. Optimization of thermal-dilute sulfuric acid pretreatment for enhancement of methane production from cassava residues. **International Journal of Hydrogen Energy** 102: 3958-3965.
- Zhang, T., H. Liu and H.H.P. Fang. 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. **Journal Environmental Management** 69: 149-156.
- Zhang, Y. and J. Shen, 2006. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy** 31: 441-446.
- Zhang, Y.H.P., Ding, S.Y., Mielenz, J.R., Cui, J.B., Elander, R.T., Laser, M., Himmel, M.E., McMillan, J.R., Lynd, L.R., 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering** 97: 214–223.
- Zhao, X., F. Peng, K. Cheng and D. Liu. 2009. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology** 44: 17-23.
- Zhou, X., J. Xu, Z. Wang, J.J. Cheng, R. Li and R. Qu. 2012. Dilute sulfuric acid pretreatment of transgenic switchgrass for sugar production. **Bioresource Technology** 104: 823-827.
- Zhu, H.G. and M. Beland. 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. **International Journal of Hydrogen Energy** 31: 1980-1988.

Zimbardi, F., E. Viola, F. Nanna, E. Larocca, M. Cardinale and D. Barisano. 2007. Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch process. **Industrial Crops and Products** 26: 195-206.





ภาคผนวก



## 1. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน

- 1.1 เผาถ้วยอบในเตาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำออกไปใส่ไว้ในเคสลิเคเตอร์จนเย็น นำไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก
- 1.2 ชั่งตัวอย่างพร้อมถ้วยอบ นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- 1.3 เมื่อครบเวลาให้นำถ้วยอบไปไว้ในเคสลิเคเตอร์ รอจนเย็น นำไปชั่งเพื่อบันทึกน้ำหนัก

### วิธีการคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\%ash = (W1-W2)/W \times 100$$

%ash = ปริมาณเถ้า (%)

W1 = น้ำหนักถ้วยอบและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W2 = น้ำหนักถ้วยอบและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

### การคำนวณหาปริมาณคาร์บอน

$$\%C = (100 - \%ash)/1.8$$

%C = ปริมาณคาร์บอน (%)

## 2. การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน

วิเคราะห์โดยวิธี kjeldahl และ titration สามารถหาปริมาณรวมของ ammonia และ nitrogen ในรูปสารอินทรีย์โดยเรียกรวมตามวิธีการวิเคราะห์ว่า kjeldahl nitrogen ปริมาณไนโตรเจนที่หาได้โดยวิธี kjeldahl นี้ไม่รวมถึง azide azine azo Hydrazone nitrate nitrite nitro nitroso oxime และ semi-carbazone

## 2.1 สารเคมี

- สารละลาย NaOH เข้มข้น 40 % เตรียมโดยละลาย NaOH 400 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลิตร
- สารละลาย bromocresol green เตรียมโดยละลาย bromocresol green 0.2 กรัมใน ethyl alcohol 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย methy red โดยละลาย methy red 0.1 กรัมใน ethyl alcohol 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สารละลาย boric acid เข้มข้น 4 % ละลาย boric acid 400 กรัมในน้ำกลั่น 6 ลิตร แล้วนำไปตั้งบน hot plate จนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นได้ปริมาตร 9 ลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย bromocresol green และสารละลาย methy red ที่ได้เตรียมไว้ ปริมาตร 100 และ 70 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นและเขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- เตรียมสารละลาย HCl 0.02 โมล โดยดูดสารละลาย HCl เข้มข้นปริมาตร 1.64 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

## 2.2 วิธีวิเคราะห์

- การย่อยตัวอย่าง นำตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ใน digestion tube เติม  $K_2SO_4$  2 กรัม  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.8 กรัม และ ซัลฟูริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร ย่อยนาน 60 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นประมาณ 15 นาที
- การกลั่น เติมน้ำ 70 มิลลิลิตรใน digestion tube ที่ได้จากการย่อย เติม 40 % NaOH ปริมาตร 60 มิลลิลิตร (จากเครื่อง) และเติม 4 % boric acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร (erlenmeyer flask) กลั่นนาน 4 นาที และไตเตรทด้วยสารละลาย HCl 0.02 โมล

การคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน

$$\text{Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) (\%)} = \frac{(T-B) \times 14.007 \times [\text{HCl}] \times 1,000}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง(มิลลิกรัม)}}$$

T = ปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการไตเตรทแบลงค์ (มิลลิลิตร)

### 3. การวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

- นำ crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
- เติม 0.05 sodium citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0x6.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เข้าให้เข้ากัน
- นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- เติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เข้าให้เข้ากัน  
นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- เติมน้ำกลั่นหลอดละ 40 มิลลิลิตร เข้าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M sodium citrate buffer เป็นแบลงค์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐานเพื่อนำไปใช้คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากสูตรมาตรฐานการคำนวณยูนิตของเอนไซม์เซลลูโลส

$$\begin{aligned} 1 \text{ หน่วยของเอนไซม์} &= 1\mu\text{M ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที} \\ &= \frac{(\text{มิลลิกรัมกลูโคส}) \times (0.093)}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}} \end{aligned}$$

#### 4. การตรวจสอบสภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

##### 4.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ

- เติมน้ำ buffer coat 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำ Protinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง
- เติมน้ำ RNase (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง
- เติมน้ำ buffer AL 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอเทคเขย่านาน 15 วินาที เพื่อให้เซลล์เกิดการแตกตัวอย่างสมบูรณ์และให้ตัวอย่างกับ buffer AL ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายในหลอดจะเหนียวขึ้น นำไปปั่นเหวี่ยงเล็กน้อยให้หยดน้ำที่ฝาหลอดตกลงมา
- เติมน้ำเอทานอล (96-100%) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการวอเทค เป็นเวลา 15 วินาที
- ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน QIAamp spin column ที่ซึ้อนอยู่ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาคอลัมน์เพื่อป้องกันละอองต่างๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg เป็นเวลา 1 นาที
- นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างใหม่ เติมน้ำ buffer AW1 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg เป็นเวลา 1 นาที
- นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างใหม่ เติมน้ำ buffer AW2 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดเก็บตัวอย่างนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 20,000xg เป็นเวลา 3 นาที

- นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer AE 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000xg เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอ เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อรีเอเจนต์สำหรับ 16s

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| Primer1 (pA) (ไมโครลิตร)   | 0.4 |
| Primer2 (pH) (ไมโครลิตร)   | 0.4 |
| dNTP (ไมโครลิตร)           | 1   |
| Tag polymerase (ไมโครลิตร) | 0.2 |
| Tag buffer (ไมโครลิตร)     | 1   |
| Deionize water (ไมโครลิตร) | 6   |
| DNA template (ไมโครลิตร)   | 1   |
| Total volume (ไมโครลิตร)   | 10  |

องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อรีเอเจนต์สำหรับ V3

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| Primer 1 (357f) (ไมโครลิตร)          | 0.5  |
| Primer 2 (518r) (ไมโครลิตร)          | 0.5  |
| Buffer + $Mg^{2+}$ (10x) (ไมโครลิตร) | 5    |
| $MgCl_2$ (ไมโครลิตร)                 | 2    |
| i-Tag DNA polymerase (ไมโครลิตร)     | 0.2  |
| dNTP (ไมโครลิตร) (10mM)              | 5    |
| Deionize water (ไมโครลิตร)           | 34.8 |
| DNA template (ไมโครลิตร)             | 2    |
| Total volume (ไมโครลิตร)             | 50   |

เงื่อนไขของปฏิกิริยาพีซีอาร์

Initial PCR activation    94 องศาเซลเซียส    3 นาที

## 3 step cycling

|                 |                 |           |
|-----------------|-----------------|-----------|
| Denaturing      | 94 องศาเซลเซียส | 30 วินาที |
| Annealing       | 57 องศาเซลเซียส | 1 นาที    |
| Extension       | 72 องศาเซลเซียส | 1 นาที    |
| Number of cycle | 30              |           |
| Final extension | 72 องศาเซลเซียส | 10 นาที   |
| Cooling         | 5 องศาเซลเซียส  |           |

นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (จำนวนเบสเท่ากับ 200 คู่เบส) ไปตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ส่องด้วยเครื่อง UV transilluminator

เมื่อได้ดีเอ็นเอจากกระบวนการพีซีอาร์ (จากขั้นตอนการทำ V3) แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำดีจีจีอีต่อ สำหรับการเตรียมเจลใช้วิธีการของ Muyzer *et al.* (1993) โดยการใช้เปอร์เซ็นต์เจลในการทำดีจีจีอีเท่ากับ 30-60% สำหรับเปอร์เซ็นต์อะคริลาไมด์ใช้เท่ากับ 8% เริ่มต้นด้วยการเตรียม 0% และ 100% Denaturing

## การเตรียม 0% และ 100% Denaturing

|                       | 0%  | 100% |
|-----------------------|-----|------|
| 40% Acrylamide/Bis    | 20  | 20   |
| 50xTAE buffer         | 2   | 2    |
| Formamide (deionized) | 78  | 40   |
| Urea                  | -   | 42   |
| dH <sub>2</sub> O     | 100 | 100  |

สำหรับ 30% และ 60% Denaturant (เปอร์เซ็นต์เจลสำหรับทำดีจีจีอี) เตรียมจาก 0% และ 100% Denaturing ดังนี้

| % Denaturant | 0%  | 100% |
|--------------|-----|------|
| 30           | 8.4 | 3.6  |
| 60           | 4.8 | 7.2  |
| Total volume | 12  | 12   |

เมื่อเริ่มต้นเดินระบบใช้กระแสไฟฟ้าที่ 20 โวลต์ 20 นาที่ หลังจากนั้นใช้ 100 โวลต์นาน 16 ชั่วโมง นำผลผลิตที่ได้จากกระบวนการดีจีจีจีไปตรวจสอบ โดยการนำเจลอะครีลาไมด์ไปย้อมด้วย SYBR Gold สังเกตด้วยเครื่อง UV transluminator

#### 4.2 การเตรียมเจล (Agarose gel)

- เตรียมถาดสำหรับเทเจล ประกอบด้วยแผ่นรองเจลและหวี
- เตรียมสารละลาย 1X TAE buffer จาก stock solution 50X
- ละลาย 1% agarose ด้วย 1X TAE buffer นำไปหลอมจนละลายเข้ากันดี พร้อมทั้งหยดเอทิลีนโบรไมด์ลงไปในเจลอะกาโรส เทใส่ถาดที่เตรียมไว้หนาประมาณครึ่งหนึ่งของหวี หรือแล้วแต่ความต้องการ ทิ้งเจลประมาณ 30 นาที หรือรอจนกว่าเจลจะแข็งตัว
- ดึงหวีออกจากถาดเทเจลอย่างระมัดระวัง อย่าให้เจลแตก สามารถนำเจลไปใช้ตรวจสอบได้หรืออาจเก็บไว้ใช้ในครั้งต่อไป โดยการแช่ในเท 1X TAE buffer หากเจลที่เตรียมไว้เหลือ

#### 4.3 การทำ Electrophoresis

- ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับ loading dye ในอัตราส่วน 2:3
- หยด size marker ลงในหลุมแรก ควรระมัดระวังอย่าให้ฟุ้งกระจาย เพราะอาจเกิดการปนเปื้อนไปยังตัวอย่างอื่นได้

- นำตัวอย่างที่ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 2:3 แล้วหยดตัวอย่างลงในหลุมถัดไป

- ปิดฝาครอบและตรวจสอบให้แน่ใจว่าขั้วบวกอยู่ในทิศทางตรงกันข้ามกับทิศทางของหลุมตัวอย่าง ตั้งค่าความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ 20 นาที เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ควรเห็นฟองอากาศผุดขึ้นมาจากลวดนำไฟฟ้า ที่ขั้วไฟฟ้าทั้งสองข้าง

- สังเกตทิศทางเคลื่อนที่ของ loading dye หากเคลื่อนที่ผิดทาง แสดงว่าการต่อขั้วไฟฟ้าผิดข้าง ควรปิดเครื่องและเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าให้ถูกต้อง เมื่อครบกำหนดเวลา ปิดเครื่อง

#### 4.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ให้บริสุทธิ์มีทั้งหมด 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 การเตรียมความพร้อมของตัวอย่าง ตัวอย่างดีเอ็นเอต่อ SD buffer ในอัตราส่วน 1:5 ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการวอร์เทก

ขั้นที่ 2 การทำให้ดีเอ็นเอจับกับคอลัมน์ (DNA binding) SD column จากขั้นตอนที่ 1 ใส่ลงไปในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเซนตริฟิวส์ด้วยความเร็วรอบ 14-16,000 xg นาน 30 วินาที เทของเหลวออกแล้วนำ SD column ใส่กลับลงไปในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร ตามเดิม

ขั้นที่ 3 การล้างทำความสะอาดสิ่งสกปรก เติม Wash Buffer (ที่เติมเอทานอล) ลงไปตรงกึ่งกลางของ SD column ตั้งทิ้งไว้เวลานาน 1 นาที แล้วนำไปเซนตริฟิวส์ด้วยความเร็วรอบ 14-16,000 xg นาน 30 วินาที เทของเหลวออกแล้วนำ SD column ใส่กลับลงไปในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร ตามเดิม หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวส์อีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 14-16,000 xg นาน 3 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง

ขั้นที่ 4 การได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA elution) นำ SD column ที่แห้งแล้วใส่ลงไปในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ เติม TE ซึ่งทำหน้าที่ Elution Buffer 20-50 ไมโครลิตร หรือ TE ลงไปตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้เวลานาน 2 นาที หรือจนกระทั่ง Elution Buffer

