



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การปรับปรุงคุณภาพก๊าซชีวภาพจากผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้งด้วยการผลิต
ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน

Improving of Biogas Quality from Dairy Waste by Hydrogen and Methane Production

นามผู้วิจัย นางสาวสุกานันท์ จันทน์ประอบ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์บังกษรัตน์ ปิตินต์, Ph.D)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จักรกฤษณ์ มหัจฉริยวงศ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงคุณภาพก๊าซชีวภาพจากผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้งด้วยการผลิต
ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน

Improving of Biogas Quality from Dairy Waste by Hydrogen and Methane Production

โดย

นางสาวสุกานันท์ จันทร์ประอบ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุกานันท์ จันท์ประอบ 2554: การปรับปรุงคุณภาพก๊าซชีวภาพจากผลิตภัณฑ์นมเหลือ
ทิ้งด้วยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
อาจารย์ปราโมทย์ ศิริโรจน์, D.Agr.Sci. 118 หน้า

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณภาพก๊าซชีวภาพด้วยการผลิตก๊าซไฮโดรเจน
ในขั้นตอนแรก จากผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้ง (หมดอายุ) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบสองขั้นตอน
(การหมักกรด และการหมักมีเทน) เมื่อศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการหมักขั้นตอนแรกด้วยแบคทีเรีย
Clostridium sp. พบปัญหาการสะสมของตะกอนโปรตีนจนเต็มถังหมัก จึงต้องแยกโปรตีนออก
จากน้ำนมก่อน โดยการผสมกับ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ความร้อน 95
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดการตกตะกอนโปรตีนขึ้นแยกเอาส่วนนี้ออกไป แล้วนำ
ของเหลวมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึง
และเซลล์อิสระของ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ของเหลวปริมาตร 145 มิลลิลิตร
และเซลล์ตรึงปริมาตร 35 มิลลิลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 3.81 โมลไฮโดรเจนต่อ
โมลน้ำตาลแล็กโทสต่อวัน และเมื่อนำของเหลวมาเลี้ยงเซลล์อิสระ ที่มีของเหลวปริมาตร 230
มิลลิลิตร และเติมเซลล์อิสระ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่า สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน
ปริมาณสูงสุด 4.67 โมลไฮโดรเจนต่อโมลน้ำตาลแล็กโทสต่อวัน แสดงว่าเซลล์อิสระสามารถผลิต
ก๊าซไฮโดรเจนได้มากกว่าเซลล์ตรึง เมื่อระยะเวลาการหมักเท่ากัน ส่วนที่สอง นำของเหลวซึ่ง
ผ่านหมักจากเซลล์ตรึงนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตก๊าซมีเทน (เนื่องจากมีปัญหาการแยก
แบคทีเรียออกจากของเหลวในระบบเซลล์อิสระ) ในสภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง พบว่า
ระยะเวลาเก็บกัก 67 วัน เหมาะสำหรับการผลิตก๊าซมีเทนมากที่สุด ซึ่งผลิตก๊าซมีเทนได้ 1,032.48
มิลลิลิตรต่อวัน มีประสิทธิภาพการกำจัด COD 87.64 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Supanun Junpra-ob 2011: Improving of Biogas Quality from Dairy Waste by Hydrogen and Methane Production. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Mr. Pramote Sirirote, D.Agr.Sci. 118 pages.

The objective of this research is to improve the biogas quality by increasing hydrogen production in the first phase of biogas fermentation from dairy waste (invalid milk) from two-stage anaerobic condition (acid phase and methane phase). The preliminary experiment of hydrogen production by *Clostridium* sp. was found a problem of high amount of protein curd was accumulated until full of fermenter volume. So, the protein was must separated out by mixing with $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 % in 95 °C for 15 minute and then the remained supernatant was used as raw material for hydrogen production. Hydrogen production was examined using immobilized cells and free cells of *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462. By immobilized cells system, a maximum hydrogen production was 3.81 mol H_2 /mol of lactose/day from using 145 ml of whey and 35 ml of immobilized cells. In the case of free cells system, a maximum hydrogen production was 4.67 mol H_2 /mol lactose/day from using 230 ml of whey and 10 percent by volume of inoculums. It's shown that free cells system produce hydrogen gas higher than immobilized cells system under the same incubation period. In the methane phase, effluent from the first phase of immobilized cells system was utilized to produce methane (because of the problem from cells separation of free cells system). The methane stage was operated in semi-continuous fermenter under a hydraulic retention time of 67 days which was a optimum time. It produced 1032.48 CH_4 /day and removed 87.64 % of total COD from the influent.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
รศ. ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล และ รศ.ดร.พัฒนา อนุรักษ์พงษธร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จ
สมบูรณ์ ขอขอบคุณ รศ.ดร.คุณณี ฐนะบริพัฒน์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ รศ.ดร.จรรยา ดุษฎีเมศวร์
ประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้
สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็น
ประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ
ภาควิชาจุลชีววิทยา เจ้าหน้าที่ภาควิชาภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ภาควิชา
จุลชีววิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย

ประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้ช่วยเหลือและให้
กำลังใจผู้วิจัยตลอดมาในทุกเรื่อง

สุกานันท์ จันทร์ประอบ

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	34
ผลและวิจารณ์	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	75
สรุป	75
ข้อเสนอแนะ	76
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	77
ภาคผนวก	87
ภาคผนวก ก สารเคมีและวิธีวิเคราะห์	88
ภาคผนวก ข ข้อมูลจากการทดลอง	115
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	118

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณลักษณะของนมชนิดต่างๆ จากโรงเรียนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	5
2	ส่วนประกอบต่างๆ ของไมเซลล์เคซีน	7
3	ชนิดและปริมาณโปรตีนที่พบในน้ำนมวัว	9
4	ปริมาณไขมันชนิดต่างในนม	10
5	ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ในนม	11
6	อุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนบางชนิดเกิดการเสียสภาพธรรมชาติเมื่อได้รับความร้อน	12
7	จุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนบางชนิด	13
8	EC number และชื่อของเอนไซม์ในภาพที่ 2	16
9	ชื่อย่อและชื่อเต็มของสารเคมีในภาพที่ 2	17
10	ปฏิกิริยาต่างๆ ในภาพที่ 2	19
11	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน	29
12	ระยะเวลาในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน	38
13	ระยะเวลาในการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทน	41
14	ปริมาณก๊าซชีวภาพและค่า pH ของการหมักน้ำนม UHT ด้วย <i>Clostridium</i> sp. ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	46
15	ปริมาณก๊าซชีวภาพจากการหมักน้ำนม UHT ความเข้มข้น 100 50 30 และ 10 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่าง ๆ	50
16	ปริมาณโปรตีนที่ลดลงและค่า pH ของน้ำนม UHT ที่ผ่านการหมักเมื่อน้ำนม UHT มีความเข้มข้นต่างๆ	50
17	ปริมาณแกล็กโทสและโปรตีนจากนมที่ผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	53
18	ปริมาณการใช้แกล็กโทส ปริมาณไฮโดรเจน และผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกตะกอนและไม่ปั่นแยกตะกอน	63
19	ปริมาณการใช้แกล็กโทสและการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
20	ค่า COD และปริมาณการกำจัด COD ที่ระยะเวลาเก็บกักต่าง ๆ	68
21	ปริมาณก๊าซชีวภาพและปริมาณก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกักต่าง ๆ	72
ตารางผนวกที่		
ก1	ช่วงของค่า BOD ที่วัดได้ตามค่าเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างของการเจือจาง	94
ก2	ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่าง ๆ ของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย	100
ก3	ปริมาตรของสารละลายต่าง ๆ ในการทดสอบ	109
ก4	การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน	111
ข1	การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณแกล็กโทสจากของเหลวซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ student's t-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)	116
ข2	การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนจากของเหลวซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ student's t-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)	116
ข3	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนจากของเหลวซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลอง 4 ซ้ำ ด้วยวิธี Tukey's test	117

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การสร้างเคซีนเชิงซ้อนและไมเซลล์เคซีน	7
2	pathways ของ <i>Clostridium acetobutylicum</i>	15
3	ลักษณะโมเลกุลของอัลจินต	23
4	โมเดลกล่องไข่ (egg box model) สำหรับ Ca^{2+} ซึ่งเหนี่ยวนำปฏิกิริยา dimerization ของ poly-L-gulonate	24
5	วิธีหลักการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจนและจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นตอน	27
6	ขั้นตอนการหดยเซลล์เป็ยซึ่งผสมกับโซเดียมอัลจินตและน้ำกลั่น ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์	36
7	ลักษณะของเม็ดเจลซึ่งลอยขึ้นมาริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ	37
8	แผนภาพของถังหมักสำหรับผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึง	39
9	ถังหมักสำหรับผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึง	39
10	แผนภาพของถังหมักสำหรับผลิตก๊าซมีเทน	41
11	ถังหมักสำหรับผลิตก๊าซมีเทน	42
12	ปริมาณก๊าซชีวภาพและค่า pH ของการหมักนํ้านม UHT ด้วย <i>Clostridium</i> sp. ที่ระยะเวลาต่าง ๆ	44
13	ลักษณะการเกิดตะกอนของนม UHT	45
14	ปริมาณก๊าซชีวภาพจากการหมักนํ้านม UHT ความเข้มข้น 100 50 30 และ 10 เปอร์เซ็นต์	49
15	ลักษณะการเกิดตะกอนของนํ้านม UHT ความเข้มข้นต่างๆ	51
16	ปริมาณเล็กโทสและโปรตีนของนํ้านมซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	54
17	ปริมาณแคลเซียมในนมที่ผ่านการตกตะกอนและนมพาสเจอร์ไรส์	55
18	ปริมาณก๊าซชีวภาพจากการหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์	56
19	ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ประสิทธิภาพการกำจัด COD เมื่อหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์	58
21	ปริมาณการใช้แกล็กโทสเมื่อหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์	59
22	ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์	61
23	ค่า pH ของการหมักด้วยเซลล์อิสระที่เวลาต่าง ๆ	63
24	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของการหมักด้วยเซลล์อิสระที่เวลาต่าง ๆ	64
25	ค่า pH ของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน	67
26	ประสิทธิภาพการกำจัด COD ของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน	69
27	ปริมาณของแข็งทั้งหมดของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน	70
28	ปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมดของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน	71
29	ปริมาณก๊าซชีวภาพของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน	72

การปรับปรุงคุณภาพก๊าซชีวภาพจากผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้งด้วยการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซมีเทน

Improving of Biogas Quality from Dairy Waste by Hydrogen and Methane Production

คำนำ

ในปัจจุบันกิจการอุตสาหกรรมในประเทศไทยมีการใช้น้ำประมาณ 2 พันล้านลูกบาศก์เมตรต่อปี และมีโรงงานที่อาจก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำจำนวนมากขึ้นทุกปี ซึ่งทั้งนี้พบว่าโรงงานอุตสาหกรรมที่ก่อให้เกิดน้ำเสียในระดับรุนแรงนั้น ส่วนใหญ่แล้วเป็นอุตสาหกรรมการเกษตร อันได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์ทางเกษตรกรรม เป็นต้น เนื่องจากประชากรภายในประเทศมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงส่งผลให้อุตสาหกรรมอาหารมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วตามไปด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นม ในช่วง พ.ศ. 2545-2546 มีปริมาณการผลิตน้ำนมดิบเพิ่มจาก 662,233.62 ตัน เป็น 731,922.96 ตัน ซึ่งน้ำนมมี BOD อยู่ในช่วง 92,250-123,750 mg/L และ COD 204,000-162,000 mg/L ดังนั้น น้ำเสียที่เกิดจากนมและผลิตภัณฑ์นมจึงมีความสกปรกสูง หากปล่อยน้ำทิ้งจากนมและผลิตภัณฑ์นมลงสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติจะส่งผลให้แหล่งน้ำนั้นเกิดการเน่าเสีย จึงควรบำบัดน้ำทิ้งจากนมและผลิตภัณฑ์นมก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ แต่การบำบัดน้ำเสียก่อให้เกิดค่าใช้จ่ายต่อโรงงานอุตสาหกรรม การนำเทคโนโลยีที่สามารถลดค่าใช้จ่ายให้ต่ำลง และวิธีการอื่นที่สามารถใช้ประโยชน์จากน้ำเสียจึงได้รับความสนใจอย่างมาก เทคโนโลยีการผลิตก๊าซชีวภาพเป็นวิธีการที่ได้รับความสนใจและนำมาประยุกต์ใช้ร่วมในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้นี้ มีองค์ประกอบหลักคือ ก๊าซมีเทน (methane) ซึ่งสามารถคิดไฟได้ ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ ช่วยลดค่าใช้จ่ายด้านพลังงานและเป็นการบำบัดน้ำเสียของโรงงาน

นอกจากนี้ถ้าผลิตก๊าซมีเทนได้ในปริมาณสูงยังสามารถนำมาใช้ในส่วนอื่น เช่น การคมนาคมและขนส่ง ซึ่งประเทศไทยมีการใช้พลังงานในภาคคมนาคมและขนส่งสูงที่สุด โดยมากกว่าร้อยละ 90 ของพลังงานที่ใช้ในภาคคมนาคมและขนส่งนี้ได้มาจากการนำเข้า ดังนั้น ถ้านำก๊าซมีเทนมาใช้ในภาคคมนาคมและขนส่งก็จะช่วยลดการนำเข้าได้

เนื่องจากเทคโนโลยีการผลิตก๊าซชีวภาพส่วนใหญ่สามารถผลิตก๊าซชีวภาพซึ่งมีก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้น ถ้าสามารถปรับปรุงคุณภาพก๊าซชีวภาพเพื่อให้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนจากน้ำเสียในอุตสาหกรรมได้ จะเป็นการเพิ่มประโยชน์ที่ได้จากการบำบัดน้ำเสีย โดยได้ก๊าซที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงถึง 2 ชนิด และก๊าซไฮโดรเจนยังเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาดซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนจะกลายเป็นไอน้ำซึ่งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และก๊าซไฮโดรเจนยังสามารถนำมาผลิตกระแสไฟฟ้าโดยผ่านเซลล์เชื้อเพลิงได้อีกด้วย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้งมาผ่านกระบวนการหมักภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและมีเทน ซึ่งเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำเสียที่มีปริมาณความเข้มข้นของนมสูงต่อไป เนื่องจากกระบวนการย่อยภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนต้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์หลัก ๆ 3 กลุ่ม ได้แก่ Fermentative bacteria Acetogenic bacteria และ Methanogenic bacteria ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่ม Acetogenic bacteria บางชนิดสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ แต่เมื่อ Acetogenic bacteria และ Methanogenic bacteria เจริญผสมกันในการหมักภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบขั้นตอนเดียวจะเกิดก๊าซไฮโดรเจนน้อย เพราะ Methanogenic bacteria จะนำก๊าซไฮโดรเจนไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซมีเทน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงนำผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้งมาผ่านกระบวนการหมักภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบสองขั้นตอน (two - stage anaerobic digestion) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นก๊าซไฮโดรเจนและมีเทน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการใช้นมเหลือทิ้งเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและมีเทน
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซมีเทนภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

การตรวจเอกสาร

1. องค์ประกอบของน้ำนม

น้ำนมประกอบด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันเนื่องจากปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ชนิดของสัตว์ พันธุ์ คุณลักษณะเฉพาะตัวของสัตว์ ระยะการให้นม ช่วงเวลาในการรีดนม ฤดูกาล อาหาร อุณหภูมิของสภาพแวดล้อม โรคของแม่วัว และปัจจัยอื่น ๆ แม้ว่าน้ำนมจากวัวจะมีองค์ประกอบแตกต่างกันไป เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ จึงไม่มีปริมาณขององค์ประกอบในน้ำนมซึ่งเป็นค่าที่แน่นอน เราจึงควรทราบปริมาณและองค์ประกอบต่าง ๆ โดยประมาณไว้เนื่องจากในอุตสาหกรรมนั้นได้นำน้ำนมมาจากหลายฟาร์ม ดังนั้นข้อแตกต่างเหล่านี้จะเฉลี่ยกันไป ทำให้องค์ประกอบที่ได้ไม่แตกต่างกันมากเกินไป นั่นคือ น้ำนมประกอบด้วยน้ำ 87.1 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 3.9 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 3.3 เปอร์เซ็นต์ แล็กโทส 5.0 เปอร์เซ็นต์ และเกลือแร่ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2552) ตารางที่ 1 แสดงคุณลักษณะของน้ำนมชนิดต่างๆ จากโรงนมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 โปรตีน (ชนิดและปริมาณโปรตีนที่พบในน้ำนมวัวแสดงในตารางที่ 3)

โปรตีนในน้ำนมแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

1.1.1 เคซีน (casein) เป็นโปรตีนหลักและมีมากที่สุดในนม สามารถแยกออกมาได้จากการตกตะกอนนมโดยการเติมกรดจน pH ของนมเป็น 4.6-4.7 เคซีนในนมมีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดและปริมาณนี้แตกต่างกันไปแล้วแต่สายพันธุ์ของสัตว์ เคซีนประกอบด้วยโปรตีนย่อยๆ (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2552) ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันดังนี้

ก. α_{s1} -casein ประกอบด้วยสายโซ่เปปไทด์ซึ่งมีส่วนที่มีประจุจากกลุ่มคาร์บอกซิลและส่วนที่ไม่มีประจุ เมื่อมีแคลเซียมไอออนในปริมาณที่พบในน้ำนม α_{s1} -casein สามารถทำให้เกิดเกลือแคลเซียมได้

ตารางที่ 1 คุณลักษณะของน้ำนมชนิดต่าง ๆ จากโรงนมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คุณลักษณะ	น้ำนม			
	(1)	(2)	(3)	(4)
BOD (5 day, mg/l)	92,250	123,750	105,000	118,125
Total COD (mg/l)	162,000	204,000	184,000	176,000
BOD:COD	0.69	0.61	0.57	0.67
Total Suspended Solid (mg/l)	111,340	156,640	174,540	134,560
Dissolves Solid (mg/l)	55,340	102,240	149,740	83,760
Suspended Solid (mg/l)	56,000	54,400	24,800	50,800
TKN (mg/l)	4,602	4,392	1,952	4,072
Total Phosphorus	570	881	530	450
Fat, Oil and Grease (mg/l)	30,450	25,400	9,750	22,700
pH	8.42	4.30	3.88	4.24

หมายเหตุ (1) นมสด 100 เปอร์เซ็นต์

(2) นมปรุงแต่งรสหวาน

(3) นมเปรี้ยว

(4) นมผสมของ 1 2 และ 3 ในอัตราส่วน 1:1:1

ที่มา: อูษากร (2535)

ข. α_{s2} -casein ประกอบด้วยสายโซ่เปปไทด์ซึ่งมีไอออนบวกบริเวณปลายเอ็น (N-terminus) และไอออนลบบริเวณปลายซี (C-terminus) α_{s2} -casein สามารถตกตะกอนด้วยไอออนของแคลเซียมได้ง่ายกว่า α_{s1} -casein

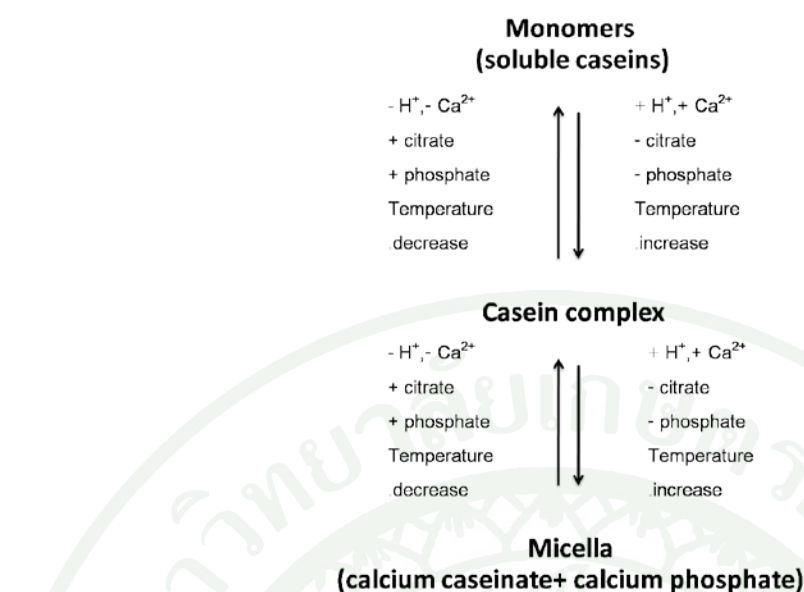
ค. บีตา-เคซีน (β -casein) โครงสร้างของโมเลกุลประกอบด้วยส่วนหัวที่มีขั้ว และส่วนหางที่ไม่มีขั้วคล้ายกับโมเลกุลของสบู่ การรวมตัวกันของบีตา-เคซีนเป็นปฏิกิริยาอุณหภูมิร้อน คล้ายกับ α_{s1} -casein บีตา-เคซีนสามารถตกตะกอนเมื่อมีแคลเซียมไอออนในปริมาณที่พบในน้ำนม

ง. แคลป้า-เคซีน (K-caseins) เป็นเคซีนที่ยังคงละลายอยู่เมื่อมีแคลเซียมไอออนในปริมาณที่พบในน้ำนม โดยการรวมของ α_{s1} -casein และ บีตา-เคซีน กับแคลป้า-เคซีนสามารถป้องกันการตกตะกอนเมื่อมีแคลเซียมไอออนได้ โดยคุณสมบัติของแคลป้า-เคซีนนี้มีความสำคัญต่อการสร้างและการรักษาเสถียรภาพของเคซีนเชิงซ้อนและเกิดเป็นไมเซลล์เคซีน (casein micelle) ในน้ำนม Chymosin (rennet) สามารถตัดโซ่เปปไทด์ของแคลป้า-เคซีนเกิดเปปไทด์สองส่วน คือ พารา-แคลป้า-เคซีน (para-K-casein) และ glycopeptide ซึ่ง glycopeptide สามารถละลายในนมได้ ในขณะที่พารา-แคลป้า-เคซีนจะตกตะกอนเมื่อมีแคลเซียมไอออน เมื่อแคลป้า-เคซีนสูญเสียการป้องกันจะส่งผลให้เคซีนเชิงซ้อนและไมเซลล์เคซีนจับตัวเป็นก้อน (การสร้าง curd) นอกจากนี้ถ้าแคลป้า-เคซีนมีคาร์โบไฮเดรตจะส่งผลให้แอลฟาและแคลป้า-เคซีนมีความเสถียรขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออน

จ. แกมมาเคซีน (γ -casein) เป็นผลิตภัณฑ์จากการแตกตัวของบีตาเคซีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (protease)

เคซีนมีอัตราส่วนโดยโมลเป็น α_{s1} ต่อเบต้าซึ่งรวมกับแกมมาต่อแคลป้าต่อ α_{s2} เฉลี่ย 8 ต่อ 8 ต่อ 3 ต่อ 2 เคซีนทุกชนิดมีกรด phosphoric เป็นส่วนประกอบ (Belitz *et al.*, 2004)

เคซีนแขวนลอยอยู่ในนมด้วยลักษณะที่เป็นคอลลอยด์ (colloid) ซึ่งเรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) (สิวลี, 2537) โดยเคซีนส่วนใหญ่จะรวมเป็นเคซีนเชิงซ้อนและไมเซลล์เคซีน ซึ่งการรวมกันนี้จะกำหนดโดยปัจจัยต่างๆ ดังภาพที่ 1 ซึ่งพบว่าเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนสูงขึ้นไมเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนประกอบต่างๆ ของไมเซลล์แสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 1 การสร้างเคซีนเชิงซ้อนและไมเซลล์เคซีน

ที่มา: Belitz *et al.* (2004)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของไมเซลล์เคซีน

ส่วนประกอบ	ปริมาณในไมเซลล์เคซีน (%)
casein	93.2
Ca	2.9
Mg	0.1
Na	0.1
K	0.3
phosphate (สารอินทรีย์)	2.3
phosphate (สารอนินทรีย์)	2.9
citrate	0.4

ที่มา: Belitz *et al.* (2004)

1.1.2 โปรตีนเวย์ (whey protein) เมื่อตกตะกอนเคซีนออกจากนมแล้ว น้ำเหลวๆ ที่เหลือประกอบด้วยโปรตีนอีกหลายชนิดซึ่งละลายอยู่ ที่สำคัญ (สิวลี, 2537) ได้แก่

ก. β -lactoglobulin สามารถเกิดการเสียสภาพด้วยความร้อน การเสียสภาพเมื่อมีแคลเซียมไอออนปริมาณสูง และ pH สูงกว่า 8.6 เป็นการเสียสภาพที่ไม่สามารถเปลี่ยนกลับมาเหมือนเดิมได้ (Belitz *et al.*, 2004) β -lactoglobulin ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในสารละลายเกลือเจือจาง (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2552)

ข. α -lactalbumin เป็นหน่วยย่อยบี (subunit B) ของเอนไซม์ lactose synthetase (Belitz *et al.*, 2004) α -lactalbumin มีปริมาณมากรองลงมาจากเคซีนเป็นโปรตีนที่ตกตะกอนได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน ดังนั้นการให้ความร้อนแก่น้ำนมอาจทำให้โปรตีนนี้ตกตะกอนออกมาบ้าง เราสามารถแยกโปรตีนนี้ออกมาได้โดยการตกตะกอนด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต

1.2 ไขมัน

ไขมันจะอยู่ในรูปเม็ดไขมัน มีขนาดเล็กมาก ผนังหรือผิวของเม็ดไขมันประกอบไปด้วยโปรตีนและสารพวกฟอสโฟลิพิดยึดแน่นที่ผิว ทำให้เม็ดไขมันแต่ละอันไม่รวมตัวกันกลายเป็นกลุ่มไขมันหรือชั้นของครีมขึ้น ไขมันในน้ำนมประกอบด้วย กลีเซอรอล (glycerol) ประมาณ 12.5 เปอร์เซ็นต์ และกรดไขมัน 85.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ซึ่งทั้งสองอย่างนี้จะรวมตัวกันเป็นไตรกลีเซอไรด์เกิดเป็นไขมันขึ้น กรดไขมันในน้ำมนั้นมีหลายชนิดทั้งกรดไขมันชนิดอิ่มตัว เช่น กรดบิวทีริก (butyric) ซึ่งพบในไขมันนมเท่านั้น อีกชนิดคือ กรดไขมันไม่อิ่มตัว และยังมีกรดไขมันอิสระอีกเล็กน้อยในน้ำนม

นอกจากนี้ไขมันนมยังมีสารบางอย่างที่มีปริมาณน้อย เช่น ฟอสโฟลิพิด (ได้แก่ เลซิทีน cephalin และ sphingomyelin) สเตอรอล (ได้แก่ คอเลสเตอรอล และ lanosterol) วิตามินที่ละลายในไขมัน (ได้แก่ วิตามินเอ ดี อี เค และแคโรทีนอยด์) (คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2552)

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณโปรตีนที่พบในน้ำนมวัว

Fraction	Portion ^a	Molecular weight ^b (kda)
Caseins	80	-
α_{s1} -casein	34	23.6 ^c
α_{s2} -casein	8	25.2 ^f
K-casein	9	19 ^g
β -casein	25	24
γ -casein	4	12-21
γ_1 - casein		20.5
γ_2 - casein		11.8
γ_3 - casein		11.6
Whey proteins	20	-
β -lactoglobulin	9	18.3
α -lactalbumin	4	14.2
Serum albumin	1	66.3
Immunoglobulin	2	
IgG1		162
IgG2		152
IgA		400 ^c
IgM		950 ^d
FSC(s) ^h		80
Proteose-Peptide	4	4-41

หมายเหตุ ^a As % of skim milk total protein, ^b monomer, ^c dimer, ^d pentamer, ^e Genetic variant B, ^f Genetic variant A, ^g Genetic variant A², ^h Free secretory component

ที่มา: Belitz *et al.* (2004)

ตารางที่ 4 ปริมาณไขมันชนิดต่างๆ ในน้ำมัน

Lipid fraction	Percent of the total lipid
Triacylglycerols	95-96
Diacylglycerols	1.3-1.6
Monoacylglycerols	0.02-0.04
Keto acid glycerides	0.9-1.3
Hydroxy acid glycerides	0.6-0.8
Free fatty acid	0.1-0.4
Phospholipid	0.8-1.0
Sphingolipid	0.06
Sterols	0.2-0.4

ที่มา: Belitz *et al.* (2004)

1.3 คาร์โบไฮเดรต

แล็กโทส (O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopyranose) เป็นน้ำตาลชนิดหลักในนม ซึ่งมีปริมาณ 4-6 เปอร์เซ็นต์ ของนม รูปแบบที่คงตัวที่สุดคือ α -lactose monohydrate (C₁₂H₂₂O₁₁·H₂O) การตกผลึกของสารละลายในน้ำที่อุณหภูมิสูงกว่า 93.5 องศาเซลเซียส จะทำให้น้ำมี β -lactose อิสระ (β -anhydride) เกิดขึ้น แล็กโทสเป็นน้ำตาลที่ละลายในน้ำได้ไม่ดี

นอกจากนี้ในน้ำมันยังมีคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ อีกแต่มีปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลของกรดอะมิโนบางชนิด และ oligosaccharide ในผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านการให้ความร้อนพบ lactulose ซึ่งมีความหวานน้อยและละลายน้ำมากกว่าแล็กโทส เช่น นมข้นมี lactulose 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังพบ epilactose ปริมาณเล็กน้อยซึ่งเกิดขึ้นในน้ำมันที่ผ่านการให้ความร้อน

1.4 กรดอินทรีย์และแร่ธาตุ

กรด citric เป็นกรดอินทรีย์ที่พบมากในน้ำนม คือ 1.8 กรัมต่อลิตร แต่ในระหว่างการเก็บรักษากรด citric จะหายไปเนื่องจากกิจกรรมของแบคทีเรีย กรดอื่นๆ เช่น กรด lactic และ กรด acetic เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายแล็กโทส กรด orotic (73 mg/L) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวกลางในการสังเคราะห์ของ pyrimidine nucleotides ส่วนปริมาณแร่ธาตุต่างๆ แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ในน้ำนม

แร่ธาตุ	ปริมาณ
Potassium	1,500 mg/l
Calcium	1,200 mg/L
Sodium	500 mg/ L
Magnesium	120 mg/ L
Phosphate	3,000 mg/ L
Chloride	1,000 mg/ L
Sulfate	100 mg/ L
Zinc	4,000 µg/ L
Aluminum	500 µg/ L
Iron	400 µg/ L
Copper	120 µg/ L
Molybdenum	60 µg/ L
Manganese	30 µg/ L
Nickel	25 µg/ L
Silicon	1,500 µg/ L
Bromine	1,000 µg/ L
Boron	200 µg/ L
Fluorine	150 µg/ L
Iodine	60 µg/ L

ที่มา: Belitz *et al.* (2004)

2. การเสีสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การเสีสภาพธรรมชาติของโปรตีนเกิดขึ้นได้ในสภาวะต่างๆ กัน ได้แก่

2.1 ความร้อน โปรตีนหลายชนิดเมื่อได้รับความร้อนจะเสีสภาพธรรมชาติและแข็งตัวกลายเป็นเจล (เกิด coagulation) โดยอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนบางชนิดเกิดการเสีสภาพธรรมชาติเมื่อได้รับความร้อน แสดงในตารางที่ 6 (นิธิยา, 2551)

ตารางที่ 6 อุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนบางชนิดเกิดการเสีสภาพธรรมชาติเมื่อได้รับความร้อน

โปรตีน	อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสีสภาพธรรมชาติ (องศาเซลเซียส)
แอลบูมิน (นํานมวัว)	72
β -lactoglobulin (นํานมวัว)	70-75
เคซีน (นํานมวัว)	160-200

ที่มา: นิธิยา (2551)

อุณหภูมิและ pH มีผลอย่างมากต่อการเสีสภาพของเคซีน และเป็นสาเหตุที่ทำให้ไมเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยอุณหภูมิที่ทำให้หางนมเกิดการเสีสภาพธรรมชาติลดลง เมื่อ pH ลดลง ความเข้มข้นของเกลือที่ใส่เข้าไปก็ส่งผลถึงความคงทนต่อความร้อนของนํานมด้วย ซึ่งความคงตัวของนํานมที่ได้รับความร้อนจะลดลงเมื่อมีแคลเซียมอิสระเพิ่มขึ้น (Belitz *et al.*, 2004)

2.2 ความเป็นกรดด่าง โปรตีนจะละลายได้น้อยลงและตกตะกอนเมื่อปรับ pH ของสารละลายไปที่จุดไอโซอิเล็กทริก (pI) ของโปรตีน ซึ่งเป็น pH ของโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ โดยโปรตีนต่างชนิดกันมีจุดไอโซอิเล็กทริกต่างกัน ดังตารางที่ 7

2.3 เกลือ เกลือที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้นสูง เนื่องจากไอออนของสารละลายเกลือดึงโมเลกุลของน้ำออกจากโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนจับตัวกันเองมากขึ้นและการละลายน้ำน้อยลง (รังสิณี, 2553)

ตารางที่ 7 จุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนบางชนิด

ชนิดของโปรตีน	จุดไอโซอิเล็กทริก (pI)
เคซีนในน้ำนม	4.6
lactoglobulin ในน้ำนม	4.5-5.5

ที่มา: รังสิณี (2553)

2.4 เอนไซม์เรนิน เป็นเอนไซม์ที่ใช้เค็มลงในน้ำนมจะทำให้โปรตีนในน้ำนมเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อน (นิธิยา, 2551)

3. *Clostridium acetobutylicum*

C. acetobutylicum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.6-0.9 x 2.4-4.7 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์ สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ มีตำแหน่งของเอนโดสปอร์ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง ไม่มีเอกโซสปอร์เรียม ไม่มีระยะยักผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลมขอบไม่เรียบ เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร โคโลนีเป็นสีครีม ผิวเป็นมันและโปร่งแสง เจริญได้ดีในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ด้วย สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนเท่านั้น (obligate anaerobe) ไม่สร้างเอนไซม์อะมัยเลส สามารถตรึงไนโตรเจนได้บ้าง เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แหล่งที่พบทั่วไปในดิน และ % G+C เท่ากับ 28-29 (Buchanan and Gibbons, 1974)

3.1 เมแทบอลิซึมของ *Clostridium acetobutylicum*

Clostridia ทุกชนิดสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ (Kotze, 1969) ซึ่งการหมักโดย *C. acetobutylicum* มีสองระยะที่แตกต่างกัน คือ ระยะแรก เรียกว่า ระยะ acidogenic (Rao and Murtharasan, 1987) มีลักษณะการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สามารถผลิตไฮโดรเจนสูงพร้อมกับการผลิตกรด acetic และกรด butyric (Girbal and Soucaille, 1994) ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้ pH ลดลงและทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์สำหรับการผลิตตัวทำละลายในระยะที่สอง (Ballongue *et al.*, 1985) ระยะที่สอง เรียกว่า ระยะ solventogenic (Rao and Murtharasan, 1987)

มีการเจริญเติบโตช้ากว่าระยะแรกและผลิตไฮโดรเจนได้น้อย แต่มีการผลิตตัวทำละลายเกิดขึ้น (Girbal and Soucaille, 1994) โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายส่วนใหญ่เป็นบิวทานอล ส่วนอะซิโตนและเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์รอง (Taha *et al.*, 1973; Zeid *et al.*, 1976; Compere and Griffith, 1979) คลอสทริเดียมจะเข้าสู่ระยะการผลิตรhod หรือตัวทำละลายขึ้นอยู่กักระดับ ATP และ NADH (Girbal and Soucaille, 1994) เมื่อคลอสทริเดียมผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นส่วนใหญ่ จะพบ [FeFe]-hydrogenase เพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า (King *et al.*, 2006; Demuez *et al.*, 2007)

เมื่อเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof-Parnas น้ำตาล hexose จะถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate (Rogers, 1986) ซึ่งการดูดซึม hexose 1 โมล จะผลิต pyruvate 2 โมล ATP 2 โมล และ NADH 2 โมล (Doelle, 1975; Thauer *et al.*, 1977; Gottschalk, 1986) นอกจาก hexose แล้ว clostridia ยังสามารถเมแทบอลิซึมน้ำตาล pentose ผ่านวิถี pentose phosphate (Cynkin and Delwiche, 1958; Ounine *et al.*, 1983) สารตัวกลางจะถูกเปลี่ยนโดย transaldolase และ transketolase ไปเป็น fructose-6-phosphate และ glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่วิถีไกลโคไลติก (glycolytic) ซึ่งการเปลี่ยนเพนโตส 3 โมล เป็น pyruvate จะผลิต ATP 5 โมล และ NADH 5 โมล (Rogers, 1986)

Pyruvate เปลี่ยนเป็น acetyl Co A โดย pyruvate ferredoxin oxidoreductase (Hallenbeck and Benemann, 2002) หลังจากนั้น acetyl Co A เปลี่ยนเป็น acetyl phosphate มีการสร้าง ATP และปลดปล่อย acetate ปฏิกริยา oxidation ของ pyruvate เพื่อเปลี่ยนเป็น acetyl Co A ต้องการปฏิกริยา reduction ของ ferredoxin (Fd) โดย pyruvate ferredoxin oxidoreductase ซึ่ง pyruvate ferredoxin oxidoreductase ถูกออกซิไดซ์ โดย hydrogenase ทำให้เกิด Fd ที่ถูกออกซิไดซ์ และก๊าซไฮโดรเจน (Nath and Das, 2004) ดังภาพที่ 2 ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตจาก NADH โดย NADH เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการ glycolysis (Vardar-Schara *et al.*, 2007) NADH ถูกออกซิไดซ์โดยปฏิกริยา reduction ของ Fd และ NADH-ferredoxin reductase แต่ความดันย่อยของไฮโดรเจนที่ได้ต่ำมาก (< 60 Pa) (Vardar-Schara *et al.*, 2007; Mandal *et al.*, 2006) ผลผลิตไฮโดรเจนตามทฤษฎีสูงสุด คือ ไฮโดรเจน 4 โมลต่อ กลูโคส 1 โมล เมื่อ acetate เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมัก (Levin *et al.*, 2004) การหมัก butyrate ให้ผลผลิตไฮโดรเจน 2 โมล ต่อ กลูโคส 1 โมล ผลผลิตที่ต่ำเชื่อมโยงกับ propionate และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ถูกรีดิวซ์เช่น แอลกอฮอล์ และกรดแลคติก (Levin *et al.*, 2004; Vardar-Schara *et al.*, 2007)

ตารางที่ 8 EC number และชื่อของเอนไซม์ในภาพที่ 2

EC number	Name
2.7.1.69	Phosphotransferase system
5.3.1.9	Glucose-6-phosphate isomerase
2.7.1.11	6-Phosphofructokinase
1.2.1.12	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
2.7.1.40	Pyruvate kinase
1.2.7.1	Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase
2.3.1.9	Thiolase
1.1.1.35	β -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (NADH-linked)
1.1.1.157	β -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (NADPH-linked)
4.2.1.17	Crotonase (enoyl-CoA hydratase)
1.3.99.2	Butyryl-CoA dehydrogenase
1.1.1.27	Lactate dehydrogenase
1.18.1.2	Ferredoxin-NADP reductase NADPH-ferredoxin oxidoreductase
1.181.3	Ferredoxin-NAD reductase NADH-ferredoxin oxidoreductase
1.12.7.2	Ferredoxin hydrogenase (hydrogenase)
2.3.1.8	Phosphotransacetylase (phosphate acetyltransferase)
2.7.2.1	Acetate kinase
1.2.1.10	Acetaldehyde dehydrogenase
1.1.1.1	Ethanol dehydrogenase (NADH-linked)
1.1.1.2	Ethanol dehydrogenase (NADPH-linked)
2.8.3.8	Acetoacetyl-CoA: acetate: CoA-transferase
2.8.3.9	Acetoacetyl-CoA: butyrate: CoA-transferase
4.1.1.4	Acetoacetate decarboxylase
2.3.1.19	Phosphotransbutyrylase (phosphate butyryltransferase)
2.7.2.7	Butyrate kinase
1.2.1.57	Butyraldehyde dehydrogenase
1.1.1	Butanol dehydrogenase

ที่มา: Gheshlaghi *et al.* (2009)

ตารางที่ 9 ชื่อย่อและชื่อเต็มของสารเคมีในภาพที่ 2

ชื่อย่อของสารเคมี	ชื่อเต็มของสารเคมี
Ac	Acetate
AcAc	Acetoacetate
AcAcCoA	Acetoacetyl-CoA
Acal	Acetaldehyde
AcCoA	Acetyl-CoA
Acon	Acetone
AcP	Acetyl phosphate
ADP	Adenosine-5-diphosphate
AMP	Adenosine-5-monophosphate
ATP	Adenosine-5-triphosphate
Bual	Butyraldehyde
BurlCoA	Butyryl-CoA; Butanoyl-CoA
BurlP	Butyryl phosphate; Butanoyl phosphate
BuOH	Butanol
But	Butyrate
CO ₂	Carbon dioxide
CoA	Coenzyme-A
CrI CoA	Crotonyl-CoA
DEAE	Diethylaminoethyl
DG	Deoxyglucose
DG6P	Deoxyglucose-6-phosphate
EtOH	Ethanol
F1,6DP	Fructose-1,6-diphosphate
F6P	Fructose-6-phosphate
G1,3DP	Glycerate-1,3-diphosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GA3P	Glyceraldehyde-3-phosphate

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ชื่อย่อของสารเคมี	ชื่อเต็มของสารเคมี
Glc	Glucose
H	Hydrogen ion; proton
H ₂	Hydrogen molecule
H ₂ O	Water
β HBCoA	β-Hydroxybutyryl-CoA
Lac	Lactate
α MG	methyl-α-D-glucopyranoside
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
Ox-Fd	Ferredoxin (oxidized)
P	Inorganic Orthophosphate
Pyr	Pyruvate
Rd-Fd	Ferredoxin (reduced)

ที่มา: Gheshlaghi *et al.* (2009)

ตารางที่ 10 ปฏิกริยาต่างๆ ในภาพที่ 2

หมายเลข	ปฏิกิริยา
(1)	$\text{GlcExt} + \text{PEP} \Rightarrow \text{G6P} + \text{Pyr}$
(2)	$\text{G6P} \Rightarrow \text{F6P}$
(3)	$\text{F6P} + \text{ATP} \Rightarrow \text{F1,6DP} + \text{ADP}$
(4)	$\text{F1,6DP} \Rightarrow 2\text{GA3P}$
(5)	$\text{GA3P} + \text{NAD} + \text{P} \Rightarrow \text{G1,3DP} + \text{NADH} + \text{H}$
(6)	$\text{G1,3DP} + \text{ADP} \Rightarrow \text{PEP} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
(7)	$\text{PEP} + \text{ADP} \Rightarrow \text{Pyr} + \text{ATP}$
(8)	$\text{Pyr} + \text{CoA} + \text{OxFd} \Rightarrow \text{AcCoA} + \text{CO}_2 + \text{RdFd} + 2\text{H}$
(9)	$2 \text{AcCoA} \Rightarrow \text{AcAcCoA} + \text{CoA}$
(10)	$\text{AcAcCoA} + \text{NAD(P)H} + \text{H} \Rightarrow \beta\text{-HBCoA} + \text{NAD(P)}$
(11)	$\beta\text{-HBCoA} \Rightarrow \text{CrlCoA} + \text{H}_2\text{O}$
(12)	$\text{CrlCoA} + \text{NADH} + \text{H} \Rightarrow \text{BurlCoA} + \text{NAD}$
(13)	$\text{Pyr} + \text{NADH} + \text{H} \Rightarrow \text{Lac} + \text{NAD}$
(14)	$\text{RdFd} + \text{NADP} + \text{H} \Rightarrow \text{OxFd} + \text{NADPH}$
(15)	$\text{RdFd} + \text{NAD} + \text{H} \Rightarrow \text{OxFd} + \text{NADH}$
(16)	$\text{RdFd} + 2\text{H} \Rightarrow \text{OxFd} + \text{H}_2$
(17)	$\text{AcCoA} + \text{P} \Rightarrow \text{AcP} + \text{CoA}$
(18)	$\text{AcP} + \text{ADP} \Rightarrow \text{Ac} + \text{ATP}$
(19)	$\text{AcCoA} + \text{NAD(P)H} + \text{H} \Rightarrow \text{Acal} + \text{CoA} + \text{NAD(P)}$
(20)	$\text{Acal} + \text{NAD(P)H} + \text{H} \Rightarrow \text{EtOH} + \text{NAD(P)}$
(21)	$\text{AcAcCoA} + \text{Ac} \Rightarrow \text{AcAc} + \text{AcCoA}$
(22)	$\text{AcAcCoA} + \text{But} \Rightarrow \text{AcAc} + \text{BurlCoA}$
(23)	$\text{AcAc} + \text{H} \Rightarrow \text{Acon} + \text{CO}_2$
(24)	$\text{BurlCoA} + \text{P} \Rightarrow \text{BurlP} + \text{CoA}$
(25)	$\text{BurlP} + \text{ADP} \Rightarrow \text{But} + \text{ATP}$
(26)	$\text{BurlCoA} + \text{NAD(P)H} + \text{H} \Rightarrow \text{Bual} + \text{CoA} + \text{NAD(P)}$
(27)	$\text{Bual} + \text{NAD(P)H} + \text{H} \Rightarrow \text{BuOH} + \text{NAD(P)}$

ที่มา: Gheshlaghi *et al.* (2009)

3.2 ลักษณะของเอนไซม์บางชนิดในเมแทบอลิซึมของ *C. acetobutylicum*

3.2.1 ระบบ glucose phosphotransferase

เป็นกลไกที่สำคัญสำหรับการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตใน clostridia โดยระบบมี phosphoenolpyruvate เชื่อมกับ phosphotransferase ซึ่งการดูดซึมและการเกิดปฏิกิริยา phosphorylation ของสารตั้งต้นเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นพร้อมกัน (Mitchell and Tangney, 2005) ความจำเพาะของ phosphotransferase ต่อน้ำตาลแตกต่างกันในกลุ่ม clostridia เช่น ใน *Clostridium acetobutylicum* สามารถดูดซึม กลูโคส แล็กโทส sucrose maltose และ mannitol ผ่านทางระบบ phosphotransferase (Mitchell *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2007) ในขณะที่ *C. thermocellum* มีกลไกผ่านทาง phosphotransferase ในการดูดซึม mannitol แต่การดูดซึมกลูโคสไม่ผ่านทางระบบ phosphotransferase (Hernandez, 1982)

3.2.2 phosphofructokinase

เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา phosphorylation ของ fructose-6-phosphate โดยมี ATP เป็นตัวให้หมู่ฟอสเฟตแล้วจึงสร้างเป็น fructose-1,6-diphosphate และ ADP (Uyeda and Kurooka, 1970) เอนไซม์นี้มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 7.0-8.2 ส่วน pH 6 และ 10 เป็น pH ที่เหมาะสมมีกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ pH 5 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์นี้ต้องการทั้งแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และ แอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) หรือโพแทสเซียมไอออน (K^+) โดยแมกนีเซียมไอออนจะสร้างรูปแบบซับซ้อนกับ ATP ซึ่งอาจจะเป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Blangy *et al.*, 1968) แอมโมเนียมไอออนอาจกระตุ้น glycolysis ผ่านกิจกรรมของเอนไซม์นี้เพื่อเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ ATP ดังนั้นการตรึงไนโตรเจนจึงเป็นสิ่งจำเป็น (Uyeda and Kurooka, 1970)

3.2.3 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน glyceraldehyde-3-phosphate เป็น glycerate-1,3-diphosphate (Jungermann *et al.*, 1973) เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด เมื่อ pH อยู่ระหว่าง 8.5-9.3 (Schreiber and Durre, 1999)

3.2.4 pyruvate-ferredoxin oxidoreductase

เป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน pyruvate เป็น acetyl-CoA (Menon and Ragsdale, 1997) ใน clostridia เอนไซม์นี้ไม่เสถียรและไวต่อออกซิเจนอย่างมาก เมื่อสัมผัสกับออกซิเจนบริสุทธิ์ภายในหนึ่งชั่วโมงเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ จะอยู่ในภาวะซึ่งไม่สามารถมีกิจกรรมได้ แต่ถ้าอยู่ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลง (Meinecke *et al.*, 1989)

3.2.5 hydrogenase

ในแบคทีเรียที่สร้างหรือบริโภคไฮโดรเจนถูกเร่งปฏิกิริยาโดย hydrogenase เอนไซม์นี้สามารถแบ่งออกเป็นสามชนิดตามลักษณะของโคแฟกเตอร์ซึ่งเป็นโลหะทรานซิชันที่เชื่อมกับโปรตีน ได้แก่ [NiFe] hydrogenase [Fe] hydrogenase และ [FeFe] hydrogenase (Vignais *et al.*, 2001) เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยารีดักชันของโปรตอน ซึ่งทำให้สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนออกมาได้ (Adams, 1990) hydrogenase ไวต่อการยับยั้งออกไซด์และออกซิเจนอย่างมาก เนื่องจากคาร์บอนมอนอกไซด์เป็นตัวยับยั้งชนิดแข่งขันกับเอนไซม์ชนิดนี้ และออกซิเจนจะทำให้กลุ่มของไฮโดรเจนในบริเวณแอคทีฟ (active site) ของเอนไซม์แตกออก (Baffert *et al.*, 2008) ที่ pH ต่ำกว่า 6.0 ไม่พบกิจกรรมของ hydrogenase เมื่อเซลล์ผลิตตัวทำลาย pH ประมาณ 4.5 hydrogenase จะอยู่ในรูปไม่แอคทีฟ (inactive) (Andersch *et al.*, 1983)

3.2.6 phosphotransacetylase

phosphotransacetylase เปลี่ยน acetyl-CoA เป็น acetyl phosphate ซึ่ง acetyl phosphate จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น acetate โดย acetate kinase (Hartmanis and Gatenbeck, 1984) ใน *C. acetobutylicum* (Hartmanis and Gatenbeck, 1984) และ *C. kluyveri* (Kyrtopoulos and Satchell, 1973) phosphotransacetylase จะถูกกระตุ้นโดยโพแทสเซียมไอออน (K^+) และแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) แต่ถูกยับยั้งโดยโซเดียมไอออน (Na^+)

4. การตรึงเซลล์ (cell immobilization)

เซลล์ตรึง (immobilized cell) คือ เซลล์ที่ถูกจำกัดขอบเขตให้เคลื่อนที่อยู่ในบริเวณที่กำหนด โดยที่ไม่สูญเสียกิจกรรมของเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่นำมาตรึงนั้นอาจอยู่ในสภาพที่กำลังเติบโตอยู่ในระยะพักตัว (resting cell) หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (death cell) (สมาใจ, 2544; Shuler and Kargi, 2002)

การตรึงเซลล์มีเทคนิคหลักอยู่ 4 วิธี ดังนี้

4.1 การเชื่อมโยงของเซลล์โดยอาศัยสารที่มีกลุ่มฟังก์ชันน้ำตาลสองกลุ่ม เป็นสารที่เชื่อมระหว่างเซลล์ด้วยกัน

4.2 การใช้พันธะโควาเลนต์เชื่อมเข้ากับพาหะของแข็ง

4.3 การดูดซับบนสารพาหะของแข็ง

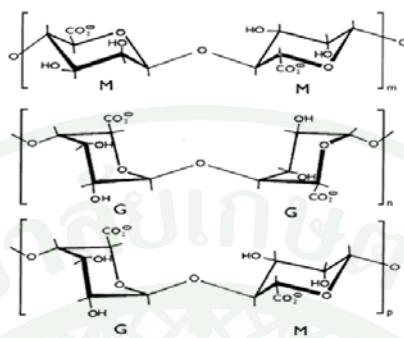
4.4 การดักจับไว้ด้วยพาหะของแข็ง เส้นใย หรือล้อมรอบด้วยแคปซูลขนาดเล็ก ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ตรึงเซลล์ได้ผลดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการรักษาให้จุลินทรีย์นั้นมีชีวิตรอดอยู่ได้

ปัญหาที่สำคัญของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีดักจับ คือ ความจำกัดในการแพร่กระจายของสารอาหาร โดยปกติเซลล์ตรึงจะได้รับสารอาหารน้อยกว่าเซลล์อิสระ ทั้งนี้เพราะเมื่อเซลล์ถูกจับไว้ด้วยสารพาหะจะทำให้สารอาหารซึมผ่านสารพาหะก่อนที่เซลล์จะได้รับสารอาหาร แต่ในการประยุกต์ใช้บางกรณีข้อจำกัดนี้จะมีค่าน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบประโยชน์ที่ได้รับจากเซลล์ตรึง ซึ่งจะป้องกันเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์ (ภาวิณี, 2531)

5. อัลจิเนต (alginate)

อัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับ (ภาวิณี, 2531) โดยอัลจิเนตเป็นเกลือของ alginic acid ซึ่งเกิดขึ้นภายในเซลล์สาหร่ายสีน้ำตาล alginic acid ประกอบด้วย monosaccharide สองชนิด คือ 1,4-linked β -D-mannuronic acid (M) และ

1,4-linked α -L-guluronic acid (G) โมเลกุลมี homopolymeric region ของ G และ M ที่เรียกว่า G และ M block ตามลำดับ และยังมีบางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-block แสดงในภาพที่ 3



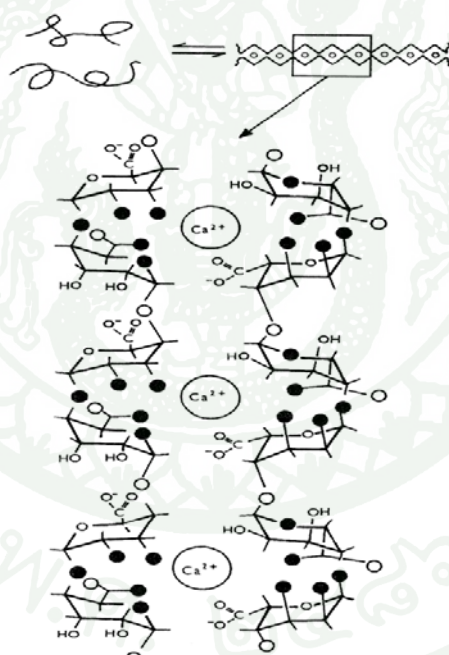
ภาพที่ 3 ลักษณะโมเลกุลของแอลจินเนต

ที่มา: Veliky and Mclean (1994)

5.1 การเกิดเจลของอัลจินเนต

อัลจินเนตไม่ได้เกิดเจลแบบ thermoreversible แต่เกิดเจลในสารละลายของเกลือโซเดียม เมื่อมีสารซึ่งมีไอออนบวกสองหน่วย เช่น Ca^{2+} ไอออน Ca^{2+} แทนที่ของ Na^+ จะทำให้เกิดเจล ชนิดของสารซึ่งมีไอออนบวกสองหน่วยมีผลต่อความแข็งแรงของเจล ซึ่งสามารถจัดลำดับได้ ดังต่อไปนี้ $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+}$ วิธีการเติมแคลเซียมในสารละลายอัลจินเนตมีผลต่อคุณสมบัติของเจลที่เกิดขึ้นอย่างมาก โดยถ้าเติมเร็วเกินไปจะเกิดเจลเป็นจุดและโครงสร้างไม่ต่อเนื่อง แต่สามารถควบคุมการเติมแคลเซียมได้โดยใช้เกลือแคลเซียมละลายช้า เช่น calcium citrate หรือ dicalcium phosphate หรือโดยการเติมสาร sequestant เช่น tetrasodium pyrophosphate หรือสารที่ทำให้เปลี่ยนเป็นกรด เช่น glucono-lactone เจลแคลเซียมอัลจินเนตที่เกิดขึ้นมีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน โดยความเข้มข้นของพอลิเมอร์ที่ผิวสูงกว่าที่ศูนย์กลางของเจล ลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกันของเจลมีปัจจัยมาจาก ความเข้มข้นของไอออนซึ่งกระตุ้นการเกิดเจล ความเข้มข้นและขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ ส่วนใหญ่เจลแคลเซียมอัลจินเนตมักจะถูกทำให้มีลักษณะเป็นเม็ด แต่บางครั้งทำเป็นเส้นๆ และแผ่น

การเกิดเจลของอัลจินตในสารละลายจะมีการรวมของไอออนอย่างจำเพาะพร้อมกับการเปลี่ยนโครงสร้าง เมื่ออัลจินตรวมกับแคลเซียมจะเกิดเป็น guluronate block ขั้นตอนนี้มีการรวมกันได้มากถ้ามี guluronate มากกว่า 20 ดังนั้นลำดับ guluronate ในอัลจินต จึงสัมพันธ์กับการจับคู่กันของผลึกซึ่งรวมตัวกันในรูปแบบคล้ายริบบิ้นสองเส้นไขว้กัน การรวมกันของไอออนคล้ายไขว้ในกล่องไข่ (แสดงในภาพที่ 4) ซึ่งสันนิษฐานว่าการจับคู่ดำเนินไปบริเวณสองสายที่อยู่ข้างเคียงกันเท่านั้น เมื่อมีแคลเซียมไอออนความเข้มข้นสูงจะเกิดการรวมตัวของเจลได้มาก เจลของแคลเซียมอัลจินตเป็นเครือข่ายพอลิเมอร์สามมิติที่มีช่องว่างระหว่างกลางที่เชื่อมต่อกันมาก ซึ่งขนาดของช่องว่างเหล่านี้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอัลจินตที่ใช้ ความแข็งแรงของเจลอัลจินตขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ น้ำหนักโมเลกุล และอัตราส่วน M/G โดยถ้าโมเลกุลมี mannuronate มากจะให้เจลที่เกิดขึ้นมีลักษณะอ่อนและหยุ่นมาก แต่สามารถขยายตัวได้ดี ในขณะที่โมเลกุลที่มี guluronate มากจะให้เจลซึ่งมีลักษณะแข็งและใส แต่เปราะบาง (Veliky and Mclean, 1994)



ภาพที่ 4 โมเดลกล่องไข่ (egg box model) สำหรับ Ca^{2+} ซึ่งเหนี่ยวนำปฏิกิริยา dimerization ของ poly-L-guluronate

ที่มา: Veliky and Mclean (1994)

การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจินเตเป็นวิธีหนึ่งซึ่งใช้ตรึงเซลล์ที่มีชีวิต เนื่องจากเป็น การตรึงเซลล์ในสภาวะไม่รุนแรง รวดเร็ว และง่าย แต่เจลของแคลเซียมอัลจินเตไวต่อสาร chelating เช่น ฟอสเฟต citrate EDTA และ lactate หรือไอออนบวกซึ่งยับยั้งการสร้างเจล เช่น Na^+ หรือ Mg^{2+} ดังนั้น การรักษาเม็ดเจลในอาหารควรมีแคลเซียมอิสระปริมาณเล็กน้อย (mM) และรักษาสัดส่วน ของ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ให้ต่ำ (Mansi *et al.*, 2007) สารซึ่งมีประจุบวกหนึ่งหน่วยสามารถทำให้เม็ดอัลจินเต เกิดการพองตัวได้ (Veliky and Mclean, 1994)

6. กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic digestion)

6.1 ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน (ภาพที่ 5)

6.1.1 ขั้นที่ 1 กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

กระบวนการนี้อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า กระบวนการแตกสลายพอลิเมอร์ (polymer break-down) ในขั้นนี้สารประกอบอินทรีย์ประเภทซับซ้อนทั้งที่ละลายน้ำและไม่ ละลายน้ำ เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต จะถูกทำให้ละลายน้ำและมีขนาดเล็กลงเพื่อนำเข้า สู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น โดยใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งใช้เอนไซม์ที่ขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เช่น cellulose amylase และ proteases ของแบคทีเรียเป็นตัวเร่ง ปฏิกิริยาจะได้สารประกอบที่ไม่ซับซ้อน และละลายน้ำได้ เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมัน ในขั้นกระบวนการนี้เป็นเพียงการเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่ซับซ้อนไปเป็นสารประกอบ อินทรีย์อย่างง่าย ๆ เท่านั้น ยังไม่มีการลด ปริมาณ COD ในขั้นนี้

6.1.2 ขั้นที่ 2 กระบวนการแอซิโดเจเนซิส (Acidogenesis)

สารประกอบอินทรีย์อย่างง่ายที่ละลายน้ำ ซึ่งสร้างขึ้นโดยปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิสถูกแบคทีเรียประเภทที่ดำรงชีพอยู่ได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนอิสระ (facultative bacteria) ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานโดยกระบวนการหมัก ผลของปฏิกิริยาจะได้ กรดระเหยง่ายที่มีคาร์บอนไม่เกิน 5 ตัว เช่น กรด acetic กรด propionic กรด butyric และ กรด valeric แบคทีเรียจำพวกนี้เรียกว่า แบคทีเรียพวกสร้างกรด (acid former หรือ non-methanogenic bacteria) ซึ่งชนิดของแบคทีเรียแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของ สารอินทรีย์ นอกจากนี้ยังขึ้น อยู่กับความเข้มข้นและสภาพแวดล้อมของปฏิกิริยาค่า μ partial pressure

ของก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ยังไปยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียในกระบวนการหมัก ซึ่งจะทำให้ได้กรดระเหยง่ายที่ต่างกันออกไปจากเดิม(Grady *et al.*, 1999)

6.1.3 ขั้นที่ 3 กระบวนการแอซิโตเจเนซิส (Acetogenesis)

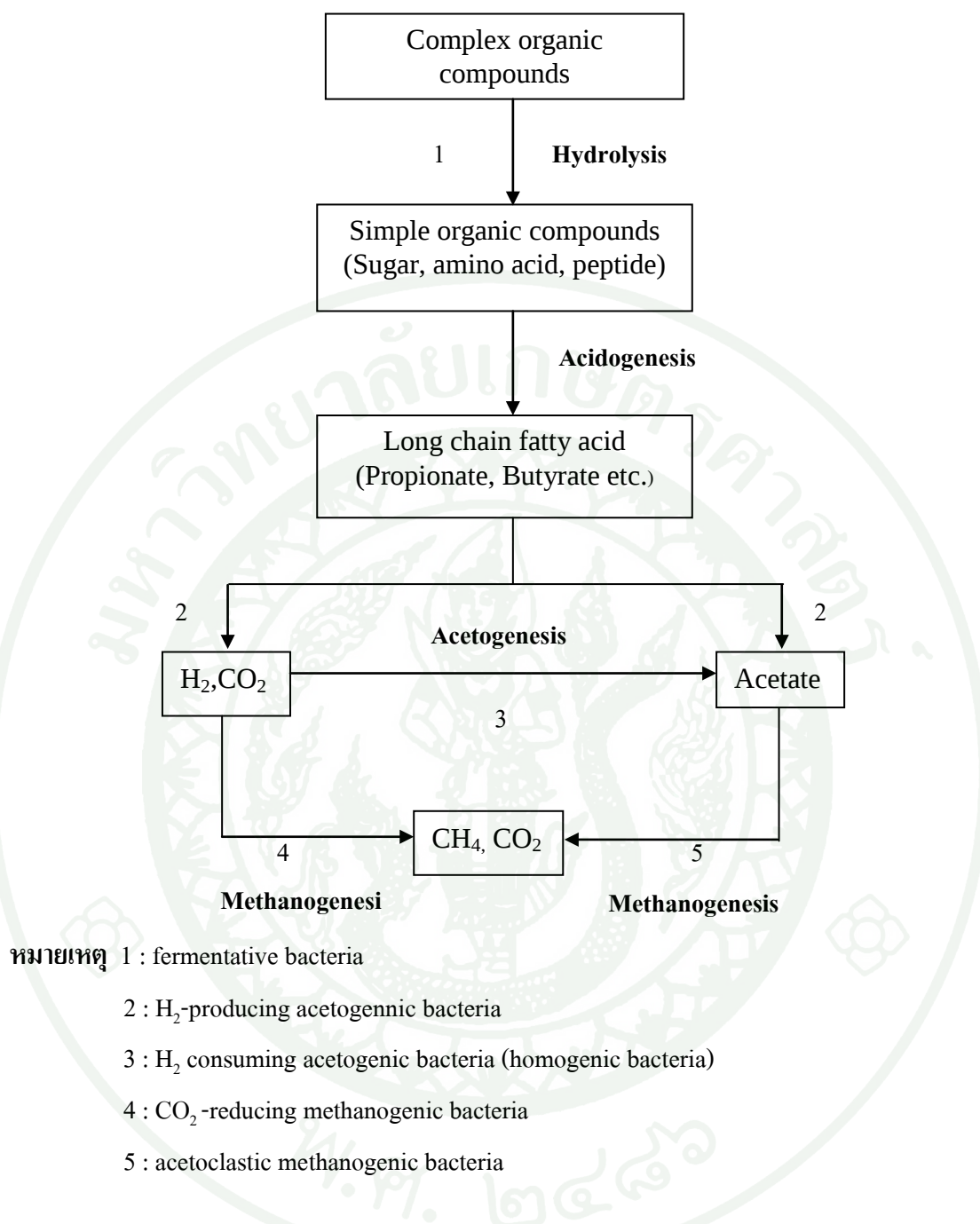
กรดระเหยง่ายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการแอซิโตเจเนซิส(acetogenesis) ถูกเปลี่ยนโดยแบคทีเรียโฮโมอะซิโตเจนิก(homoacetogenic bacteria) ให้เป็นอะซิเตท(acetate) ฟอर्मेट(formate) ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในการสร้างมีเทน ปฏิกริยานี้ถือเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญในการหลีกเลี่ยงการสะสมของกรดระเหยง่ายและไฮโดรเจน ในปริมาณที่สูงพอที่จะยับยั้งกระบวนการสร้างมีเทนได้

แบคทีเรียกลุ่มนี้อาจเรียกว่า แบคทีเรียสร้างไฮโดรเจน(hydrogen forming bacteria) เนื่องจากแบคทีเรียที่สร้างไฮโดรเจนมักสร้างกรดอินทรีย์ได้ แต่แบคทีเรียที่สร้างกรดอาจไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนได้ จึงถือว่าแบคทีเรียที่สร้างไฮโดรเจนเป็นชนิดของแบคทีเรียที่สร้างกรด แบคทีเรียทั้งสองชนิดอาจรวมเรียกได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างมีเทน(non-methanogenic bacteria)

6.1.4 ขั้นที่ 4 กระบวนการสร้างมีเทน (Methanogenesis)

ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ กรดฟอर्मิก และกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาของแบคทีเรียที่สร้างกรดและไฮโดรเจนถูกใช้โดยแบคทีเรียอีกประเภทหนึ่งเพื่อสร้างมีเทน แบคทีเรียประเภทนี้ เรียกว่า แบคทีเรียสร้างมีเทน (methanogenic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำ ซึ่งอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจนอย่างแท้จริง จัดอยู่ในอาณาจักร Archaeobacteria แบคทีเรียกลุ่มนี้ทุกชนิดสามารถผลิตมีเทน โดยได้พลังงานจากการรีดิวซ์สารประกอบที่มีโครงสร้างง่ายๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และอะซิเตท แต่กรดไขมันหลายชนิดเป็นพิษต่อผนังเซลล์



ภาพที่ 5 วิธีหลักการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจนและจุลินทรีย์ ในแต่ละขั้นตอน

ที่มา: Prince and Cheremisinoff (1981)

6.2 แบคทีเรียสร้างมีเทน แบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยพิจารณาจากการใช้สารตั้งต้น ดังนี้

6.2.1 กลุ่มที่ 1 Hydrogenotrophic methanogen

Hydrogenotrophic methanogen ใช้ไฮโดรเจนเพื่อเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นมีเทน ดังสมการที่ 1 เพื่อช่วยรักษาระดับไฮโดรเจนให้ต่ำ ซึ่งจำเป็นสำหรับแบคทีเรียสร้างอะซิเตท (acetogenic bacteria)



6.2.2 กลุ่มที่ 2 Acetotrophic methanogen

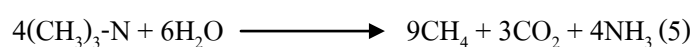
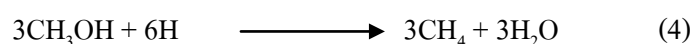
Acetotrophic methanogen สลายอะซิเตทเป็นมีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการที่ 2 คาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตจากอะซิเตทอาจถูกเปลี่ยนโดย Hydrogenotrophic methanogen เป็นมีเทน ดังสมการที่ 1 Hydrogenotrophic methanogen ใช้คาร์บอนมอนอกไซด์เพื่อผลิตมีเทน ดังสมการที่ 3



Acetotrophic methanogen เจริญช้ากว่า Hydrogenotrophic methanogen มาก และได้รับผลกระทบจากการเพิ่มขึ้นของไฮโดรเจน ดังนั้นในการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อมีความดันไฮโดรเจนต่ำเป็นผลดีต่อ Acetotrophic methanogen

6.2.3 กลุ่มที่ 3 Methylotrophic methanogen

Methylotrophic methanogen เจริญบนสารตั้งต้น ซึ่งมีกลุ่มเมทิล ($-\text{CH}_3$) เช่น methanol (CH_3OH) ดังสมการที่ 4 และ methylamine $[(\text{CH}_3)_3\text{-N}]$ ดังสมการที่ 5



มีเทนซึ่งผลิตจากการย่อยภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์
ได้มาจากอะซิเตทโดย Acetotrophic methanogen 2 genera คือ *Methanosarcina* และ *Methanoxthrix*

แบคทีเรียสร้างมีเทน แต่ละชนิด (species) ไม่สามารถใช้สารตั้งต้นทุกชนิดได้
ดังนั้น ในการย่อยภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนไม่เพียงมีแบคทีเรียสร้างมีเทน จำนวนมาก แต่จำเป็น
ต้องมีความหลากหลายอย่างมากด้วย (Gerardi, 2003)

ตารางที่ 11 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน

		Substrate degraded	Fermentation products
1. Hydrolysis and acidogenesis			
Aerobes	<i>Pseudomonas</i>	Nutritionally highly	
	<i>Micrococcus</i>	Versatile starch	Lactate
Facultative	<i>Bacillus</i>		
Anaerobes	<i>Sterptococcus</i>	Starch maltose	Lactate
	<i>Lactobacillus</i>	Numerous sugars	Acetate
	<i>Escherichia</i>	Numerous sugars	
	<i>Clostridia</i>		Succinate, acetate
Anaerobes	<i>Ruminococcus</i>	Cellulose, cellobiose	Ethanol, hydrogen
	<i>Bacteroides</i>	Hemicellulose, pectin	Formate
	<i>Butyrivibrio</i>	Starch	Butyrate, lactate
	<i>Megasphaera</i>	Lactate, glucose	Branched VFA
	<i>Selenomonas</i>	Other sugars	hydrogen
			Acetate, propionate,
	<i>Desulfovibrio</i>	Lactate, malate	Lactate, hydrogen
	<i>Bifidobacterium</i>	Proteins	Acetate
	<i>Propionibacterium</i>	Amino-acids	VFA

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	Substrate degraded	Fermentation products
1. Hydrolysis and acidogenesis		
<i>Peptostreptococcus</i>	Amino-acids	Propionate
<i>Anaerovibrio</i>		
2. Acetogenesis		
Hydrogen producing acetogenic bacteria		
<i>Desulfovibrio</i>	Fatty acids	Acetate (When associated with methanogen)
<i>Selenomonas</i>	Neutral end products	
<i>Ruminococcus</i>		
<i>Clostridium</i>		
“S” microorganism		
<i>Syntrophobacter wolinii</i>	Monocarboxylate	Acetate
<i>Syntrophomonas wolfii</i>	C ₄ -C ₈ fatty acids	
Homo acetogenic bacteria		
<i>Clostridium aceticum</i>	CO ₂ + H ₂	acetate
<i>C. fomicoaceticum</i>		
<i>C. thermoautotrophicum</i>		
<i>Acetobacterium woodii</i>		
<i>Acetogenium lavui</i>		
3. Methanogenic bacteria		
<i>Methanobacterium formicicum</i>	H ₂ , formate	CH ₄
<i>M. thermoautotrophicum</i>	H ₂	
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H ₂ , formate	
<i>M. arboriphilus</i>	H ₂	
<i>Methanococcus vanniellii</i>	H ₂ , formate	

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	Substrate degraded	Fermentation products
3. Methanogenic bacteria		
<i>M. mazei</i>	H ₂ , methanol, methylamines, acetate	CH ₄
<i>Methanomicrobium mobile</i>	H ₂ , formate	
<i>Methanobacterium cariaci</i>	H ₂ , formate	
<i>Methanospirillum hungatei</i>	H ₂ , formate	
<i>Methanosarcina bankerii</i>	H ₂ , formate, methanol, methylamines	
<i>Methanotrix soehngenii</i>	Acetate	
<i>Methanogehemus fervidus</i>	H ₂	

ที่มา: Marty (1984); Taylor (1982)

6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตก๊าซมีเทน

6.3.1 ระยะเวลาเก็บกัก (retention time)

ระยะเวลาเฉลี่ยซึ่งแบคทีเรียสร้างมีเทนอยู่ในระบบย่อยสลายแบบไร้ออกซิเจน (solids retention time; SRT) มากกว่า 12 วัน ถ้าระยะเวลาในการเก็บกักน้อยกว่า 10 วัน แบคทีเรียสร้างมีเทนจะถูกชะด้วยกระแส น้ำ (wash out)

6.3.2 อุณหภูมิ

ส่วนใหญ่แบคทีเรียสร้างมีเทนเจริญได้ดีในช่วง mesophilic (30-35 องศาเซลเซียส) และช่วง thermophilic (50-60 องศาเซลเซียส) โดยแบคทีเรียสร้างมีเทนกลุ่ม thermophilic มีอัตราของการย่อยสลายในสภาวะไร้ออกซิเจนของ sludge และการผลิตมีเทนสูงกว่ากลุ่ม mesophilic แต่ที่อุณหภูมิระหว่าง 40 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสร้างมีเทนจะถูกยับยั้ง

6.3.3 สารอาหาร

โดยทั่วไปความต้องการสารอาหารสำหรับการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนอัตราการใช้สารอินทรีย์ COD:N:P เป็น 100:7:1 สำหรับของเสียที่มีความเข้มข้นสูง (high-strength waste) และ 350:7:1 เมื่อภาระบรรทุกต่ำ (low loading) อัตราส่วน C/N อย่างน้อย 25:1 เป็นค่าที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซมีเทนที่สุด

6.3.4 สภาพความเป็นด่างและ pH

สภาพความเป็นด่างเป็นบัฟเฟอร์สำหรับป้องกันการเปลี่ยนแปลง pH อย่างรวดเร็ว โดยการลดลงของความเป็นด่างมาก่อนการเปลี่ยนแปลง pH อย่างรวดเร็ว ซึ่ง pH 6.8-7.2 เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสร้างมีเทน เมื่อแบคทีเรียสร้างมีเทนใช้กรดระเหยง่ายและผลิตด่างขึ้น การย่อยสลายมีเสถียรภาพสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของด่างสูง สาเหตุการลดลงของด่างมีดังนี้

ก. การสะสมของกรดอินทรีย์เนื่องจากความล้มเหลวของ methane-forming bacteria ในการเปลี่ยนกรดอินทรีย์เป็นมีเทน

ข. การย่อยแบบไม่มีออกซิเจนปล่อยกรดอินทรีย์อย่างช้าๆ

ค. การมีของเสียที่ยับยั้งกิจกรรมของ methane-forming bacteria

6.3.5 สารพิษ

ในระบบบำบัดต้องไม่มีสารพิษต่อจุลินทรีย์ในระบบ เช่น โลหะหนักต่างๆ เกลืออนินทรีย์ แอมโมเนีย และซัลไฟด์ เป็นต้น ความรุนแรงของพิษขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของสารนั้นๆ (Gerardi, 2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 1.1 เครื่องสูบบแบบ Peristaltic pump (MP 3, Evala)
- 1.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge); (CP 3, Jouan)
- 1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectronic 20, Bausch and Lomb)
- 1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); (WB 22, Memmert)
- 1.5 เครื่องกวน (Hotplate and Stirrer); (MR 3002, Heidolph)
- 1.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter); (pH 510, Eutech Instruments)
- 1.7 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator); (Mettler, Germany)
- 1.8 เครื่องชั่ง (Balance); (TB 214, Denver Instrument)
- 1.9 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave); (Labo Autoclave, Sanyo)
- 1.10 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ สำหรับการทดลองและวิเคราะห์

2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 Alginic acid sodium salt (A-7128, Sigma, USA)
- 2.2 Cooked meat medium (Oxoid)
- 2.3 Reinforced Clostridial medium (Difco)
- 2.4 Thioglycollate medium (Oxoid)

3. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1 จุลินทรีย์สำหรับผลิตก๊าซไฮโดรเจน คือ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จังหวัดปทุมธานี
- 3.2 จุลินทรีย์สำหรับผลิตก๊าซมีเทนเป็นเชื้อผสมในบ่อก๊าซชีวภาพ จากโรงเลี้ยงสุกร ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

วิธีการ

1. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตก๊าซชีวภาพด้วย *Clostridium* sp.

1.1 ศึกษาความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและค่า pH กับการเกิดก๊าซชีวภาพ

นำ *Clostridium* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยน้ำกลั่นกับอาหารซึ่งมีส่วนผสมของมอลต์สกัด นมผง เว้ย และน้ำตาล (มอลต์สกัด 8.4 เปอร์เซ็นต์ นมผง 4.9 เปอร์เซ็นต์ เว้ย 3.0 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาล 1.6 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารในหลอดทดลองที่ปิดด้วยฝาเกลียว แล้วเทพาราฟินชนิดเหลวลงไปในอาหาร โดยให้พาราฟินสูงจากผิวหน้าอาหารประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง เมื่อพบตะกอนลอยขึ้นและอาหารเลี้ยงเชื้อมีความใสขึ้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหมัก 40 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำนม UHT 500 มิลลิลิตร (เพื่อปรับสภาพจุลินทรีย์) บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเปลี่ยนแปลง เมื่อพบน้ำนมเกิดก๊าซชีวภาพที่จุดไฟติดและมีตะกอนลอยเกิดขึ้น ผสมน้ำนม UHT ใหม่เพิ่มลงไปในน้ำนมที่ผ่านการหมักแล้วอีกจนมีปริมาตรการหมักเป็น 1 ลิตร ในขวดขนาด 1.25 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส) สังเกตการเปลี่ยนแปลง เมื่อเกิดก๊าซชีวภาพขึ้น เติมน้ำนม UHT 250 มิลลิลิตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง พร้อมกับปล่อยน้ำนมที่ผ่านการหมักแล้วปริมาตร 250 มิลลิลิตร ออกจากขวด (หมักแบบ semi-continuous) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส) วัดปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นด้วยหลักการแทนที่น้ำ ทดสอบการติดไฟของก๊าซชีวภาพ ด้วยการนำก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นมาจุดไฟทุก 24 ชั่วโมง และวัดค่า pH ของน้ำนมที่ผ่านการหมัก เมื่อปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นคงที่เปลี่ยนอุณหภูมิสำหรับการบ่มเป็น 32 องศาเซลเซียส วัดปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นด้วยหลักการแทนที่น้ำ ทดสอบการติดไฟของก๊าซชีวภาพ ด้วยการนำก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นมาจุดไฟทุก 24 ชั่วโมง และวัดค่า pH ของน้ำนมที่ผ่านการหมัก เมื่อปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นคงที่ปรับ pH เริ่มต้นของการหมักเป็น 5 วัดปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นด้วยหลักการแทนที่น้ำ ทดสอบการติดไฟของก๊าซชีวภาพ ด้วยการนำก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นมาจุดไฟทุก 24 ชั่วโมง และวัดค่า pH ของน้ำนมที่ผ่านการหมัก

1.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดตะกอนกับปริมาณก๊าซชีวภาพ

นำ *Clostridium* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีส่วนผสมของน้ำกลั่นกับอาหารที่มีส่วนผสมของมอลต์สกัด นมผง เว้ย และน้ำตาล (มอลต์สกัด 8.4 เปอร์เซ็นต์ นมผง 4.9 เปอร์เซ็นต์

เวย์ 3.0 เปอร์เซนต์ และน้ำตาล 1.6 เปอร์เซนต์) ปริมาณ 1.5 เปอร์เซนต์ โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซนต์ ของปริมาณอาหารในหลอดทดลองที่ปิดด้วยฝาเกลียว แล้วเทพาราฟินชนิดเหลวลงไปในอาหาร โดยให้พาราฟินสูงจากผิวหน้าอาหารประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง เมื่อพบตะกอนลอยขึ้นและอาหารเลี้ยงเชื้อมีความใสขึ้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหมัก 25 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำนม UHT 250 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยน้ำนม UHT มีความเข้มข้น 10 30 50 และ 100 เปอร์เซนต์ ซึ่งใช้น้ำกลั่นผ่านกระบวนการสเตอริไลส์เจือจางน้ำนม UHT บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าทุก 24 ชั่วโมง วัดปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นด้วยหลักการแทนที่น้ำ ทดสอบการติดไฟของก๊าซชีวภาพ ด้วยการนำก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นมาจุดไฟทุก 24 ชั่วโมง นำน้ำนมที่ผ่านการหมักแล้วมาวิเคราะห์หาค่า pH และปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรต (คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี, 2548)

2. ศึกษาการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์

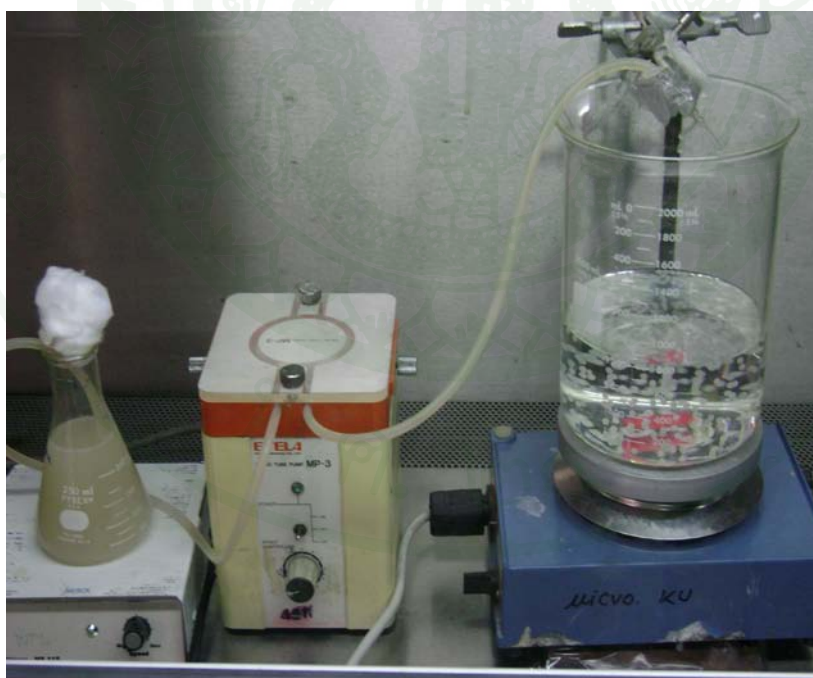
การนำน้ำนมพาสเจอร์ไรส์มาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแทนน้ำนม UHT เนื่องจากการฆ่าเชื้อด้วยกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ใช้ความร้อนต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส อาหารยังจึงคงคุณค่าทางโภชนาการอยู่ ส่วนกระบวนการ UHT (Ultra High Temperature) ใช้ความร้อน 135-145 องศาเซลเซียส ในเวลา 3-7 วินาที คุณค่าทางโภชนาการจึงอาจสูญเสียไปบ้าง (รังสิณี, 2553) ดังนั้นจึงนำน้ำนมพาสเจอร์ไรส์มาศึกษาการตกตะกอนโปรตีน โดยนำน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ชนิดจืดจำนวน 4 ยี่ห้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำแคลเซียมซัลเฟต ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 3.0 2.0 1.5 1.0 และ 0.5 กรัม ผสมกับน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ กวนให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำ (water bath) อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำนมไปกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเอาตะกอนออกไป นำของเหลวที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรต (คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี, 2548) หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี reducing sugar (Nelson, 1944) และหาปริมาณแคลเซียม (ไพลิน, 2546)

3. ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วย *C. acetobutylicum* TISTR 1462

นำ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 มาทำการทดลองเกี่ยวกับการการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจาก *Clostridium* sp. ที่ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตก๊าซชีวภาพไม่สามารถเจริญในอาหาร thioglycolate ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตเซลล์ตรังได้

3.1 การเตรียมเซลล์ตรึง (ดัดแปลงจาก ดิยะภรณ์, 2549)

นำกล้าเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่เตรียมไว้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร thioglycolate (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก) โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหาร เทพาราฟินชนิดเหลวลงไปในอาหาร โดยให้พาราฟินสูงจากผิวหน้าอาหารประมาณ 1.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นจึงนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตราเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำเซลล์เปียกที่ได้มาผสมกับโซเดียมอัลจินเตและน้ำกลั่นมาเชื้อ ในอัตราส่วน 5:2:100 ผสมให้เข้ากัน แล้วค่อยหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการกวน 200 รอบต่อนาที ดังภาพที่ 6 หลังจากนั้นแช่เม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเม็ดเจลถ่ายลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่เม็ดเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร lactose yeast extract peptone (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก) สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้าเม็ดเจลลอยขึ้นมา ดังภาพที่ 7 แสดงว่าสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการหยดเซลล์เปียกซึ่งผสมกับโซเดียมอัลจินเตและน้ำกลั่น ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 ลักษณะของเม็ดเจลซึ่งลอยขึ้นมาบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึง

เนื่องจาก *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Buchanan and Gibbons, 1974) ดังนั้นการวัดปริมาณเซลล์ตรึงของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 จึงไม่สามารถชั่งน้ำหนักได้ เพราะเมื่อเซลล์ตรึงสัมผัสกับอากาศเป็นเวลานาน พบว่าเมื่อนำเซลล์ตรึงไปหมักของเหลวจากการตกตะกอนในข้อ 2 แล้วไม่สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ การวัดปริมาณเซลล์ตรึงจึงต้องวัดเซลล์ตรึงด้วยการสังเกตจากปริมาณน้ำที่เพิ่มขึ้นเมื่อใส่เซลล์ตรึงในกระบอกตวง การทดลองครั้งนี้ใช้น้ำเซลล์ตรึงของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ปริมาณ 35 มิลลิลิตร และนำของเหลวจากการตกตะกอนในข้อ 2 มาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาตร 75 110 และ 145 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงมีอัตราส่วนของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 46.67 31.82 และ 24.14 เปอร์เซ็นต์ (ตามลำดับ) ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 11 ใส่ในถังหมัก ปริมาตร 370 มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ตรึงแบบ packed bed ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 8 และ 9 โดยป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อและดึงของเหลวที่ผ่านการหมักออกทุก 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 12 ระยะเวลาในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจน

พารามิเตอร์	ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3
ช่วงเวลา (วันที่)	1-14	15-28	29-67
ปริมาณเซลล์ตรึง (มิลลิลิตร)	35	35	35
ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	75	110	145
อัตราส่วนของเชื้อเริ่มต้นต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	46.67	31.82	24.14