หรือ TE ถูกดูดซับไปในคอลัมน์ได้อย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวส์ด้วยความเร็วรอบ 14-16,000 xg นาน 2 นาที ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ออกมา

#### 4.5 การอ่านผล

นำเจลที่ผ่านการทำ Electrophoresis ไปส่องดูด้วยเครื่อง Transilluminator ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ผลิตขึ้นมาเพื่อความสะดวกในการตรวจสอบเจล โดยส่วนใหญ่ติดตั้งหลอด UV ไว้ใต้แท่นวางเจล โดยทำความสะอาดแท่นวางเจลด้วยน้ำกลั่นก่อน เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ออกให้หมด ปรับแสงตามและขนาดตามต้องการทำการบันทึกผลการทำ electrophoresis ที่ได้ไว้เป็นข้อมูล

**ตารางผนวกที่ ก1** สัดส่วนและปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียม 0% Denaturing solution

| Reagent                  | 6% gel | 8% gel | 10% gel | 12% gel |
|--------------------------|--------|--------|---------|---------|
| 40% acrylamide/Bis (ml.) | 15     | 20     | 25      | 30      |
| 50X TAE buffer (ml.)     | 2      | 2      | 2       | 2       |
| Distilled water (ml.)    | 83     | 78     | 73      | 68      |

ที่มา: Ward and Bora, 2004

**ตารางผนวกที่ ก2** สัดส่วนและปริมาณสารเคมีสำหรับเตรียม 100% Denaturing solution

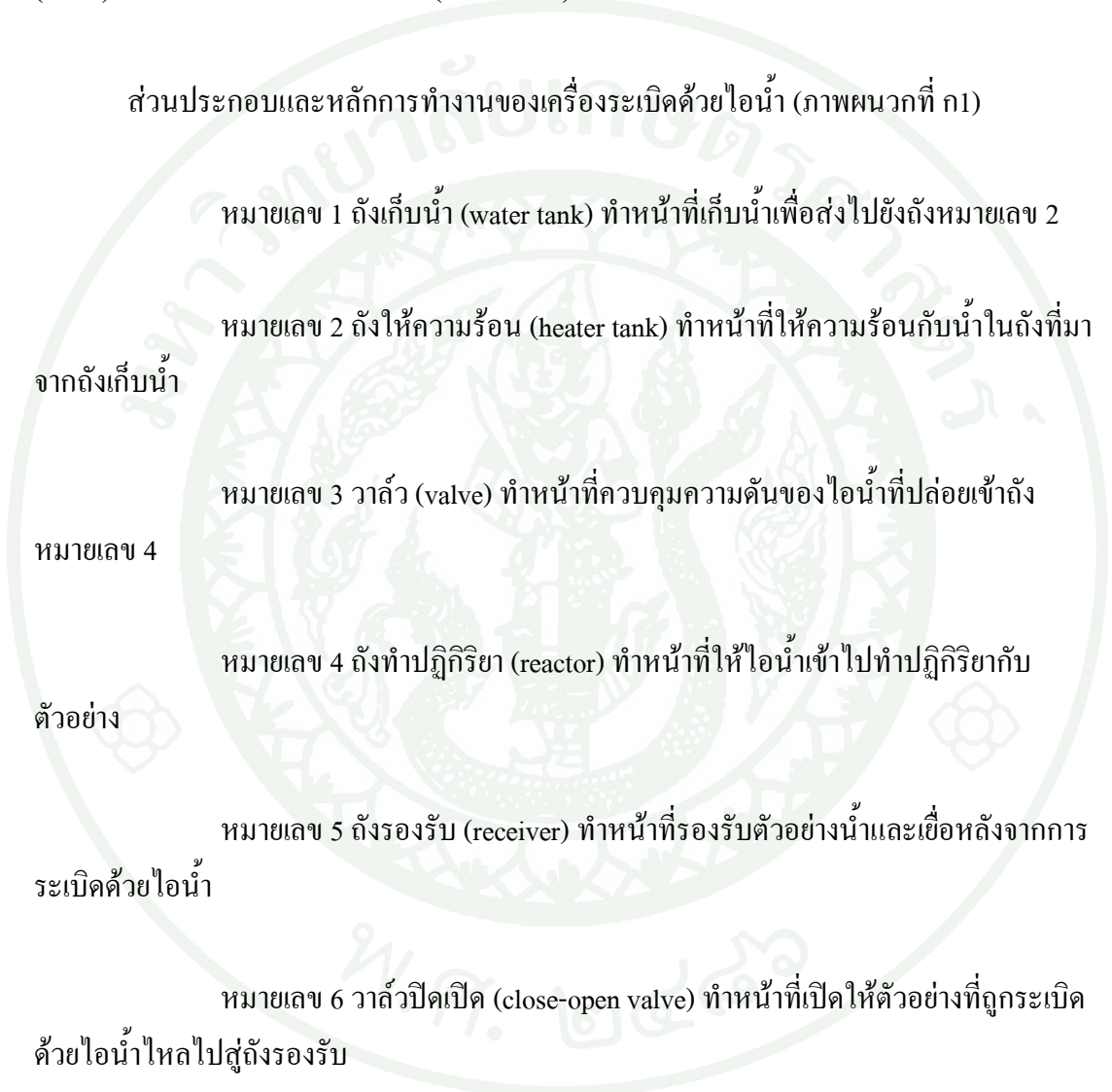
| Reagent                  | 6% gel | 8% gel | 10% gel | 12% gel |
|--------------------------|--------|--------|---------|---------|
| 40% acrylamide/Bis (ml.) | 15     | 20     | 25      | 30      |
| 50X TAE buffer (ml.)     | 2      | 2      | 2       | 2       |
| Formamide (ml.)          | 40     | 40     | 40      | 40      |
| Urea (g)                 | 42     | 42     | 42      | 42      |
| Distilled water (ml.)    | to 100 | to 100 | to 100  | to 100  |