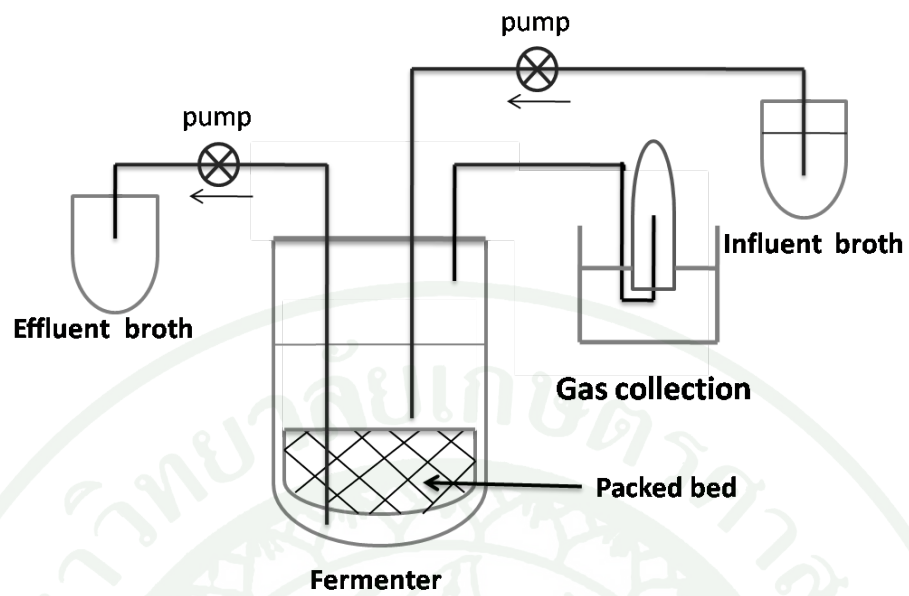
นำของเหลวที่ผ่านการหมักวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี phenol sulphuric acid (สาร์โจน และคณะ, 2544) ค่า COD โดยวิธีฟลักซ์แบบปิด (มันสิน, 2540) และค่า pH ส่วนปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นทั้งหมดสามารถวัดปริมาณได้โดยใช้หลักการแทนที่น้ำและเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะสมดุล (steady state) โดยพิจารณาจากปริมาณการเกิดก๊าซชีวภาพในแต่ละวันเริ่มมีปริมาณคงที่หรือใกล้เคียงกัน นำก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี Shimadzu model GC-14B คอลัมน์เป็น molecular sieve 13 X เปรียบเทียบกับก๊าซมีเทนและก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐานความเข้มข้นชนิดละ 30 เปอร์เซ็นต์แสดงในภาคผนวก ก เพื่อหาความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์) ของก๊าซไฮโดรเจน หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการที่ 6

$$R_{HM} = R_{HV}/RT \quad (6)$$

เมื่อ R_{HM} เป็นอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ซึ่งคำนวณโดยใช้กฎก๊าซในอุดมคติ มีหน่วยเป็น $\text{mmol H}_2 / \text{h}$

R_{HV} เป็นอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซึ่งคำนวณจากปริมาตรการผลิตก๊าซไฮโดรเจนทั้งหมดมีหน่วยเป็น $\text{ml H}_2 / \text{h}$

R เท่ากับ $0.0821 \text{ (L atm)/(mol K)}$ และ T เท่ากับ 303 K (Zhang *et al.*, 2006)



ภาพที่ 8 แผนภาพของถังหมักสำหรับผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึง



ภาพที่ 9 ถังหมักสำหรับผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึง

3.3 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์อิสระ

นำของเหลวจากการตกตะกอนในข้อ 2 แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเป็นของเหลวจากการตกตะกอนในข้อ 2 ซึ่งไม่ผ่านการปั่นแยกตะกอน (centrifuge) ส่วนที่สองเป็นของเหลวจากการตกตะกอนในข้อ 2 ปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 6000 rpm เป็นเวลา 14 นาที นำของเหลวทั้งสองส่วนปริมาตรส่วนละ 230 มิลลิลิตร ผสมผงวุ้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใส่กล้าเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณอาหาร แล้วเทพาราฟินชนิดเหลวลงไปในอาหาร โดยให้พาราฟินสูงจากผิวหน้าอาหาร ประมาณ 1.5 เซนติเมตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนของเหลวที่ผ่านการหมักนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี phenol sulphuric acid (สาโรจน์ และคณะ, 2544) และค่า pH ส่วนปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นสามารถวัดปริมาณได้โดยใช้หลักการแทนที่น้ำ แล้วนำก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์ด้วย เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี Shimadzu model GC-14B คอลัมน์เป็น molecular sieve 13 X เปรียบเทียบกับก๊าซมีเทนและไฮโดรเจนมาตรฐานชนิดละ 30 เปอร์เซ็นต์แสดงในภาคผนวก ก เพื่อหาความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์) ของก๊าซไฮโดรเจน หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการที่ 6

4. ศึกษาการผลิตก๊าซมีเทน (ดัดแปลงจาก อาริยา, 2546)

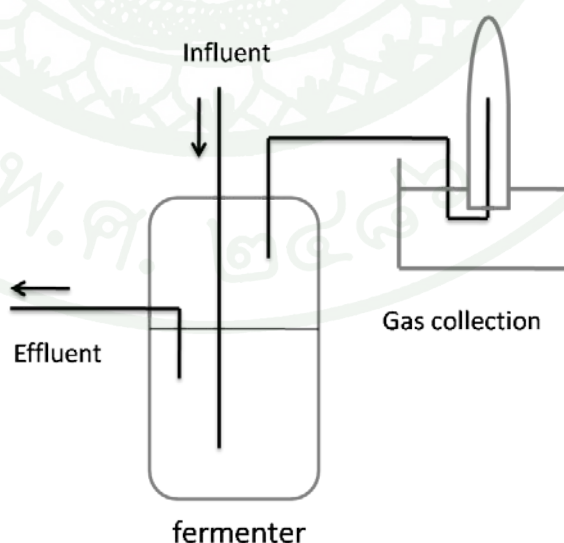
ในการทดลองนี้ใช้ระบบการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ถังหมักแบบอัตราต่ำ ถังหมักมีปริมาตรความจุ 2.6 ลิตร และปริมาตรการหมัก 2.0 ลิตร แสดงในภาพที่ 10 และ 11 นำของเหลวที่ผ่านการหมักจากข้อ 3.2 มาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทน ในการเริ่มต้นระบบโดยการเติมตะกอนจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับสภาพ แล้วลงไปจนถึงหมักประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรการหมัก หลังจากนั้นเติมของเหลวที่ผ่านการหมักจากข้อ 3.2 เข้าไปทางด้านบนของถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) คือ เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงไป อาหารที่ผ่านการหมักแล้วจะไหลออกจากถังหมัก โดยที่ปริมาตรการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เท่ากับปริมาตรอาหารที่ผ่านการหมักแล้วไหลออกจากถังหมัก เพื่อเป็นการรักษาระดับปริมาตรของเหลวในถังหมักให้คงที่เท่ากับปริมาตรการหมักตลอดการทดลอง และมีความถี่ในการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง การนำของเหลวที่ได้ผ่านการหมักด้วยเซลล์ตรึงมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากมีปริมาณเซลล์อิสระของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 น้อย ทำให้ไม่ส่งผลในการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรดในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

เพื่อผลิตก๊าซมีเทน ระยะเวลาเก็บกัก (hydraulic retention time, HRT) เริ่มต้นเท่ากับ 67 วัน การทดลองนี้แบ่งเป็น 3 ระยะ แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ระยะเวลาในการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทน

พารามิเตอร์	ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3
ช่วงเวลา (วันที่)	1-28	29-46	47-54
HRT (วัน)	67	40	25
อัตราการเติมอาหาร (ml/day)	30	50	80

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เข้าสู่ถังหมักและอาหารที่ผ่านการหมักแล้ว ไปวิเคราะห์หาค่า pH ปริมาณ COD โดยวิธีฟลักซ์แบบปิด (มันสิน, 2540) ปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมด (อารียา, 2546) และปริมาณธาตุอาหารต่าง ๆ ได้แก่ N P K Ca Mg (ไพลิน, 2546) ส่วนปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น สามารถวัดปริมาณได้โดยอาศัยหลักการแทนที่น้ำและเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะสมดุล (steady state) โดยพิจารณาจากปริมาณการเกิดก๊าซชีวภาพในแต่ละวันเริ่มมีปริมาณคงที่หรือใกล้เคียงกัน นำก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี Shimadzu model GC-14B คอลัมน์เป็น molecular sieve 13 X เปรียบเทียบกับก๊าซมีเทนและไฮโดรเจนมาตรฐานชนิดละ 30 เปอร์เซ็นต์แสดงในภาคผนวก ก



ภาพที่ 10 แผนภาพของถังหมักสำหรับผลิตก๊าซมีเทน



ภาพที่ 11 ถังหมักสำหรับผลิตก๊าซมีเทน

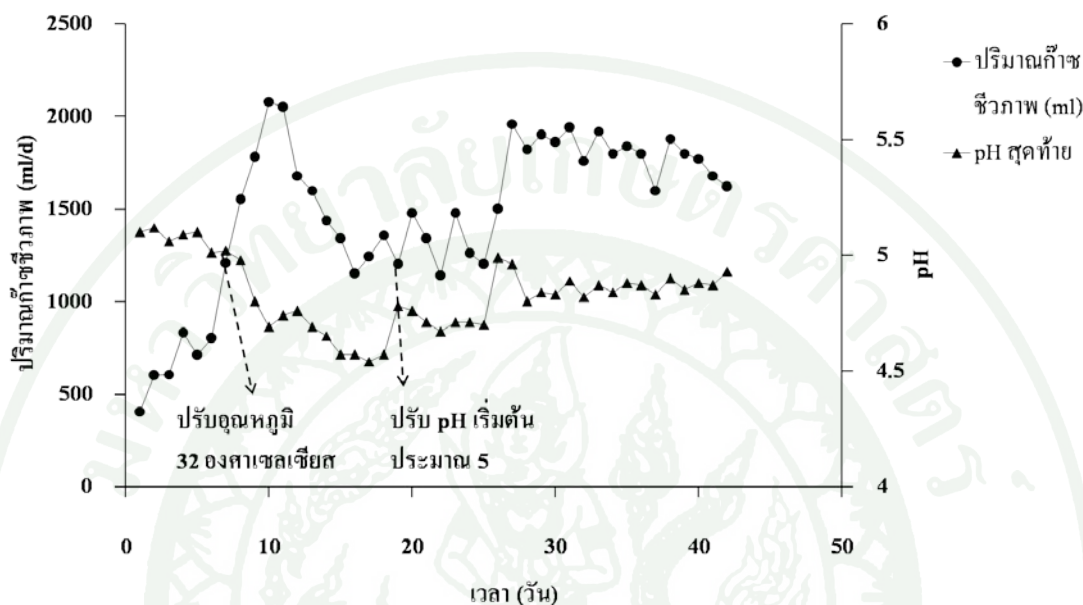
ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตก๊าซชีวภาพด้วย *Clostridium* sp.

1.1 ศึกษาความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและค่า pH กับการเกิดก๊าซชีวภาพ

จากภาพที่ 12 และตารางที่ 14 พบว่า เมื่อเลี้ยง *Clostridium* sp. ด้วยน้ำนม UHT ปริมาตรการหมัก 1.00 ลิตร แบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส) *Clostridium* sp. สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ 405-830 มิลลิลิตรต่อวัน น้ำนมที่ผ่านการหมักมีค่า pH 5.01-5.12 ไม่พบการเกิดตะกอนของน้ำนมที่ผ่านการหมัก ก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นสามารถจุดไฟติดได้ ซึ่งก๊าซชีวภาพเป็นก๊าซผสมระหว่างก๊าซมีเทน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไนโตรเจน ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Polprasert, 1996) โดยก๊าซมีเทนและก๊าซไฮโดรเจนเป็นก๊าซเพียงสองชนิดที่สามารถจุดไฟติดได้ ซึ่งที่ pH ระหว่าง 5.5 และ 6.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับ clostridia ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Cheng *et al.*, 2002) กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก (Girbal and Soucaille, 1994) จึงส่งผลให้ pH ของอาหารลดลง ส่วนแบคทีเรียพวกที่สร้างก๊าซมีเทนหยุดการเจริญเติบโตที่ pH 4.5-5.0 (Acher and Kirsop, 1991) ดังนั้น องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จึงเป็นก๊าซไฮโดรเจน แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการหมักเป็น 32 องศาเซลเซียส พบว่า *Clostridium* sp. สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 2080 มิลลิลิตรต่อวัน น้ำนมที่ผ่านการหมักมี pH เท่ากับ 4.69 พบน้ำนมที่ผ่านการหมักเกิดตะกอน หลังจากนั้นปริมาณก๊าซชีวภาพก็มีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ จนมีปริมาณคงที่ในช่วง 1150-1360 มิลลิลิตรต่อวัน จึงปรับ pH เริ่มต้นของการหมักให้อยู่ในช่วงประมาณ 5 พบว่า *Clostridium* sp. สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณก๊าซชีวภาพคงที่ในช่วง 1600-1960 มิลลิลิตรต่อวัน น้ำนมที่ผ่านการหมักมี pH อยู่ในช่วง 4.80-4.96 และพบการเกิดตะกอนของน้ำนมที่ผ่านการหมัก แสดงว่า การเพิ่มอุณหภูมิเป็น 32 องศาเซลเซียสและการปรับ pH เริ่มต้นของการหมักให้อยู่ในช่วงประมาณ 5 ส่งผลให้ *Clostridium* sp. สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจะเกิดการสะสมของตะกอนเพิ่มขึ้นด้วย ดังภาพที่ 13 เนื่องจากโปรตีนเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในน้ำนม มีจุดไอโซอิเล็กทริกเท่ากับ 4.6 (รังสิณี, 2550) และจากการทดลองของ พิสิฐ (2540) พบว่า จุดไอโซอิเล็กทริกของน้ำทิ้งโรงนม คือ 4.7 ดังนั้น เมื่อ pH ของน้ำนมที่ผ่านการหมักด้วย *Clostridium* sp. มีค่าใกล้เคียง 4.6-4.7 โปรตีนจะละลายได้น้อยลงและเกิดการตกตะกอนขึ้น เนื่องจากโปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ ส่งผลให้ถึงหมักเกิดการสะสมของตะกอนโปรตีนเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาตรของเหลวที่อยู่ในถังหมักลดลง เมื่อใส่น้ำนม UHT เข้าสู่ถังหมักจึงมีระยะเวลาเก็บของเหลวน้อยลงด้วย

ทำให้ในช่วงระยะเวลาหลัง ๆ ของการหมัก *Clostridium* sp. สามารถผลิตก๊าซชีวภาพลดลงอย่างต่อเนื่อง และถ้าเกิดการสะสมของตะกอนโปรตีนมาก ๆ ก็อาจทำให้เมื่อใส่น้ำนม UHT เข้าสู่ถังหมักแล้วมีน้ำนม UHT บางส่วนออกมาจากถังหมักพร้อมกับของเหลวที่ผ่านการหมักด้วย



ภาพที่ 12 ปริมาณก๊าซชีวภาพและค่า pH ของการหมักน้ำนม UHT ด้วย *Clostridium* sp. ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

จากการทดลองของ Ferchichi *et al.* (2005) ศึกษาอิทธิพลของ pH เริ่มต้นในการผลิตไฮโดรเจนจากเวย์ของชีส โดย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ซึ่งดำเนินการทดลองแบบ batch ในช่วง pH เริ่มต้นระหว่าง 5-10 พบว่า ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและผลผลิตสูงสุดเป็น 28.3 ml h^{-1} และ 7.89 mmol g^{-1} lactose ตามลำดับ แต่เมื่อ pH เริ่มต้นเพิ่มขึ้น อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและผลผลิตลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยไม่พบความแตกต่างของการเมแทบอลิซึมน้ำตาลระหว่าง pH 5 และ 9 โดยยังคงเมแทบอลิซึมน้ำตาลได้ 97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ pH เริ่มต้นมีค่าเพิ่มขึ้น pH สุดท้ายก็มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย โดย pH สุดท้ายมีค่าเป็นกรด และถ้า pH เริ่มต้นเป็นกรดจะมีช่วง lag phase ยาวกว่า pH เริ่มต้นเป็นด่าง

ระยะเวลา (วัน)	ลักษณะของน้ำนม UHT ที่ผ่านการหมัก	ลักษณะของน้ำนม UHT ที่ผ่านการหมักผสมกับน้ำนม UHT ใหม่ปริมาตร 250 ml
1 - 7		
8		
9		
10		
11		

ภาพที่ 13 ลักษณะการเกิดตะกอนของน้ำนม UHT

ตารางที่ 14 ปริมาณก๊าซชีวภาพและค่า pH ของการหมักน้ำนม UHT ด้วย *Clostridium* sp. ที่
ระยะเวลาต่าง ๆ

เวลา (วัน)	pH เริ่มต้น	pH สุดท้าย	ปริมาณก๊าซ ชีวภาพ (ml/d)	เวลา (วัน)	pH เริ่มต้น	pH สุดท้าย	ปริมาณก๊าซ ชีวภาพ (ml/d)
1	N	5.10	405 ^a	19	4.93	4.78	1200 ^b
2	N	5.12	600 ^a	20	5.04	4.76	1480 ^b
3	N	5.06	605 ^a	21	4.99	4.71	1340 ^b
4	N	5.09	830 ^a	22	5.01	4.67	1140 ^b
5	N	5.10	710 ^a	23	5.03	4.71	1480 ^b
6	N	5.01	800 ^a	24	4.97	4.71	1260 ^b
7	N	5.02	1210 ^b	25	4.97	4.7	1200 ^b
8	N	4.98	1550 ^b	26	5.01	4.99	1500 ^b
9	N	4.80	1780 ^b	27	5.07	4.96	1960 ^b
10	N	4.69	2080 ^b	28	5.04	4.8	1820 ^b
11	N	4.74	2050 ^b	29	5.00	4.84	1900 ^b
12	N	4.76	1680 ^b	30	5.00	4.83	1860 ^b
13	N	4.69	1600 ^b	31	5.00	4.89	1940 ^b
14	N	4.65	1440 ^b	32	4.98	4.82	1760 ^b
15	N	4.57	1340 ^b	33	5.03	4.87	1920 ^b
16	N	4.57	1150 ^b	34	5.02	4.84	1800 ^b
17	N	4.54	1240 ^b	35	5.02	4.88	1840 ^b
18	N	4.57	1360 ^b	36	5.01	4.87	1800 ^b

ตารางที่ 14 (ต่อ)

เวลา (วัน)	pH เริ่มต้น	pH สุดท้าย	ปริมาณก๊าซ ชีวภาพ (ml/d)	เวลา (วัน)	pH เริ่มต้น	pH สุดท้าย	ปริมาณก๊าซ ชีวภาพ (ml/d)
37	5.02	4.83	1600 ^b	40	5.00	4.88	1770 ^b
38	5.07	4.9	1880 ^b	41	4.98	4.87	1680 ^b
39	5.00	4.85	1800 ^b	42	5.01	4.93	1620 ^b

หมายเหตุ ^a ทดลองที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 องศาเซลเซียส)

^b ทดลองที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

N ไม่ปรับ pH เริ่มต้นของการหมัก

จากการทดลองของ Chen *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก *Clostridium butyricum* CGS5 โดยใช้ sucrose เป็นสารตั้งต้น ในช่วง pH เริ่มต้น 5.0-6.5 พบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 5.5 ซึ่งสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ 2.78 mol/mol sucrose

จากการทดลองของ Chen *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจาก *Clostridium* ด้วยการหมักแบบ batch และ continuous พบว่า เมื่อทำการหมักแบบ batch ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้วัตถุดิบเป็นแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว มีความเข้มข้น 26.7 g COD/L และ pH เริ่มต้น 7.5 *C. butyricum* CGS2 และ *C. pasteurianum* CH5 มีอัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด 116 และ 118 ml/g VSS/h ตามลำดับ และผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็น 1.23 และ 1.28 mol H₂/mol glucose ตามลำดับ เมื่อ *C. butyricum* CGS2 หมักแบบ continuous ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้วัตถุดิบเป็นแป้งที่ผ่านการย่อยแล้ว มีความเข้มข้น 29.1 g COD/L และภายในถังหมักมีค่า pH อยู่ระหว่าง 5.8 และ 6.5 พบว่าเมื่อระยะเวลาเก็บกักสั้นลงจาก 12 ชั่วโมง เป็น 2 ชั่วโมง อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจาก 250 ml/g VSS/h เป็น 534 ml/g VSS/h ในขณะที่ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงจาก 2.03 mol H₂/mol glucose เป็น 1.50 mol H₂/mol glucose

จากการทดลองของ Pattra *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการหมักขานอ้อยที่ผ่านการย่อยแล้วโดย *Clostridium butyricum* ซึ่งดำเนินการทดลองในช่วง pH เริ่มต้นระหว่าง 5.5-8.0 พบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 g COD/L อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้น 5.5 มีผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนดีที่สุดที่สุดเป็น 1.73 mol H₂/mol total sugar และมีอัตราการผลิตไฮโดรเจน 1611 ml H₂/L/day

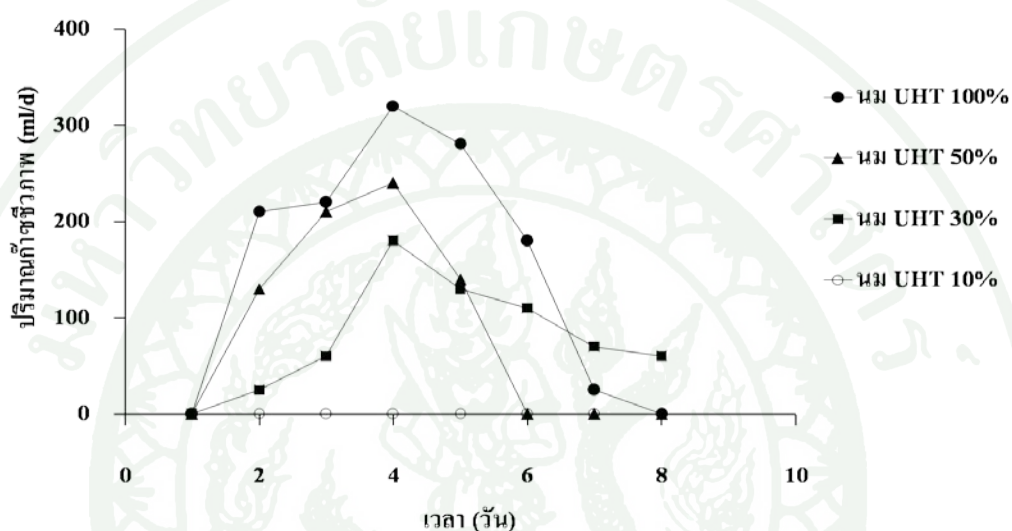
1.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดตะกอนกับปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

เมื่อนำนํ้านม UHT มาเจือจางจนมีความเข้มข้นเป็น 100 50 30 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณแล็กโทส 4.73 2.64 1.58 และ 0.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีน 53.13 26.57 15.94 และ 5.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปหมักเป็นเวลา 8 วัน จากภาพที่ 14 และตารางที่ 15 พบว่า ในวันที่ 4 *Clostridium* sp. สามารถเมแทบอลิซึมนํ้านม UHT ความเข้มข้น 100 50 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ผลิตก๊าซชีวภาพได้ปริมาณสูงสุด โดยมีปริมาณก๊าซชีวภาพเป็น 320 240 และ 180 มิลลิลิตรต่อวัน ตามลำดับ แต่ *Clostridium* sp. ไม่สามารถเมแทบอลิซึมนํ้านม UHT ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อผลิตก๊าซชีวภาพได้ แสดงว่า การเพิ่มความเข้มข้นของนํ้านม UHT ส่งผลให้ *Clostridium* sp. สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้เพิ่มขึ้น แต่นํ้านม UHT ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นที่น้อยเกินไปจน *Clostridium* sp. ไม่สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้

จากภาพที่ 15 พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของนํ้านม UHT ส่งผลให้ *Clostridium* sp. สามารถเมแทบอลิซึมนํ้านม UHT แล้วเกิดเป็นตะกอนเพิ่มขึ้น โดยนํ้านม UHT ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ เกิดตะกอนมากที่สุด และผลิตก๊าซชีวภาพมากที่สุด แต่นํ้านม UHT ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดตะกอนน้อยที่สุด และไม่มีการผลิตก๊าซชีวภาพเกิดขึ้น แสดงว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของนํ้านม UHT ส่งผลให้ *Clostridium* sp. สามารถเมแทบอลิซึมนํ้านม UHT แล้วเกิดเป็นตะกอนเพิ่มขึ้น และสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้เพิ่มขึ้นด้วย

เมื่อนํ้าของเหลวที่ผ่านการหมักจากนํ้านม UHT ความเข้มข้น 100 50 30 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มาวิเคราะห์ค่า pH พบว่า มีค่าเท่ากับ 3.29 3.10 3.57 และ 2.68 ตามลำดับ แล้วนำของเหลวนั้นมากรองเอาตะกอนออกแล้วทำการวิเคราะห์ พบว่า มีปริมาณโปรตีน 0.90 0.58 0.90 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนก่อนหมักพบว่า มีปริมาณโปรตีนลดลง 98.31 97.82 94.37 และ 99.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 16 ส่วนตะกอนซึ่งเกิดขึ้นจากการหมักเมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่า มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ และจากการทดลองของ

มัทนียา (2545) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนในน้ำทิ้งจากนมจืดอยู่ในช่วง 3.8-4.8 ดังนั้น ตะกอนที่เกิดขึ้นหลังจากการหมักของนํ้านม UHT ความเข้มข้น 100 50 30 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน แสดงว่า นํ้านม UHT ความเข้มข้นสูง มีปริมาณโปรตีนสูง เมื่อนํ้านม UHT นั้น ผ่านกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* sp. แล้ว จะเกิดตะกอนมากด้วย



ภาพที่ 14 ปริมาณก๊าซชีวภาพจากการหมักนํ้านม UHT ความเข้มข้น 100 50 30 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 15 ปริมาณก๊าซชีวภาพจากการหมักน้ำนม UHT ความเข้มข้น 100 50 30 และ 10 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (ml/day)			
	นม UHT 100%	นม UHT 50%	นม UHT 30%	นม UHT 10%
1	0	0	0	0
2	210	130	25	0
3	220	210	60	0
4	320	240	180	0
5	280	140	130	0
6	180	0	110	0
7	25	0	70	0
8	0	0	60	0

ตารางที่ 16 ปริมาณโปรตีนที่ลดลงและค่า pH ของน้ำนม UHT ที่ผ่านการหมัก เมื่อน้ำนม UHT มีความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของนม UHT (เปอร์เซ็นต์)	pH ของอาหารที่ผ่านการหมัก	ปริมาณโปรตีนที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์)
10	2.68	99.13
30	3.57	94.37
50	3.10	97.82
100	3.29	98.31

เวลา (วัน)	1	2	3	4	5	6	7	8
นม UHT 100%								
นม UHT 50%								
นม UHT 30%								
นม UHT 10%								

ภาพที่ 15 ลักษณะการเกิดตะกอนของนํ้านม UHT ความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการผลิตก๊าซชีวภาพด้วย *Clostridium* sp. พบว่า ถ้านำนํ้านม UHT มาเป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพจะเกิดการสะสมตะกอนโปรตีนขึ้น และปริมาณตะกอนโปรตีนที่เกิดขึ้นก็ยังคงมีความสัมพันธ์กับการผลิตก๊าซชีวภาพด้วย โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของนํ้านม UHT ส่งผลให้ *Clostridium* sp. สามารถเมแทบอลิซึมนํ้านม UHT แล้วเกิดเป็นตะกอนเพิ่มขึ้น และสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงต้องแยกโปรตีนออกจากรนํ้านมก่อน แล้วจึงนำนํ้านมที่ผ่านการแยกโปรตีนออกแล้วไปเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตก๊าซไฮโดรเจนต่อไป

2. การตกตะกอนโปรตีนในนํ้านมพาสเจอร์ไรส์

นำนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ชนิดจืด 4 ยี่ห้อ มาตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาศึกษาปริมาณต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ศึกษาปริมาณแล็กโทสและโปรตีน

เมื่อนำ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มาตกตะกอนนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ พบว่า ในของเหลวที่ผ่านการตกตะกอนมีปริมาณแล็กโทสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) โดยมีปริมาณแล็กโทสเฉลี่ยอยู่ในช่วง 52.92 ± 4.75 ถึง 49.67 ± 5.33 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 17 แสดงว่า การตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 ถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่อปริมาณแล็กโทสในนมที่ผ่านการตกตะกอน

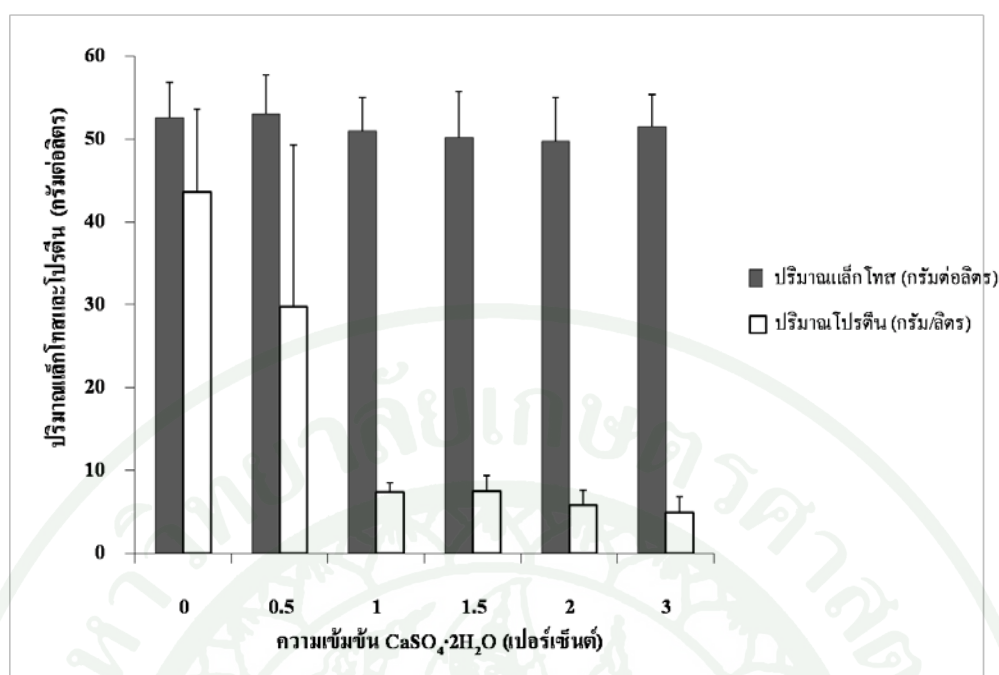
เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนในของเหลวที่ผ่านการตกตะกอน พบว่า เมื่อนำ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มาตกตะกอนนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ ส่งผลให้ของเหลวที่ผ่านการตกตะกอนมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 17 โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนในของเหลวที่ผ่านการตกตะกอนด้วยวิธีของ Tukey สามารถแบ่งปริมาณโปรตีนได้เป็นสองกลุ่มเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกัน โดยกลุ่มแรกคือ เมื่อนำ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มาตกตะกอนนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ส่งผลให้ของเหลวที่ผ่านการตกตะกอนมีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกัน ซึ่งมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 43.60 ± 9.96 และ 29.71 ± 19.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ กลุ่มที่สองคือ เมื่อนำ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มาตกตะกอนนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ส่งผลให้ของเหลวที่ผ่านการตกตะกอนมีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกัน ซึ่งมี

ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.91 ± 1.87 ถึง 7.44 ± 1.87 กรัมต่อลิตร (ดังตารางในภาคผนวก ข) แสดงว่า การเติม $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ พร้อมกับการให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่งผลให้โปรตีนบางส่วนเกิดการเสียสภาพ จนสามารถแยกโปรตีนส่วนนั้นออกจากนํ้านมได้ เนื่องจากความคงตัวของนํ้านมซึ่งได้รับความร้อนจะลดลงเมื่อมีแคลเซียมอิสระเพิ่มขึ้น โดยโปรตีนหลายชนิด เช่น α_1 -casein, α_2 -casein, β -casein และ β -lactoglobulin จะเกิดการเสียสภาพเมื่อมีแคลเซียมไอออนปริมาณสูง (Belitz, 2004) และที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้โปรตีน α -lactalbumin และ β -lactoglobulin เสียสภาพได้ (นิธิยา, 2551) จากการทดลองแสดงว่าการตกตะกอนนํ้านมควรใช้ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการใช้ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตกตะกอนโปรตีนได้ของเหลวที่มีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ดวงพร (2540) ที่นำ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มาตกตะกอนนมถั่วเหลือง

เมื่อนำ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มาตกตะกอนโปรตีน พบว่า อัตราส่วนของเหลวที่ได้ต่อนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ที่ใช้ เท่ากับ 60.33 ± 4.85 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

ตารางที่ 17 ปริมาณแล็กโทสและโปรตีนของนํ้านมที่ผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

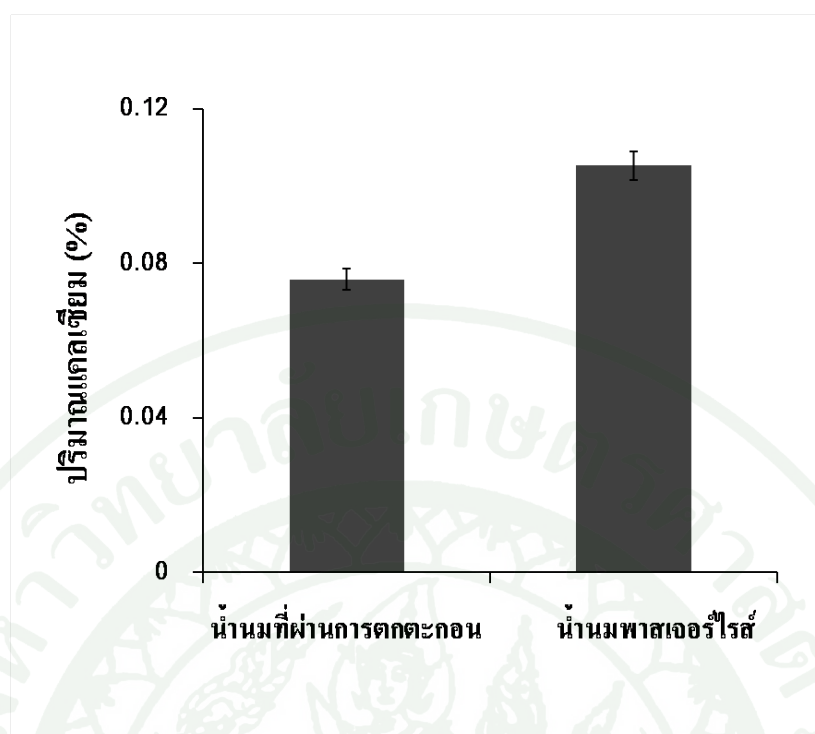
ปริมาณ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (เปอร์เซ็นต์)	นํ้านมที่ผ่านการตกตะกอน	
	ปริมาณแล็กโทส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโปรตีน (กรัม/ลิตร)
0.0	52.55 ± 4.33	43.60 ± 9.96
0.5	52.92 ± 4.75	29.71 ± 19.54
1.0	50.92 ± 4.07	7.33 ± 1.12
1.5	50.17 ± 5.48	7.44 ± 1.87
2.0	49.67 ± 5.33	5.80 ± 1.76
3.0	51.42 ± 3.94	4.91 ± 1.87



ภาพที่ 16 ปริมาณแล็กโทสและโปรตีนของนํ้านมซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2.2 ศึกษาปริมาณแคลเซียม

เมื่อเปรียบเทียบนํ้านมที่ผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0 เปอร์เซ็นต์ กับนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ พบว่า นํ้านมพาสเจอร์ไรส์มีปริมาณแคลเซียม $(105.33 \pm 3.79) \times 10^{-3}$ เปอร์เซ็นต์ (w/w) ส่วนนํ้านมที่ผ่านการตกตะกอนมีปริมาณแคลเซียม $(75.83 \pm 2.75) \times 10^{-3}$ เปอร์เซ็นต์ (w/w) ซึ่งน้อยกว่าปริมาณแคลเซียมในนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ ดังแสดงในภาพที่ 17 แสดงว่า การตกตะกอนนํ้านมพาสเจอร์ไรส์ด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ส่งผลให้ปริมาณแคลเซียมในนํ้านมที่ผ่านการตกตะกอนลดลง 28.01 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อมีแคลเซียมไอออนปริมาณสูงโปรตีนหลายชนิดภายในนํ้านมเกิดการเสียดสภาพ (Belitz *et al.*, 2004) การแยกโปรตีนออกไปอาจมีแคลเซียมบางส่วนออกไปด้วย จึงส่งผลให้นํ้านมที่ผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มีปริมาณแคลเซียมน้อยกว่านํ้านมพาสเจอร์ไรส์



ภาพที่ 17 ปริมาณกลูโคสในน้ำนมที่ผ่านการตกตะกอนและน้ำนมพาสเจอร์ไรส์

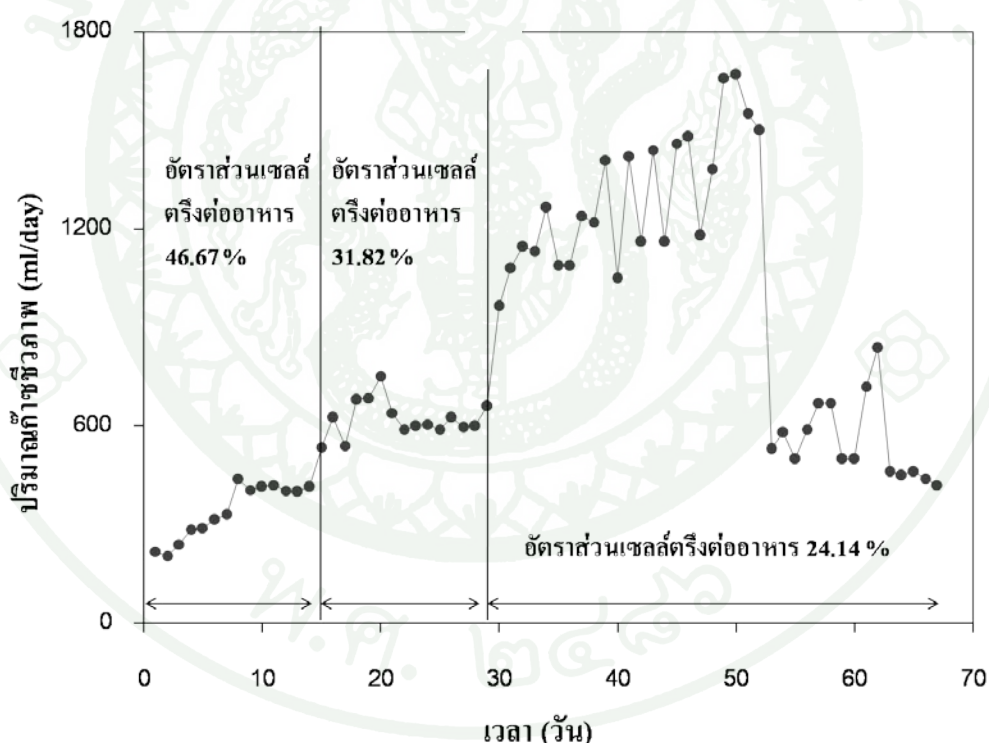
3. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึงของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462

นำเซลล์ตรึงของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ปริมาณ 35 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ packed bed ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยนำน้ำนมซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ มาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อมีอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาเก็บกัก 24 ชั่วโมง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ดังนี้

3.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น

จากภาพที่ 18 พบว่า เมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์ ถังหมักผลิตก๊าซชีวภาพได้ปริมาณ 600.71 ± 12.05 และ 409.67 ± 8.04 มิลลิลิตรต่อวัน แต่เมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ ถังหมักสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ปริมาณแตกต่างกันมาก จึงแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกถังหมักสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ปริมาณ 1394.29 ± 190.37 มิลลิลิตรต่อวัน ช่วงที่สองถังหมักสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ปริมาณ 555.33 ± 121.59 มิลลิลิตรต่อวัน แสดงว่า การลดอัตราส่วนปริมาณเซลล์

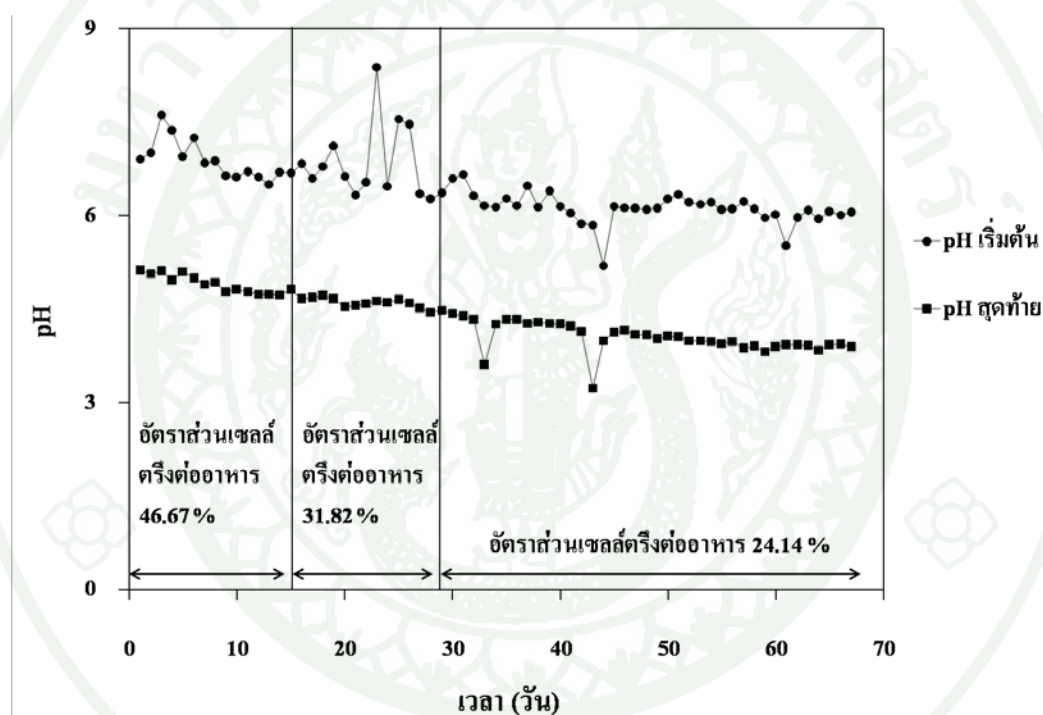
ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้ถึงหมักสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้เพิ่มขึ้น โดยเมื่ออัตราส่วน ปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้สูงสุดใน ช่วงแรก แต่ในช่วงที่สองถึงหมักกลับผลิตก๊าซชีวภาพได้ปริมาณลดลง เนื่องจากเซลล์ตรึงเกิดการ เสียสภาพ ซึ่งการตรึงเซลล์ด้วยวิธีดักจับ (entrapment) โครงสร้างของเจลสามารถถูกทำลายได้เมื่อ จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตภายในเจลและมีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Mansi *et al.*, 2007) และเมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงที่สอง ถึงหมักผลิตก๊าซชีวภาพได้เพิ่มขึ้นเป็น 720-840 มิลลิลิตรต่อวัน ในวันที่ 61-62 เนื่องจากการตรึง เซลล์ด้วยวิธีดักจับมีข้อจำกัดในการแพร่กระจายของสารอาหารสู่เซลล์ตรึงและเมื่อโครงสร้างของ เซลล์ตรึงถูกทำลายและปล่อยเซลล์อิสระออกมา (ภาวิณี, 2531) ถึงหมักจึงผลิตก๊าซชีวภาพได้ เพิ่มขึ้น แต่สภาพแวดล้อมภายในถึงหมักไม่เหมาะแก่การเจริญของ เซลล์อิสระ จึงส่งผลให้ถึงหมัก ผลิตก๊าซชีวภาพได้ลดลงอย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 18 ปริมาณก๊าซชีวภาพจากการหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์

3.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

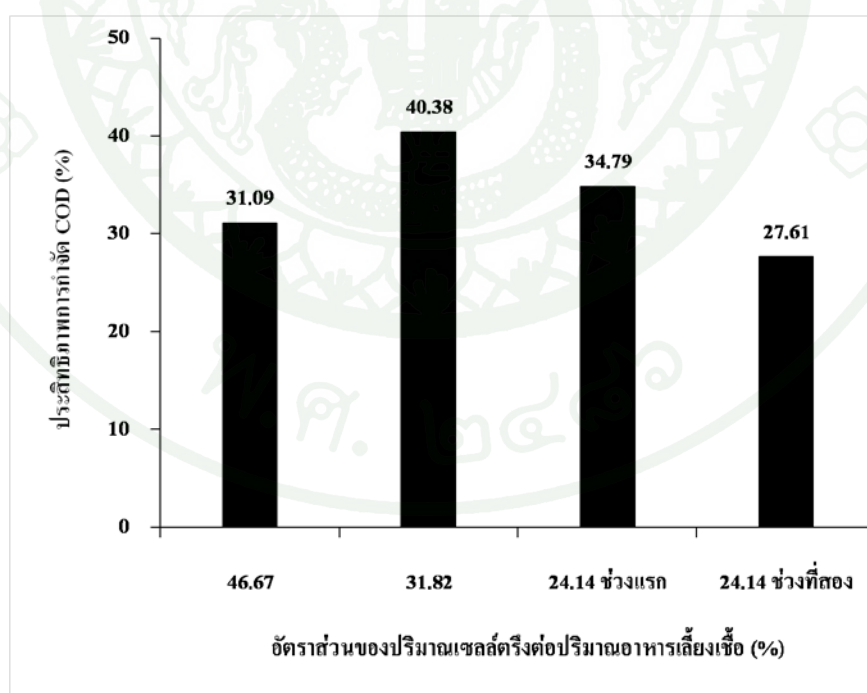
จากภาพที่ 19 พบว่า เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น pH ของอาหารก่อนและหลังหมักมีแนวโน้มลดลง โดยเมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 46.67 31.82 และ 24.14 เปอร์เซ็นต์ pH ของอาหารมีค่า 6.90 ± 0.32 6.86 ± 0.59 และ 6.18 ± 0.28 (ช่วงแรก) 6.03 ± 0.17 (ช่วงที่สอง) เมื่อหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหารมีค่า pH เท่ากับ 4.91 ± 0.15 4.62 ± 0.09 และ 4.14 ± 0.27 (ช่วงแรก) 3.91 ± 0.05 (ช่วงที่สอง) แสดงว่า เกิดการสะสมสารต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากการหมักในเซลล์ตึง เนื่องจาก *C. acetobutylicum* สร้าง primary metabolite เช่น ก๊าซไฮโดรเจน กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก เป็นหลัก (Girbal and Soucaille, 1994) ดังนั้นถ้ามีการสะสมของสารผลิตภัณฑ์ในเซลล์ตึง อาจส่งผลให้ pH ของอาหารลดลงได้



ภาพที่ 19 ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์

3.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า COD (chemical oxygen demand)

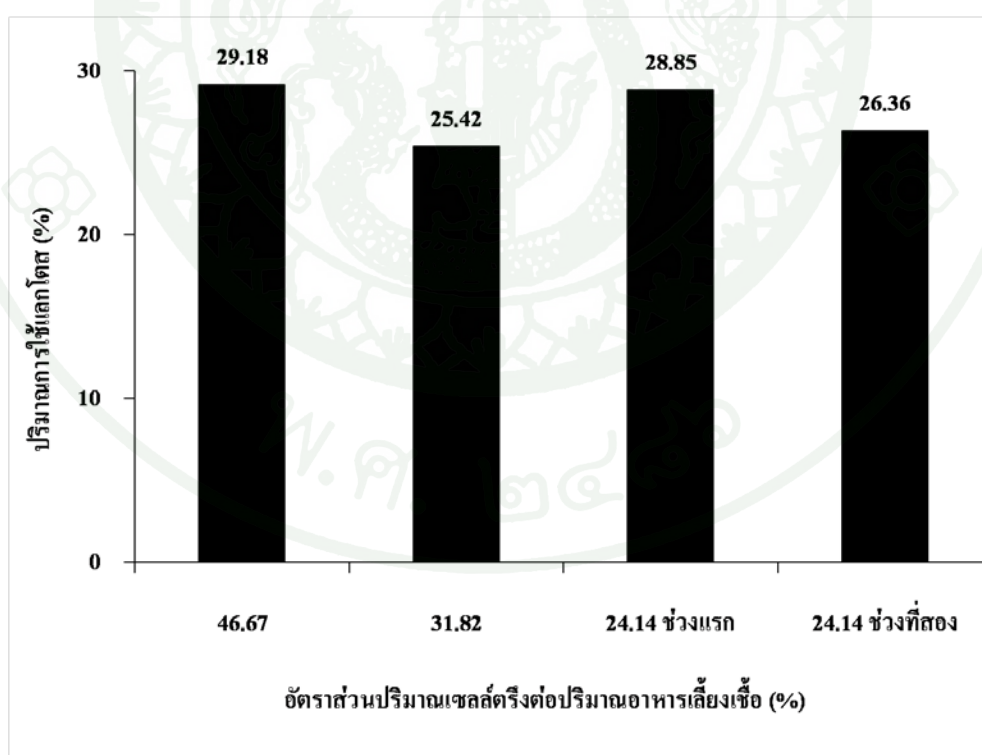
อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณ COD 82.44 ± 11.38 กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 46.67 31.82 และ 24.14 เปอร์เซ็นต์ อาหารที่ผ่านการหมักมีปริมาณ COD เป็น 54.37 ± 11.29 46.71 ± 11.23 และ 57.99 ± 10.00 (ช่วงแรก) 58.95 ± 10.31 (ช่วงที่สอง) กรัมต่อลิตร โดยมีประสิทธิภาพการกำจัด COD เท่ากับ 31.09 40.38 และ 34.79 (ช่วงแรก) 27.61 (ช่วงที่สอง) เปอร์เซ็นต์ (จากภาพที่ 20) โดยเมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 31.82 เปอร์เซ็นต์ ถึงหมักมีประสิทธิภาพการกำจัด COD สูงที่สุด คือ 40.38 เปอร์เซ็นต์ และเมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ ช่วงที่สอง ถึงหมักมีประสิทธิภาพการกำจัด COD ต่ำที่สุด คือ 27.61 เปอร์เซ็นต์ จากค่าประสิทธิภาพการกำจัด COD ของทั้ง 3 อัตราส่วน พบว่ามีประสิทธิภาพการกำจัด COD ต่ำ เนื่องจาก *C. acetobutylicum* มี metabolite ซึ่งสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจน กรดอะซิติก กรดบิวทิริก บิวทานอล อะซิโตน และเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ (Taha *et al.*, 1973; Abou-Zeid *et al.*, 1976; Compere and Griffith, 1979; Girbal and Soucaille, 1994)) โดยถือเป็นการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลเล็ก การกำจัด COD จึงเป็นเพียงส่วนน้อยเมื่อเทียบกับทั้งหมด



ภาพที่ 20 ประสิทธิภาพการกำจัด COD เมื่อหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์

3.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแลกโทส

อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณแลกโทส 41.98 ± 4.11 กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ต้งต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 46.67 31.82 และ 24.14 เปอร์เซ็นต์ อาหารซึ่งผ่านการหมักมีปริมาณแลกโทสลดลงเป็น 35.43 ± 1.84 33.70 ± 6.12 และ 28.10 ± 1.56 (ช่วงแรก) 29.21 ± 0.98 (ช่วงที่สอง) กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณการใช้แลกโทสเท่ากับ 29.18 ± 5.95 25.42 ± 10.27 และ 28.85 ± 4.74 (ช่วงแรก) 26.36 ± 3.46 (ช่วงที่สอง) เปอร์เซ็นต์ (ดังภาพที่ 21) พบว่า *C. acetobutylicum* TISTR 1462 มีปริมาณการใช้แลกโทสใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ต้งต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 46.67 เปอร์เซ็นต์ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้แลกโทสได้มากที่สุด ซึ่งยังมีปริมาณการใช้แลกโทสน้อย แสดงว่าควรเฝ้าระวังความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากสารอาหารจะซึมผ่านสารพหุหะก่อนที่เซลล์จะได้รับสารอาหาร ดังนั้นถ้าสารอาหารมีความเข้มข้นสูงจะทำให้สารละลายมีความหนืด ซึ่งจะส่งผลให้อัตราการแพร่กระจายของสารละลายอาหารเข้าไปยังเซลล์ได้น้อย (ภาวิณี, 2531) ปริมาณการใช้สารอาหารของเซลล์จึงน้อยด้วย

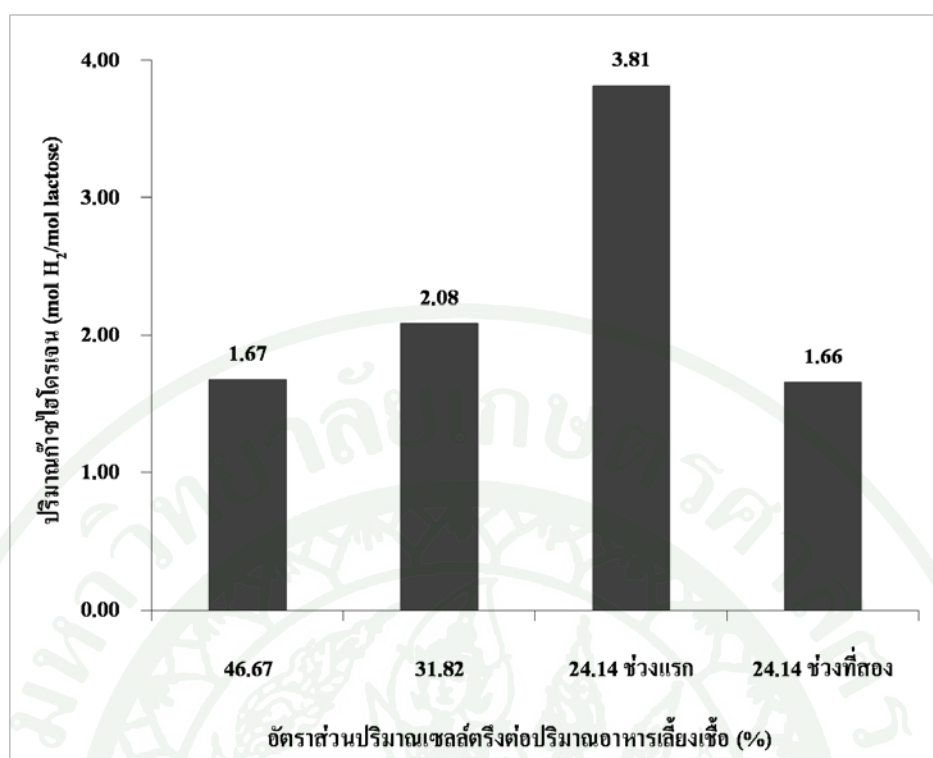


ภาพที่ 21 ปริมาณการใช้แลกโทสเมื่อหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ต้งต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองของ Mitchell *et al.* (2009) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและกรดบิวทิริก โดยการตรึง *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 ภายใน polyurethane ซึ่งเป็นการหมักแบบต่อเนื่อง ที่ระยะเวลาเก็บกัก (HRT) 8 10 12 และ 16.7 ชั่วโมง ความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อความเข้มข้นของกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ที่ HRT 8 และ 10 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนปริมาตรสูงสุด 20.7 และ 22.9 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ แต่ที่ HRT 16.7 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตไฮโดรเจนปริมาตร 15.1 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ เมื่อนำไปเทียบกับปริมาณกลูโคสแล้วเป็น 370 ml H₂/g glucose ซึ่งเป็นผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเมื่อเทียบกับกลูโคส และพบการล้างออก (wash out) ของกลูโคสสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 50 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณกลูโคสในน้ำทิ้ง 22.7 กรัมต่อลิตร ที่ HRT 16.7 ชั่วโมง

3.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

เมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 46.67 และ 31.82 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น 1.67 และ 2.08 โมลไฮโดรเจนต่อโมลแล็กโทส แต่เมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้นแตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งได้เป็นสองช่วง คือ ช่วงแรกมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจน 3.81 โมลไฮโดรเจนต่อโมลแล็กโทส ส่วนช่วงที่สองมีปริมาณก๊าซไฮโดรเจน 1.66 โมลไฮโดรเจนต่อโมลแล็กโทส (ภาพที่ 22) แสดงว่า การผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง โดยเมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีการสะสมของสารผลิตภัณฑ์ในเซลล์ตรึง (สังเกตจากค่า pH ซึ่งลดลงอย่างต่อเนื่อง) จึงส่งผลให้โครงสร้างของเซลล์ตรึงถูกทำลาย และปล่อยเซลล์อิสระออกจากเซลล์ตรึง (ภาวิณี, 2531) ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ จึงมีปริมาณแตกต่างกันมาก



ภาพที่ 22 ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเมื่อหมักด้วยอัตราส่วนปริมาณเซลล์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 31.82 และ 46.67 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองของ Zhang *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ในถังหมักแบบ unsaturated flow ซึ่งประกอบด้วยลูกแก้วและเชื้อบริสุทธิ์ โดยการหมักแบบต่อเนื่อง พบว่า ถังหมักผลิตก๊าซไฮโดรเจนเข้มข้น 74 ± 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเปลี่ยนแปลงจาก 1.0 ถึง 10.5 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นจาก 89 ถึง 220 ml/h L ของถังหมัก แต่ภายใน 60-72 ชั่วโมง ถังหมักจะเกิดการอุดตันจากชีวมวล

จากการทดลองของ Jo *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากเซลล์ตรึงของ *Clostridium tyrobutyricum* JM1 ในถังหมักแบบ fixed-bed ซึ่งประกอบด้วยโพลีเมอร์ polyurethane พบว่า ระยะเวลาเก็บกัก 2 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด $7.2 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ และก๊าซชีวภาพมีความเข้มข้นของไฮโดรเจน 50.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุดคือ 223 ml/g hexose

4. การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์อิสระของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462

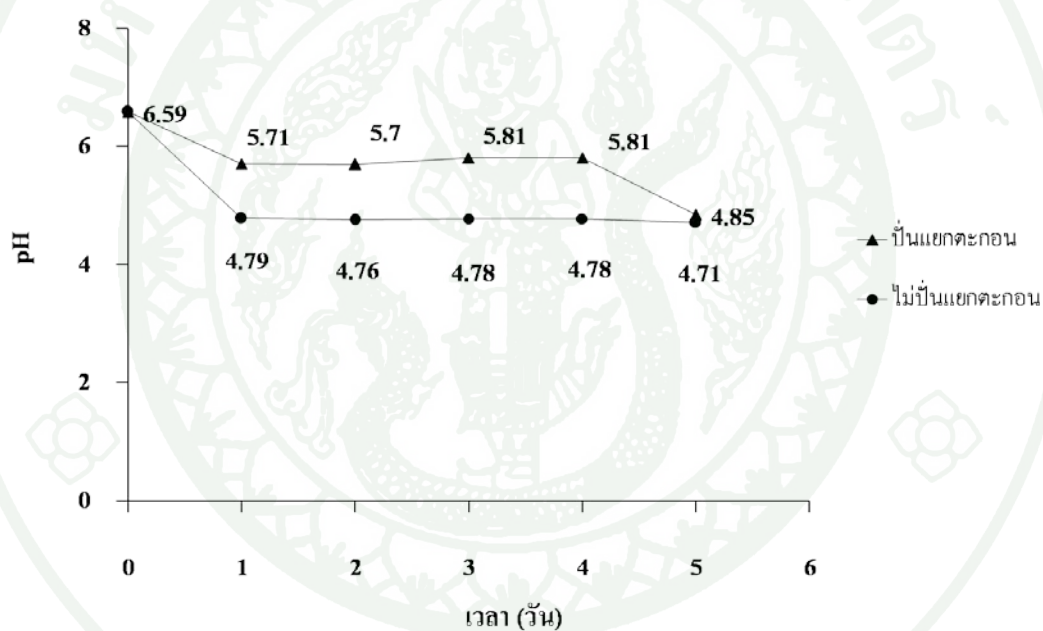
เมื่อนำของเหลวจากการตกตะกอน pH 6.59 แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกนำมาเลี้ยง *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ส่วนที่สองนำไปปั่นแยกตะกอน (centrifuge) ที่ความเร็ว 6000 rpm เป็นเวลา 14 นาที แล้วนำไปเลี้ยง *C. acetobutylicum* TISTR 1462

เมื่อนำของเหลวจากการตกตะกอนซึ่งไม่ผ่านการปั่นแยกตะกอนมาเลี้ยง *C. acetobutylicum* TISTR 1462 เป็นเวลา 5 วัน พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH ลดลงอยู่ในช่วง 4.71-4.79 (ดังภาพที่ 23) ซึ่ง *C. acetobutylicum* TISTR 1462 มีปริมาณการใช้แกล็กโทส 16.82 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนปริมาตร 655.21 มิลลิลิตร มีอัตราส่วนปริมาณก๊าซไฮโดรเจนกับแกล็กโทสเท่ากับ 4.17 โมลไฮโดรเจนต่อโมลแกล็กโทส (ดังตารางที่ 18) โดยวันที่ 1 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ความเข้มข้นและปริมาณสูงสุด เท่ากับ 55.80 เปอร์เซ็นต์ และ 418.50 มิลลิลิตรต่อวัน pH 4.79 มีปริมาณการใช้แกล็กโทส 1.23 กรัม ส่วนในวันที่ 2 ถึง 5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีความเข้มข้นและปริมาณลดลงเรื่อย ๆ (ดังภาพที่ 24) โดยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.50-17.08 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนอยู่ในช่วง 21.61-116.13 มิลลิลิตรต่อวัน pH มีค่าอยู่ในช่วง 4.78-4.71 และมีปริมาณการใช้แกล็กโทส 0.56-0.18 กรัม แสดงว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง *C. acetobutylicum* TISTR 1462 คือ 1 วัน โดยในวันที่ 2-5 ปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจน ปริมาณการใช้แกล็กโทส และค่า pH มีการลดลงอย่างมาก เนื่องจากเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 1 วัน pH ลดลงจาก 6.59 เหลือเพียง 4.79 ซึ่ง pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนอยู่ในช่วงระหว่าง 5.5 และ 6.5 (Cheng *et al.*, 2002) แต่ถ้า pH ลดลงเหลือเพียง 4.5 *C. acetobutylicum* จะเปลี่ยนไปผลิตตัวทำละลาย และไม่ผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Jones and Woods, 1986) จึงทำให้ในวันที่ 2 ถึง 5 มีปริมาณการผลิตก๊าซไฮโดรเจนลดลงอย่างมาก

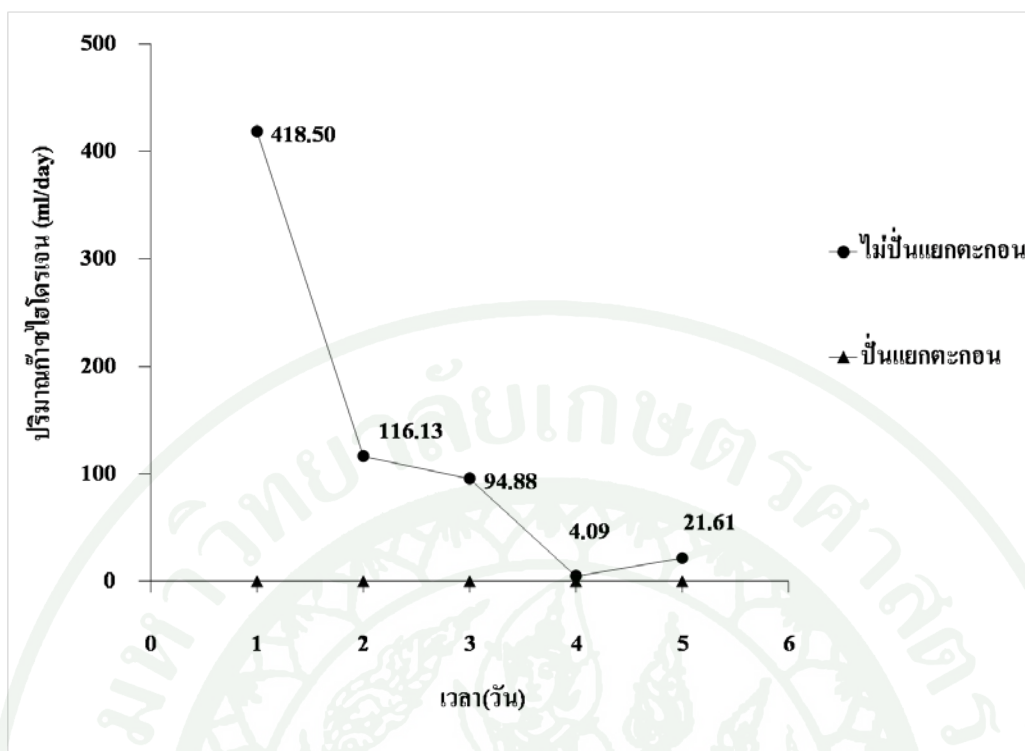
ส่วนของเหลวจากการตกตะกอนที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนออกเมื่อนำมาเลี้ยง *C. acetobutylicum* TISTR 1462 เป็นเวลา 5 วัน พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมี pH ลดลงอยู่ในช่วง 5.81-4.85 (ดังภาพที่ 23) ซึ่ง *C. acetobutylicum* TISTR 1462 มีปริมาณการใช้แกล็กโทส 15.38 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนปริมาตร 0.04 มิลลิลิตร (ดังตารางที่ 18 และภาพที่ 24) มีอัตราส่วนปริมาณก๊าซไฮโดรเจนกับแกล็กโทสเท่ากับ 2.77×10^{-4} โมลไฮโดรเจนต่อโมลแกล็กโทส โดย 4 วันแรกไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจนกระทั่งในวันที่ 5 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ปริมาณ 0.04 มิลลิลิตรต่อวัน มีความเข้มข้น 0.40 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 18 ปริมาณการใช้แล็กโทส ปริมาณไฮโดรเจน และผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นแยกตะกอนและไม่ปั่นแยกตะกอน

ลักษณะอาหาร	ปริมาณการใช้แล็กโทส (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มิลลิลิตร)	ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน (mol H ₂ /mol lactose)
ปั่นแยกตะกอน	15.38	0.04	2.77×10^{-4}
ไม่ปั่นแยกตะกอน	16.82	655.21	4.17



ภาพที่ 23 ค่า pH ของการหมักด้วยเซลล์อิสระที่เวลาต่าง ๆ



ภาพที่ 24 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนของการหมักด้วยเซลล์อิสระที่เวลาต่าง ๆ

แสดงว่าของเหลวจากการตกตะกอนที่ไม่ผ่านการปั่นแยกตะกอนเหมาะต่อการเลี้ยง *C. acetobutylicum* TISTR 1462 เพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนมากกว่าของเหลวจากการตกตะกอนที่ผ่านการปั่นแยกตะกอน โดยเมื่อมีปริมาณการใช้แกลกโตสใกล้เคียงกัน *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ปริมาณสูงกว่า เนื่องจากของเหลวจากการตกตะกอนอาจจะมีโปรตีนที่เสียสภาพแล้วแต่มีขนาดเล็กและโปรตีนที่ยังไม่เสียสภาพรวมอยู่ด้วย การปั่นแยกตะกอนจึงอาจทำให้โปรตีนในของเหลวจากการตกตะกอนแยกตัวออกไป จึงมีปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อการเจริญและผลิตก๊าซไฮโดรเจนของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 เพราะว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (สุวณี และ มวลัย, 2536) และ แอมโมเนียมไอออนยังมีส่วนกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น phosphofructokinase และ phosphotransacetylase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและอะซิเตทใน *C. acetobutylicum* (Uyeda and Kurooka, 1970; Hartmanis and Gatenbeck, 1984) และ โปรตีนยังเป็นประโยชน์ในการทำให้ pH คงที่ (Cheng *et al.*, 2002)

จากการทดลองของ Collet *et al.* (2004) ศึกษาผลิตไฮโดรเจนโดย *C. thermolacticum* ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยแล็กโทส พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งผสมแล็กโทส 29 mmol/L ที่ pH 7.0 อัตราการเจือจาง 0.28 h^{-1} *C. thermolacticum* ผลิตก๊าซไฮโดรเจน $3.0\text{ mol/mol lactose}$

จากการทดลองของ Lin *et al.* (2007) ศึกษาเมแทบอลิซึมและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ จากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วย *Clostridium* พบว่า เมื่อนำ Clostridia จำนวน 4 สปีชีส์ มาเลี้ยงในอาหารซึ่งผสมกลูโคส 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ peptone 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส และ pH 7.2 *C. acetobutylicum* M121 ผลิตก๊าซไฮโดรเจน $1.8 \pm 0.02\text{ mmol/mmol glucose}$ โดยทุกสายพันธุ์มีค่า pH ของอาหารลดลงจาก 7.2 เป็น 4.6 - 5.0

จากการทดลองของ Oh *et al.* (2009) ศึกษาเทคนิคการใช้ headspace ปริมาณมากเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 และสายพันธุ์กลาย M5 ซึ่งขาด megaplasmid พบว่า ในอาหารซึ่งผสมกลูโคส 7 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH 6.2 เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ผลิตก๊าซไฮโดรเจน $1.79 \pm 0.05\text{ mol/mol glucose}$

จากการทดลองของ Klein *et al.* (2010) ศึกษาอิทธิพลการ overexpression ของ hydrogenase ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วย *C. acetobutylicum* DSM 792 พบว่า ในอาหารซึ่งผสมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *C. acetobutylicum* DSM 792 (wild type) ผลิตก๊าซไฮโดรเจน $1.79\text{ mol/mol glucose}$

5. เปรียบเทียบการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462

จากการศึกษาเมื่อนำของเหลวจากการตกตะกอนที่ไม่ผ่านการปั่นแยกตะกอนมาเลี้ยงเซลล์อิสระของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 เป็นเวลา 1 วัน มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด จึงนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยเซลล์ตรึงของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 เมื่ออัตราส่วนปริมาณเซลล์ตรึงต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 24.14 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 วัน ซึ่งอัตราส่วนนี้เซลล์ตรึงสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้สูงสุด จากการเปรียบเทียบพบว่า เซลล์ตรึงมีปริมาณการใช้แล็กโทส 1.66 กรัม สามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนเข้มข้น 32.99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 460.03 มิลลิลิตร เมื่อนำปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเทียบกับปริมาณแล็กโทสที่เซลล์ตรึงใช้ไป เท่ากับ 3.81 โมลไฮโดรเจนต่อโมลแล็กโทส ส่วนเซลล์อิสระสามารถใช้น้ำตาลแล็กโทส 1.23 กรัม แล้ว

ผลิตก๊าซไฮโดรเจนเข้มข้น 55.80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 418.50 มิลลิตร เมื่อนำปริมาณก๊าซไฮโดรเจนเทียบกับปริมาณน้ำตาลเล็กโทสที่เซลล์อิสระใช้ไป เท่ากับ 4.67 โมลไฮโดรเจนต่อโมลเล็กโทส (ดังตารางที่ 19) แสดงว่า เซลล์อิสระสามารถนำเล็กโทสไปใช้ ในกิจกรรมของเซลล์แล้วผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ดีกว่าเซลล์ตรึง เนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีดักจับ (entrapment) มีข้อจำกัดในการแพร่กระจายของสารอาหาร และอาจมีการสะสมของสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น (ภาวิณี, 2531) ซึ่งการสะสมของสารผลิตภัณฑ์จะยับยั้งการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (Vazquez and Varaldo, 2009) จึงส่งผลให้เซลล์ตรึงสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้น้อยกว่าเซลล์อิสระ

ตารางที่ 19 ปริมาณการใช้เล็กโทสและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนของเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ

พารามิเตอร์	ชนิดของเซลล์	
	เซลล์ตรึง	เซลล์อิสระ
ปริมาณการใช้เล็กโทส (กรัม)	1.66	1.23
ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน (มิลลิตร)	460.03	418.50
ความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจน (เปอร์เซ็นต์)	32.99	55.80
ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนต่อปริมาณเล็กโทส (โมลไฮโดรเจนต่อโมลเล็กโทส)	3.81	4.67

6. การผลิตก๊าซมีเทนจากเชื้อผสม

นำเชื้อจุลินทรีย์จากบ่อบำบัดมูลสุกรแบบไร้ออกซิเจนซึ่งผ่านการปรับสภาพแล้วมาเป็นเชื้อเริ่มต้น เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) ในสภาวะไร้ออกซิเจน ปริมาตรการหมัก 2 ลิตร โดยนำของเหลวที่ผ่านการหมักจากถังผลิตก๊าซไฮโดรเจนมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีระยะเวลาพักเก็บ 67 40 และ 25 วัน แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ

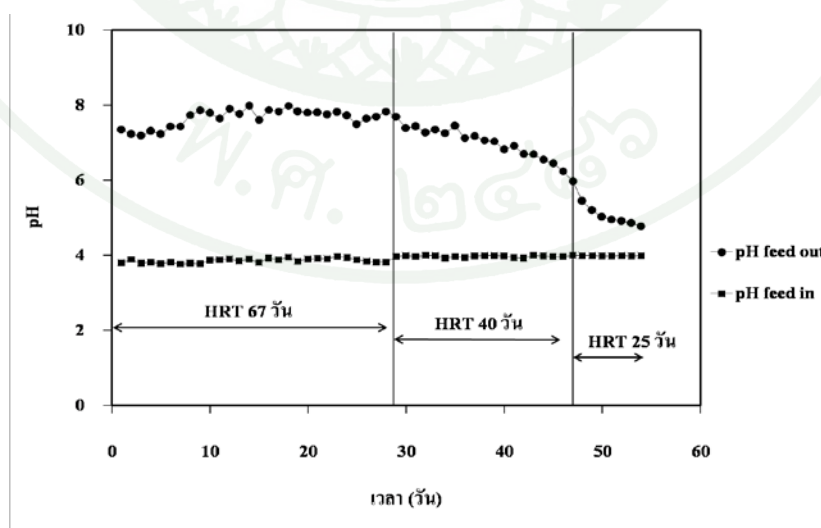
6.1 ศึกษาคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดลองนี้เป็นการใช้ของเหลวที่ผ่านการหมักจากถังผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีอัตราส่วนค่า BOD:COD เท่ากับ 0.57 เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งจากบ้านเรือนซึ่งมีค่า BOD:COD เท่ากับ 0.5 (สุเทพ, 2529) แสดงถึงความเป็นไปได้ในการนำของเหลวชนิดนี้มาบำบัดด้วยวิธีทางจุลชีววิทยา อัตราส่วน BOD:N:P ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 100:1.12:0.68 ซึ่งเป็น

อัตราส่วนที่สามารถบำบัดด้วยกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนได้ โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารต่าง ๆ เพิ่มให้กับระบบ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมีเทนต้องการไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในอัตรา 11 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นใหม่ ดังนั้นถ้าจุลินทรีย์ใช้สารอาหารในรูปของที่ถูกทำลายไป 1 กิโลกรัม เพื่อใช้สร้างเซลล์ใหม่ 0.1 กิโลกรัม จะทำให้อัตราส่วนของ BOD:N:P เป็น 100:1.1:0.2 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (อาริยา, 2546)

6.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

จากการศึกษาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนหมักที่ระยะเวลาเก็บกัก 67 40 และ 25 วัน พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 3.86 ± 0.06 3.97 ± 0.02 และ 3.99 ± 0.01 แต่เมื่อระยะเวลาเก็บกักลดลง ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังหมัก ซึ่งแสดงถึงค่า pH ภายในถังหมัก มีค่าลดลง โดยระยะเวลาเก็บกัก 67 40 และ 25 วัน มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.66 ± 0.24 7.03 ± 0.39 และ 5.14 ± 0.40 (ดังภาพที่ 25) โดยค่า pH ภายในถังหมักที่ระยะเวลาเก็บกัก 67 และ 40 วัน เป็นค่าที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียพวกที่สร้างก๊าซมีเทนคือ อยู่ในช่วง 6.8-7.2 (Gerardi, 2003) แต่ค่า pH ที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 วัน มีค่าต่ำกว่าช่วงที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียพวกที่สร้างก๊าซมีเทน และยังเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียพวกที่สร้างก๊าซมีเทนเนื่องจากค่า pH ซึ่งต่ำลง แสดงว่าแบคทีเรียเหล่านี้ใช้กรดอินทรีย์ระเหยไม่ทัน ทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยสะสมเพิ่มมากขึ้น ถ้าค่า pH ต่ำลงถึง 4.5-5.0 จะทำให้แบคทีเรียพวกที่สร้างก๊าซมีเทนหยุดการเจริญเติบโต (Acher and Kirsop, 1991)



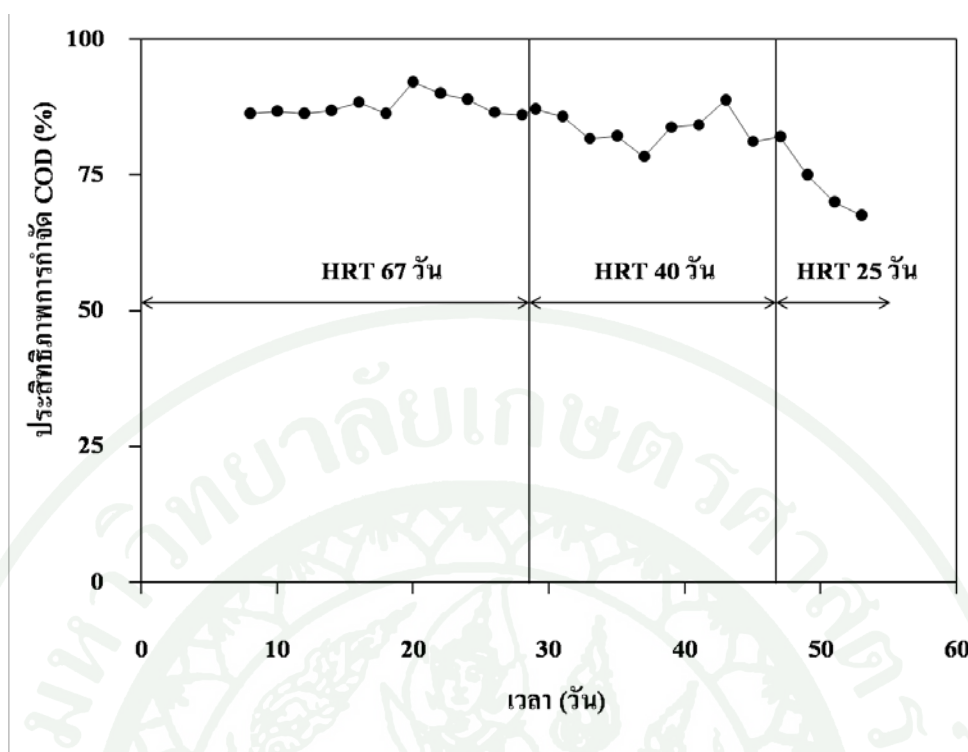
ภาพที่ 25 ค่า pH ของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน

6.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า COD

จากตารางที่ 20 และภาพที่ 26 พบว่าเมื่อระยะเวลาเก็บกักลดลง ประสิทธิภาพการกำจัด COD ก็ลดลงเช่นกัน โดยที่ระยะเวลาเก็บกัก 67 40 และ 25 วัน มีประสิทธิภาพการกำจัด COD เป็น 87.64 ± 1.97 83.64 ± 3.23 และ 73.62 ± 6.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากเมื่อระยะเวลาเก็บกักน้อยลงทำให้จุลินทรีย์ในระบบมีเวลาที่จะเมแทบอลิซึม (metabolize) สารอินทรีย์ต่าง ๆ น้อยลงด้วย ทำให้ระบบมีสารอินทรีย์เหลืออยู่มาก ระบบจึงมีประสิทธิภาพการกำจัดสารอินทรีย์ต่ำลง โดยสอดคล้องกับการทดลองของอาริยา (2546) ซึ่งศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพจากเศษอาหารด้วยกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบสองขั้นตอน พบว่าระบบมีประสิทธิภาพการกำจัด COD เป็น 90.13 87.93 85.62 และ 82.11 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีระยะเวลาเก็บกัก 35 30 25 และ 20 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 20 ค่า COD และปริมาณการกำจัด COD ที่ระยะเวลาเก็บกักต่าง ๆ

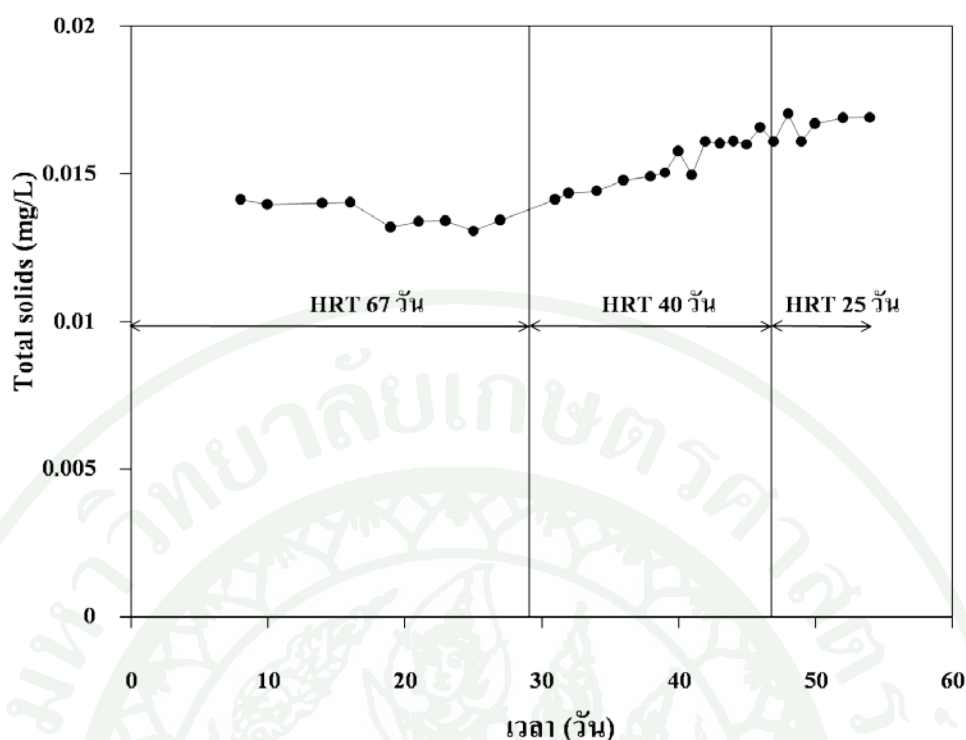
ระยะเวลาเก็บกัก (วัน)	ค่า COD เริ่มต้น (g/L)	ค่า COD สุดท้าย (g/L)	ปริมาณการกำจัด COD (%)
25	77.36 ± 3.97	20.43 ± 5.31	73.62 ± 6.39
40	56.90 ± 12.84	19.61 ± 14.64	83.64 ± 3.23
67	64.53 ± 5.99	7.88 ± 0.83	87.64 ± 1.97



ภาพที่ 26 ประสิทธิภาพการกำจัด COD ของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน

6.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมด

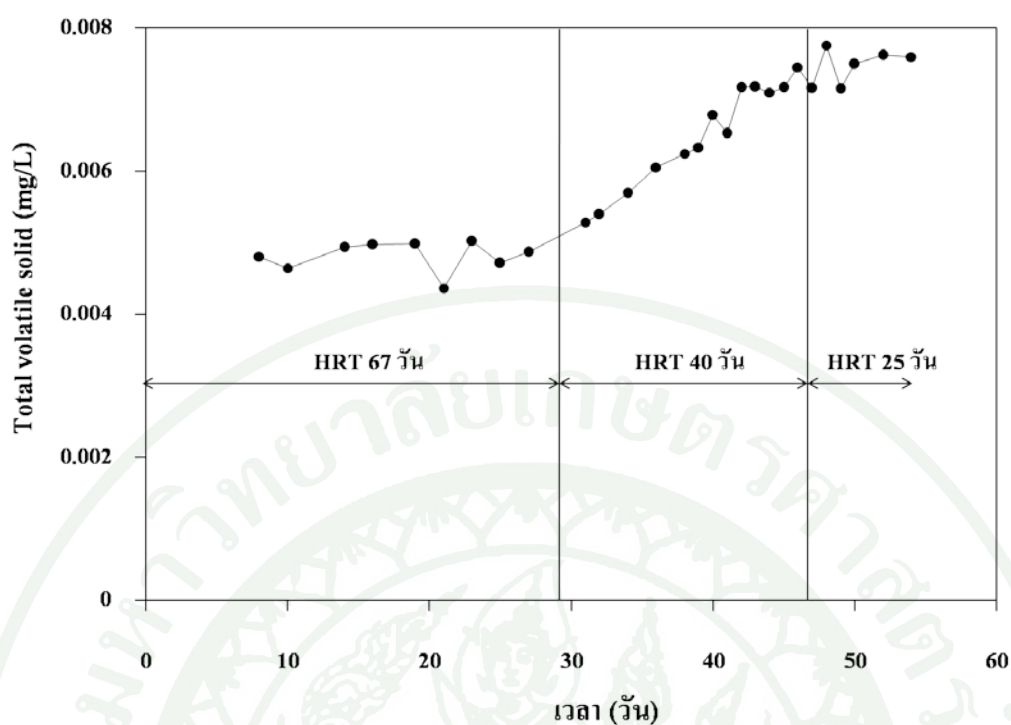
ปริมาณของแข็งทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น $(4.86 \pm 0.43) \times 10^{-2}$ มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ระยะเวลาเก็บกัก 67 40 และ 25 วันภายในถังหมักมีปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น $(1.35 \pm 0.04) \times 10^{-2}$ $(1.51 \pm 0.07) \times 10^{-2}$ และ $(1.65 \pm 0.04) \times 10^{-2}$ มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ดังภาพที่ 27) ซึ่งของเหลวภายในถังหมักควรมีปริมาณของแข็งน้อยกว่า 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Gerardi, 2003) จุลินทรีย์ภายในถังหมักสามารถลดปริมาณของแข็งทั้งหมดลงได้ 72.26 68.87 และ 65.99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีระยะเวลาเก็บกัก เป็น 67 40 และ 25 วัน ตามลำดับ แสดงว่าเมื่อระยะเวลาเก็บกัก ลดลง การกำจัดปริมาณของแข็งทั้งหมดก็ลดลงเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของอารียา (2546) ที่ศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพจากเศษอาหารด้วยกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบสองขั้นตอน พบว่า ถังหมักสามารถลดปริมาณของแข็งทั้งหมดลง 84.34 79.75 77.48 และ 75.29 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีระยะเวลาเก็บกัก 35 30 25 และ 20 วัน ตามลำดับ



ภาพที่ 27 ปริมาณของแข็งทั้งหมดของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน

6.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแข็งระเหยทั้งหมด

ปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมดของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น $(3.96 \pm 0.42) \times 10^{-2}$ มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ระยะเวลาเก็บกัก 67 40 และ 25 วันภายในถังหมักมีปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น $(0.48 \pm 0.02) \times 10^{-2}$ $(0.63 \pm 0.07) \times 10^{-2}$ และ $(0.74 \pm 0.02) \times 10^{-2}$ มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 28) จุลินทรีย์ภายในถังหมักสามารถลดปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมดลงได้ 87.80 84.00 และ 81.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีระยะเวลาเก็บกักเป็น 67 40 และ 25 วัน ตามลำดับ แสดงว่าเมื่อระยะเวลาเก็บกักลดลง การกำจัดปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมดก็ลดลงเช่นกัน



ภาพที่ 28 ปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมดของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน

6.6 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซมีเทน