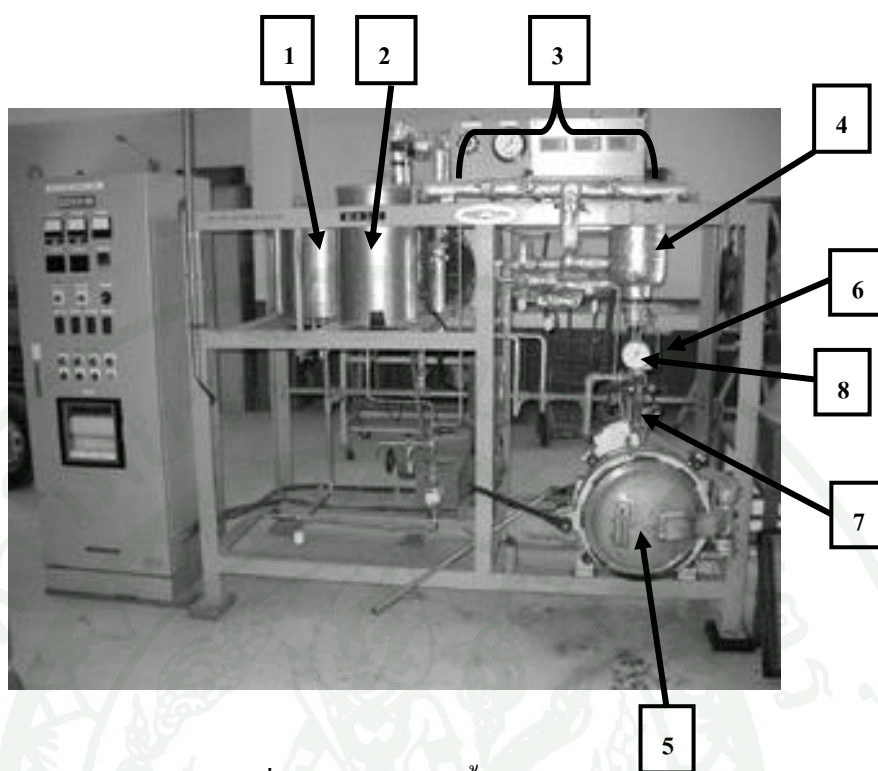
ที่มา: Ward and Bora, 2004

## 5. เครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ

เทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำใช้แยกองค์ประกอบของวัสดุจำพวกไม้และวัสดุเศษเหลือทิ้งทางการเกษตร เครื่องระเบิดด้วยไอน้ำสามารถทำงานได้ทั้งในรูปของกระบวนการทำงานเป็นครั้ง (batch) และการทำงานอย่างต่อเนื่อง (continuous)

ส่วนประกอบและหลักการทำงานของเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ (ภาพผนวกที่ ก1)

- 
- หมายเลข 1 ถังเก็บน้ำ (water tank) ทำหน้าที่เก็บน้ำเพื่อส่งไปยังถังหมายเลข 2
- หมายเลข 2 ถังให้ความร้อน (heater tank) ทำหน้าที่ให้ความร้อนกับน้ำในถังที่มาจากถังเก็บน้ำ
- หมายเลข 3 วาล์ว (valve) ทำหน้าที่ควบคุมความดันของไอน้ำที่ปล่อยเข้าถัง
- หมายเลข 4 ถังทำปฏิกิริยา (reactor) ทำหน้าที่ให้ไอน้ำเข้าไปทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง
- หมายเลข 5 ถังรองรับ (receiver) ทำหน้าที่รองรับตัวอย่างน้ำและเชื้อหลังจากการระเบิดด้วยไอน้ำ
- หมายเลข 6 วาล์วปิดเปิด (close-open valve) ทำหน้าที่เปิดให้ตัวอย่างที่ถูกระเบิดด้วยไอน้ำไหลไปสู่ถังรองรับ
- หมายเลข 7 ท่อปล่อยระบายความดัน ทำหน้าที่ปล่อยความดันออกสู่ภายนอกหลังจากทำการระเบิดด้วยไอน้ำเสร็จแล้ว
- หมายเลข 8 เครื่องวัดความดัน (ball valve) ทำหน้าที่วัดความดันภายในถังรองรับ



ภาพผนวกที่ ก1 ส่วนประกอบของเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ



**ตารางผนวกที่ ข1** ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีแฟล็กเก็ตต์-เบอร์แมน

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตรต่อลิตร) |          |          |          |          |          |          |
|--------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                    | 1                                 | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        |
| 0                  | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00     |
| 12                 | 160.30                            | 500.38   | 352.85   | 631.46   | 465.70   | 174.79   | 499.27   |
| 16                 | 235.81                            | 908.03   | 561.67   | 1,019.22 | 903.71   | 293.48   | 800.35   |
| 34                 | 362.13                            | 1,189.86 | 689.45   | 1,317.46 | 1,172.59 | 316.71   | 1,089.89 |
| 60                 | 496.23                            | 1,409.43 | 843.66   | 1,600.18 | 1,337.98 | 417.34   | 1,405.76 |
| 95                 | 577.43                            | 1,835.32 | 987.22   | 2,135.21 | 1,913.28 | 459.44   | 1,894.44 |
| 113                | 643.46                            | 2,140.93 | 1,085.24 | 2,478.27 | 2,271.00 | 504.46   | 2,181.30 |
| 137                | 702.65                            | 2,411.02 | 1,179.90 | 2,828.45 | 2,531.47 | 550.77   | 2,437.88 |
| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | 8                                 | 9        | 10       | 11       | 12       | หาควบรวม |          |
| 0                  | 182.58                            | 349.81   | 294.42   | 439.64   | 553.63   | 0.00     |          |
| 12                 | 308.07                            | 709.16   | 484.32   | 670.12   | 1,004.61 | 7.52     |          |
| 16                 | 403.65                            | 970.76   | 577.07   | 855.50   | 1,333.26 | 23.27    |          |
| 34                 | 476.50                            | 1,300.78 | 671.28   | 1,040.95 | 1,523.95 | 47.12    |          |
| 60                 | 539.29                            | 1,555.76 | 759.45   | 1,205.28 | 2,058.10 | 67.93    |          |
| 95                 | 563.96                            | 1,684.99 | 818.23   | 1,317.56 | 2,422.25 | 71.83    |          |
| 113                | 591.06                            | 1,797.90 | 877.76   | 1,444.62 | 2,672.94 | 83.39    |          |

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากการหมักชีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทางทฤษฎี

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตรต่อลิตร) |          |          |          |           |
|--------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|                    | 1                                 | 2        | 3        | 4        | 5         |
| 0                  | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00      |
| 6                  | 34.14                             | 167.53   | 232.34   | 202.68   | 111.73    |
| 12                 | 83.75                             | 212.29   | 299.13   | 294.10   | 161.44    |
| 24                 | 128.87                            | 412.83   | 820.90   | 710.21   | 275.02    |
| 48                 | 257.74                            | 588.62   | 1,115.74 | 905.58   | 387.81    |
| 72                 | 340.10                            | 643.27   | 1,379.67 | 1,216.83 | 435.49    |
| 96                 | 395.07                            | 695.64   | 1,644.37 | 1,491.75 | 492.31    |
| 132                | 430.21                            | 709.94   | 1,798.66 | 1,616.71 | 514.83    |
| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | 6                                 | 7        | 8        | 9        | ชุดควบคุม |
| 0                  | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00      |
| 6                  | 287.96                            | 176.56   | 147.95   | 5.99     | 244.03    |
| 12                 | 448.52                            | 264.24   | 232.47   | 10.48    | 333.10    |
| 24                 | 921.20                            | 608.08   | 447.98   | 33.26    | 815.30    |
| 48                 | 1,261.15                          | 960.40   | 577.68   | 37.61    | 1,339.80  |
| 72                 | 1,560.07                          | 1,204.48 | 774.25   | 41.96    | 1,738.54  |
| 96                 | 1,795.04                          | 1,403.39 | 913.39   | 50.23    | 2,054.43  |
| 132                | 1,897.62                          | 1,497.81 | 1,018.15 | 52.59    | 2,259.16  |

ตารางผนวกที่ ข3 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากการหมักชี้เลี้ยงที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย  
โซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผน  
การทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิลิตรต่อลิตร) |          |          |          |           |
|--------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|-----------|
|                    | 1                                 | 2        | 3        | 4        | 5         |
| 0                  | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00      |
| 12                 | 28.69                             | 50.50    | 125.68   | 163.95   | 44.04     |
| 24                 | 91.65                             | 167.75   | 288.85   | 409.04   | 154.07    |
| 48                 | 121.48                            | 497.38   | 591.13   | 720.52   | 264.77    |
| 72                 | 169.57                            | 792.13   | 773.50   | 925.02   | 345.09    |
| 96                 | 170.04                            | 938.00   | 886.17   | 1,044.05 | 345.09    |
| 132                | 184.57                            | 1,030.13 | 1,016.40 | 1,147.90 | 347.27    |
| 168                | 204.25                            | 1,125.00 | 1,027.20 | 1,200.53 | 349.46    |
| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | 6                                 | 7        | 8        | 9        | ชุดควบคุม |
| 0                  | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00      |
| 12                 | 27.72                             | 111.08   | 17.84    | 33.39    | 36.70     |
| 24                 | 93.83                             | 300.79   | 30.13    | 84.54    | 51.72     |
| 48                 | 600.15                            | 758.20   | 235.78   | 218.25   | 90.25     |
| 72                 | 1,256.45                          | 1,111.12 | 812.01   | 283.82   | 102.35    |
| 96                 | 1,784.35                          | 1,397.65 | 1,254.02 | 283.82   | 114.45    |
| 132                | 2,142.17                          | 1,591.16 | 1,274.75 | 283.82   | 133.09    |
| 168                | 2,378.66                          | 1,667.58 | 1,465.63 | 283.82   | 151.74    |

**ตารางผนวกที่ ข4 ปริมาณไฮโดรเจนจากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด**  
**ซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลอง**  
**ด้วยวิธีการตอบสนองต่อพื้นผิว**

| ระยะเวลา<br>(ชั่วโมง) | ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิตรต่อลิตร) |        |          |        |          |          |          |             |
|-----------------------|---------------------------------|--------|----------|--------|----------|----------|----------|-------------|
|                       | 1                               | 2      | 3        | 4      | 5        | 6        | 7        | 8           |
| 0                     | 0.00                            | 0.00   | 0.00     | 0.00   | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00        |
| 12                    | 4.71                            | 43.79  | 38.38    | 3.82   | 2.44     | 50.24    | 44.29    | 1.11        |
| 24                    | 9.97                            | 174.28 | 365.98   | 24.07  | 2.44     | 260.07   | 242.50   | 11.86       |
| 48                    | 456.17                          | 303.86 | 583.63   | 302.35 | 139.48   | 442.72   | 446.73   | 592.27      |
| 72                    | 796.38                          | 413.67 | 790.44   | 504.14 | 597.93   | 618.22   | 593.58   | 1,238.06    |
| 96                    | 1,069.64                        | 495.58 | 957.72   | 702.08 | 1,019.67 | 742.58   | 724.12   | 1,817.33    |
| 132                   | 1,374.97                        | 535.00 | 1,071.36 | 849.45 | 1,248.00 | 816.39   | 784.16   | 2,157.70    |
| ระยะเวลา<br>(ชั่วโมง) | 9                               | 10     | 11       | 12     | 13       | 14       | 15       | หุ้ดควบคูลม |
| 0                     | 0.00                            | 0.00   | 0.00     | 0.00   | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00        |
| 12                    | 16.13                           | 2.42   | 38.73    | 35.98  | 2.41     | 2.46     | 9.40     | 44.07       |
| 24                    | 63.58                           | 2.42   | 180.59   | 247.82 | 2.41     | 2.46     | 20.17    | 53.42       |
| 48                    | 508.28                          | 2.33   | 324.13   | 480.82 | 2.55     | 52.90    | 462.11   | 93.31       |
| 72                    | 791.13                          | 20.77  | 464.26   | 698.69 | 113.61   | 476.84   | 816.23   | 108.83      |
| 96                    | 1,023.53                        | 224.81 | 574.43   | 881.91 | 464.10   | 939.21   | 1,087.81 | 124.36      |
| 132                   | 1,245.23                        | 438.41 | 639.19   | 967.96 | 726.20   | 1,218.97 | 1,366.11 | 140.22      |

ตารางผนวกที่ ข5 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากการหมักที่เชื่อมร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทางเคมี

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิเมตรต่อลิตร) |          |          |             |          |
|--------------------|-----------------------------------|----------|----------|-------------|----------|
|                    | 1                                 | 2        | 3        | 4           | 5        |
| 0                  | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00        | 0.00     |
| 12                 | 12.55                             | 11.66    | 11.12    | 11.54       | 141.03   |
| 24                 | 357.13                            | 326.22   | 74.41    | 66.62       | 488.06   |
| 48                 | 970.01                            | 987.50   | 833.26   | 558.59      | 750.71   |
| 72                 | 1,524.55                          | 1,508.85 | 1,575.94 | 1,156.78    | 955.40   |
| 96                 | 1,727.65                          | 1,886.23 | 2,060.26 | 1,489.32    | 1,093.20 |
| 132                | 1,922.79                          | 2,196.16 | 2,462.22 | 1,791.62    | 1,194.81 |
| 168                | 1,910.26                          | 2,287.74 | 2,646.76 | 1,843.88    | 1,238.36 |
| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | 6                                 | 7        | 8        | หาค่าเฉลี่ย |          |
| 0                  | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00        |          |
| 12                 | 156.86                            | 129.25   | 113.52   | 117.86      |          |
| 24                 | 516.35                            | 655.76   | 312.47   | 367.25      |          |
| 48                 | 685.62                            | 1,189.62 | 609.13   | 638.53      |          |
| 72                 | 778.77                            | 1,463.65 | 811.45   | 758.95      |          |
| 96                 | 866.76                            | 1,679.91 | 931.65   | 751.83      |          |
| 132                | 919.12                            | 1,829.79 | 1,026.22 | 743.10      |          |
| 168                | 932.25                            | 1,910.61 | 1,034.88 | 727.73      |          |

ตารางผนวกที่ ข6 ปริมาณไฮโดรเจนจากการหมักที่ปล่อยร่วมกับกากตะกอนที่สภาวะต่างๆ ที่  
ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

| ระยะเวลา<br>(ชั่วโมง) | ปริมาณไฮโดรเจน (มิลลิเมตรต่อลิตร) |          |          |          |           |          |
|-----------------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|
|                       | 1                                 | 2        | 3        | 4        | 5         | 6        |
| 0                     | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00      | 0.00     |
| 12                    | 4.61                              | 6.00     | 25.46    | 7.25     | 2.64      | 4.28     |
| 24                    | 199.33                            | 189.73   | 265.60   | 7.25     | 206.82    | 211.07   |
| 48                    | 906.94                            | 1,053.73 | 847.21   | 464.07   | 1,093.79  | 929.85   |
| 72                    | 1,585.47                          | 1,692.38 | 1,338.57 | 759.26   | 1,778.50  | 1,519.01 |
| 96                    | 2,049.09                          | 2,272.91 | 1,783.51 | 1,077.56 | 2,439.60  | 2,042.48 |
| 132                   | 2,233.19                          | 2,576.75 | 1,938.85 | 1,113.61 | 2,757.70  | 2,304.16 |
| ระยะเวลา<br>(ชั่วโมง) | 7                                 | 8        | 9        | 10       | 11        | 12       |
|                       |                                   |          |          |          |           |          |
| 0                     | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00     | 0.00      | 0.00     |
| 12                    | 9.08                              | 10.35    | 8.40     | 14.10    | 3.92      | 6.88     |
| 24                    | 9.08                              | 10.35    | 267.58   | 263.00   | 239.02    | 6.88     |
| 48                    | 839.98                            | 794.99   | 866.24   | 885.12   | 826.28    | 603.97   |
| 72                    | 1,387.82                          | 1,288.04 | 1,369.96 | 1,402.14 | 1,387.93  | 1,168.42 |
| 96                    | 1,903.63                          | 1,838.18 | 1,894.80 | 1,908.69 | 1,939.81  | 1,547.30 |
| 132                   | 2,163.62                          | 2,041.82 | 2,137.94 | 2,148.51 | 2,115.90  | 1,614.85 |
| ระยะเวลา<br>(ชั่วโมง) | 13                                | 14       | 15       | 16       | ชุดควบคุม |          |
|                       |                                   |          |          |          |           |          |
| 0                     | 0.00                              | 0.00     | 0.00     | 0.00     |           | 0.00     |
| 12                    | 1.73                              | 0.60     | 55.60    | 1.86     |           | 11.90    |
| 24                    | 84.44                             | 31.20    | 258.49   | 105.68   |           | 62.81    |
| 48                    | 618.99                            | 619.38   | 739.43   | 630.75   |           | 527.66   |
| 72                    | 1,192.15                          | 1,096.35 | 1,269.27 | 1,017.73 |           | 1,025.12 |
| 96                    | 1,729.42                          | 1,580.93 | 1,753.40 | 1,403.78 |           | 1,477.18 |
| 132                   | 1,904.52                          | 1,778.28 | 1,903.29 | 1,513.43 |           | 1,596.86 |

**ตารางผนวกที่ ข7** ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย  
สารละลายกรดซัลฟิวริกที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธี  
แฟล็กเก็ตต์-เบอร์แมน

| สภาวะการทดลอง | ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น<br>(กรัมต่อลิตร) |      |      | ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
|---------------|---------------------------------------------------|------|------|-------------------------------------|
|               | ซ้ำ1                                              | ซ้ำ2 | ซ้ำ3 |                                     |
| 1             | 1.35                                              | 1.36 | 1.35 | 1.36 $\pm$ 0.00                     |
| 2             | 2.95                                              | 2.96 | 2.95 | 2.95 $\pm$ 0.00                     |
| 3             | 1.40                                              | 1.40 | 1.41 | 1.40 $\pm$ 0.00                     |
| 4             | 3.14                                              | 3.15 | 3.15 | 3.15 $\pm$ 0.00                     |
| 5             | 3.04                                              | 3.04 | 3.05 | 3.04 $\pm$ 0.00                     |
| 6             | 0.48                                              | 0.48 | 0.48 | 0.48 $\pm$ 0.00                     |
| 7             | 2.96                                              | 2.95 | 2.95 | 2.96 $\pm$ 0.00                     |
| 8             | 1.16                                              | 1.17 | 1.16 | 1.16 $\pm$ 0.00                     |
| 9             | 1.53                                              | 1.53 | 1.53 | 1.53 $\pm$ 0.00                     |
| 10            | 1.26                                              | 1.26 | 1.28 | 1.27 $\pm$ 0.01                     |
| 11            | 1.42                                              | 1.41 | 1.43 | 1.42 $\pm$ 0.01                     |
| 12            | 3.12                                              | 3.12 | 3.11 | 3.12 $\pm$ 0.00                     |
| ชุดควบคุม     | 0.17                                              | 0.17 | 0.17 | 0.17 $\pm$ 0.00                     |

ตารางผนวกที่ ข8 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ  
ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่  
ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

| สภาวะการทดลอง | ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น |      |      | ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
|---------------|----------------------------------|------|------|-------------------------------------|
|               | (กรัมต่อลิตร)                    |      |      |                                     |
|               | ซ้ำ1                             | ซ้ำ2 | ซ้ำ3 |                                     |
| 1             | 0.16                             | 0.16 | 0.17 | 0.16 $\pm$ 0.00                     |
| 2             | 1.50                             | 1.50 | 1.26 | 1.42 $\pm$ 0.13                     |
| 3             | 2.49                             | 2.49 | 2.49 | 2.49 $\pm$ 0.00                     |
| 4             | 2.59                             | 2.59 | 2.59 | 2.59 $\pm$ 0.00                     |
| 5             | 0.62                             | 0.62 | 0.62 | 0.62 $\pm$ 0.00                     |
| 6             | 2.71                             | 2.49 | 2.71 | 2.64 $\pm$ 0.13                     |
| 7             | 2.69                             | 2.69 | 2.69 | 2.69 $\pm$ 0.00                     |
| 8             | 2.49                             | 2.47 | 2.49 | 2.48 $\pm$ 0.01                     |
| 9             | 2.41                             | 2.42 | 2.40 | 2.41 $\pm$ 0.01                     |
| ชุดควบคุม     | 0.17                             | 0.16 | 0.17 | 0.17 $\pm$ 0.00                     |

ตารางผนวกที่ ข๑ ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพ  
ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ  
ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

| ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น |               |      |      |                                     |
|----------------------------------|---------------|------|------|-------------------------------------|
| สภาวะการทดลอง                    | (กรัมต่อลิตร) |      |      | ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
|                                  | ซ้ำ1          | ซ้ำ2 | ซ้ำ3 |                                     |
| 1                                | 0.43          | 0.42 | 0.43 | 0.43 $\pm$ 0.01                     |
| 2                                | 1.25          | 1.23 | 1.27 | 1.25 $\pm$ 0.02                     |
| 3                                | 1.50          | 1.49 | 1.49 | 1.49 $\pm$ 0.01                     |
| 4                                | 1.52          | 1.53 | 1.52 | 1.52 $\pm$ 0.01                     |
| 5                                | 1.40          | 1.40 | 1.41 | 1.40 $\pm$ 0.01                     |
| 6                                | 2.88          | 2.90 | 2.88 | 2.88 $\pm$ 0.01                     |
| 7                                | 1.92          | 1.95 | 1.94 | 1.94 $\pm$ 0.02                     |
| 8                                | 2.02          | 1.94 | 1.98 | 1.98 $\pm$ 0.04                     |
| 9                                | 1.63          | 1.62 | 1.62 | 1.62 $\pm$ 0.00                     |
| หาควบทุม                         | 0.42          | 0.41 | 0.42 | 0.42 $\pm$ 0.01                     |

ตารางผนวกที่ ข10 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักซีเลื้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วย  
สารละลายกรดซัลฟิวริก ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบ  
แผนการทดลองด้วยวิธีการตอบสนองต่อพื้นผิว

| สภาวะการทดลอง | ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น |      |      | ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
|---------------|----------------------------------|------|------|---------------------------------|
|               | (กรัมต่อลิตร)                    |      |      |                                 |
|               | ซ้ำ1                             | ซ้ำ2 | ซ้ำ3 |                                 |
| 1             | 2.78                             | 2.80 | 2.77 | 2.78±0.01                       |
| 2             | 1.43                             | 1.44 | 1.43 | 1.43±0.01                       |
| 3             | 2.40                             | 2.42 | 2.40 | 2.41±0.01                       |
| 4             | 1.50                             | 1.50 | 1.50 | 1.50±0.00                       |
| 5             | 2.84                             | 2.84 | 2.83 | 2.83±0.01                       |
| 6             | 1.41                             | 1.41 | 1.42 | 1.41±0.01                       |
| 7             | 2.79                             | 2.78 | 2.80 | 2.79±0.01                       |
| 8             | 3.09                             | 3.10 | 3.10 | 3.09±0.01                       |
| 9             | 2.80                             | 2.81 | 2.80 | 2.80±0.01                       |
| 10            | 2.32                             | 2.31 | 2.33 | 2.32±0.01                       |
| 11            | 1.46                             | 1.46 | 1.23 | 1.38±0.13                       |
| 12            | 2.73                             | 2.72 | 2.74 | 1.36±0.01                       |
| 13            | 1.36                             | 1.35 | 1.37 | 1.36±0.01                       |
| 14            | 2.73                             | 2.72 | 2.74 | 2.73±0.01                       |
| 15            | 2.80                             | 2.80 | 2.79 | 2.80±0.01                       |
| ชุดควบคุม     | 0.84                             | 0.82 | 0.83 | 0.83±0.01                       |

ตารางผนวกที่ ข11 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักก็ขึ้นอยู่กับกากตะกอนที่ผ่าน  
การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างที่สภาวะต่างๆ ที่ออกแบบแผนการ  
ทดลองด้วยวิธีทางเคมี

| สภาวะการทดลอง | ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น<br>(กรัมต่อลิตร) |      |      | ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
|---------------|---------------------------------------------------|------|------|-------------------------------------|
|               | ซ้ำ1                                              | ซ้ำ2 | ซ้ำ3 |                                     |
| 1             | 1.58                                              | 1.58 | 1.58 | 1.58 $\pm$ 0.00                     |
| 2             | 3.08                                              | 3.05 | 3.04 | 3.05 $\pm$ 0.01                     |
| 3             | 3.13                                              | 3.12 | 3.10 | 3.12 $\pm$ 0.01                     |
| 4             | 1.55                                              | 1.56 | 1.55 | 1.55 $\pm$ 0.01                     |
| 5             | 1.44                                              | 1.45 | 1.45 | 1.45 $\pm$ 0.01                     |
| 6             | 1.35                                              | 1.36 | 1.35 | 1.35 $\pm$ 0.01                     |
| 7             | 1.52                                              | 1.52 | 1.53 | 1.52 $\pm$ 0.01                     |
| 8             | 1.42                                              | 1.42 | 1.43 | 1.43 $\pm$ 0.00                     |
| ชุดควบคุม     | 1.28                                              | 1.29 | 1.28 | 1.28 $\pm$ 0.00                     |

ตารางผนวกที่ ข12 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจากการหมักก็ขึ้นอยู่กับกากตะกอนที่  
สถานะต่างๆ ตามแผนการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

| สถานะการทดลอง | ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น<br>(กรัมต่อลิตร) |      |      | ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
|---------------|---------------------------------------------------|------|------|-------------------------------------|
|               | ซ้ำ1                                              | ซ้ำ2 | ซ้ำ3 |                                     |
| 1             | 2.82                                              | 2.83 | 2.81 | 2.82 $\pm$ 0.01                     |
| 2             | 2.99                                              | 2.96 | 2.96 | 2.97 $\pm$ 0.01                     |
| 3             | 2.30                                              | 2.31 | 2.29 | 2.30 $\pm$ 0.01                     |
| 4             | 1.13                                              | 1.12 | 1.12 | 1.12 $\pm$ 0.00                     |
| 5             | 3.16                                              | 3.15 | 3.16 | 3.16 $\pm$ 0.01                     |
| 6             | 2.83                                              | 2.84 | 2.82 | 2.83 $\pm$ 0.01                     |
| 7             | 2.66                                              | 2.65 | 2.67 | 2.66 $\pm$ 0.01                     |
| 8             | 2.58                                              | 2.59 | 2.57 | 2.58 $\pm$ 0.01                     |
| 9             | 2.65                                              | 2.63 | 2.64 | 2.64 $\pm$ 0.01                     |
| 10            | 2.68                                              | 2.74 | 2.73 | 2.72 $\pm$ 0.03                     |
| 11            | 2.73                                              | 2.72 | 2.75 | 2.73 $\pm$ 0.01                     |
| 12            | 1.41                                              | 1.42 | 1.42 | 1.42 $\pm$ 0.00                     |
| 13            | 1.91                                              | 1.92 | 1.91 | 1.91 $\pm$ 0.00                     |
| 14            | 1.88                                              | 1.88 | 1.89 | 1.88 $\pm$ 0.01                     |
| 15            | 1.91                                              | 1.89 | 1.91 | 1.91 $\pm$ 0.01                     |
| 16            | 1.63                                              | 1.61 | 1.62 | 1.62 $\pm$ 0.01                     |
| ชุดควบคุม     | 1.54                                              | 1.55 | 1.55 | 1.55 $\pm$ 0.01                     |

**ตารางผนวกที่ ข13** ผลของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย ประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่สภาวะการทดลองที่ 4 6 และชุดควบคุม ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีแฟกต์เกิ้ลต์-เบอร์แมน

| สภาวะการทดลอง | ระยะเวลา | กรดอะซิติก | กรดโพรไพโอนิก | กรดบิวทิริก |
|---------------|----------|------------|---------------|-------------|
| 4             | 0        | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|               | 12       | 224.86     | 0.00          | 7.69        |
|               | 16       | 543.19     | 0.00          | 137.24      |
|               | 34       | 806.65     | 0.00          | 174.10      |
|               | 60       | 1,385.29   | 0.00          | 300.49      |
|               | 95       | 1,966.92   | 0.00          | 467.28      |
|               | 113      | 2,317.77   | 0.00          | 551.83      |
|               | 137      | 2,558.08   | 0.00          | 679.28      |
| 6             | 0        | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|               | 12       | 33.19      | 0.00          | 141.68      |
|               | 16       | 77.53      | 0.00          | 244.49      |
|               | 34       | 102.69     | 0.00          | 306.89      |
|               | 60       | 152.88     | 0.00          | 399.37      |
|               | 95       | 230.45     | 0.00          | 527.57      |
|               | 113      | 304.9      | 0.00          | 533.05      |
|               | 137      | 431.81     | 0.00          | 590.17      |
| ชุดควบคุม     | 0        | 0.12       | 0.00          | 0.00        |
|               | 12       | 177.04     | 55.43         | 63.53       |
|               | 16       | 177.04     | 55.43         | 63.53       |
|               | 34       | 332.23     | 73.68         | 110.66      |
|               | 60       | 332.34     | 83.46         | 134.55      |
|               | 95       | 332.46     | 93.24         | 152.61      |
|               | 113      | 332.46     | 93.24         | 152.61      |
|               | 137      | 332.46     | 93.24         | 152.61      |

**ตารางผนวกที่ ข14** ผลของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะการทดลองที่ 1 6 และชุดควบคุม ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทากูจิ

| สภาวะการทดลอง | ระยะเวลา | กรดอะซิติก | กรดโพรไพโอนิก | กรดบิวทิริก |
|---------------|----------|------------|---------------|-------------|
| 1             | 0        | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|               | 6        | 105.11     | 58.67         | 108.34      |
|               | 12       | 193.81     | 107.56        | 198.62      |
|               | 24       | 276.47     | 156.46        | 288.90      |
|               | 36       | 338.27     | 166.24        | 306.96      |
|               | 72       | 393.36     | 176.01        | 325.01      |
|               | 96       | 449.60     | 185.79        | 343.07      |
|               | 132      | 473.58     | 195.57        | 361.13      |
| 6             | 0        | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|               | 6        | 160.75     | 58.67         | 151.01      |
|               | 12       | 553.47     | 156.46        | 598.96      |
|               | 24       | 819.78     | 254.24        | 888.15      |
|               | 36       | 1,114.94   | 352.03        | 1,244.86    |
|               | 72       | 1,525.28   | 449.82        | 1,687.92    |
|               | 96       | 1,665.89   | 498.71        | 1,885.62    |
|               | 132      | 1,731.51   | 517.61        | 1,903.67    |
| ชุดควบคุม     | 0        | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|               | 6        | 162.24     | 33.87         | 55.88       |
|               | 12       | 162.24     | 33.87         | 55.88       |
|               | 24       | 351.99     | 61.06         | 96.12       |
|               | 36       | 374.92     | 70.84         | 119.51      |
|               | 72       | 374.92     | 70.84         | 119.51      |
|               | 96       | 374.92     | 70.84         | 119.51      |
|               | 132      | 374.92     | 70.84         | 119.51      |

**ตารางผนวกที่ ข15** ผลของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการหมักขี้เลื่อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำที่สภาวะการทดลองที่ 1 6 และชุดควบคุม ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทากูชิ

| สภาวะการทดลอง | ระยะเวลา (ชั่วโมง) | กรดอะซิติก | กรดโพรไพโอนิก | กรดบิวทิริก |
|---------------|--------------------|------------|---------------|-------------|
| 1             | 0                  | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|               | 12                 | 37.21      | 0.00          | 17.55       |
|               | 24                 | 20.53      | 0.00          | 17.55       |
|               | 48                 | 156.65     | 19.37         | 25.94       |
|               | 72                 | 323.80     | 27.01         | 25.94       |
|               | 96                 | 323.80     | 27.01         | 25.94       |
|               | 132                | 323.80     | 27.01         | 25.94       |
|               | 168                | 323.80     | 27.01         | 25.94       |
| 6             | 0                  | 0.00       | 0.00          | 0.90        |
|               | 12                 | 108.66     | 0.00          | 0.90        |
|               | 24                 | 184.74     | 0.00          | 0.90        |
|               | 48                 | 307.50     | 0.00          | 107.02      |
|               | 72                 | 545.29     | 0.00          | 472.16      |
|               | 96                 | 743.05     | 0.00          | 958.99      |
|               | 132                | 1,231.96   | 0.00          | 1,584.91    |
|               | 168                | 1,593.65   | 0.00          | 2,086.11    |
| ชุดควบคุม     | 0                  | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|               | 12                 | 90.56      | 0.00          | 7.49        |
|               | 24                 | 90.56      | 0.00          | 7.49        |
|               | 48                 | 306.68     | 5.31          | 16.67       |
|               | 72                 | 306.68     | 5.31          | 16.67       |
|               | 96                 | 306.68     | 5.31          | 16.67       |
|               | 132                | 306.68     | 5.31          | 16.67       |
|               | 168                | 306.68     | 5.31          | 16.67       |

**ตารางผนวกที่ ข16** ผลของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดโพรไพโอนิก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร จากการหมักที่เชื่อมร่วมกับกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างที่สภาวะต่างๆ ในชั่วโมงเริ่มต้นและชั่วโมงสุดท้าย ที่ออกแบบแผนการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

| ระยะเวลา (ชั่วโมง) | สภาวะการทดลอง | กรดอะซิติก | กรดโพรไพโอนิก | กรดบิวทิริก |
|--------------------|---------------|------------|---------------|-------------|
| 0                  | 1             | 1.10       | 0.00          | 0.00        |
|                    | 2             | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|                    | 3             | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|                    | 4             | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|                    | 5             | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|                    | 6             | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|                    | 7             | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|                    | 8             | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
|                    | หุ้ดควบคูลุม  | 0.00       | 0.00          | 0.00        |
| 168                | 1             | 0.00       | 0.00          | 243.77      |
|                    | 2             | 0.00       | 0.00          | 326.34      |
|                    | 3             | 99.05      | 0.00          | 452.58      |
|                    | 4             | 0.00       | 0.00          | 144.84      |
|                    | 5             | 96.96      | 0.00          | 175.15      |
|                    | 6             | 89.30      | 0.00          | 174.21      |
|                    | 7             | 79.51      | 0.00          | 170.78      |
|                    | 8             | 66.69      | 0.00          | 150.91      |
|                    | หุ้ดควบคูลุม  | 69.79      | 0.00          | 97.77       |

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

|                                |                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ-นามสกุล                   | นางสาวปัทมกร แก้วพงศธร                                                                                                                                                                                      |
| วัน เดือน ปี ที่เกิด           | 8 กุมภาพันธ์ 2531                                                                                                                                                                                           |
| สถานที่เกิด                    | จ.นครปฐม                                                                                                                                                                                                    |
| ประวัติการศึกษา                | วท.บ. วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม)<br>มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ                                                                                                                |
| ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน   | -                                                                                                                                                                                                           |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน           | -                                                                                                                                                                                                           |
| ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ | -                                                                                                                                                                                                           |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ           | งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนตามโครงการความร่วมมือในการผลิตนักวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยผ่านสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ |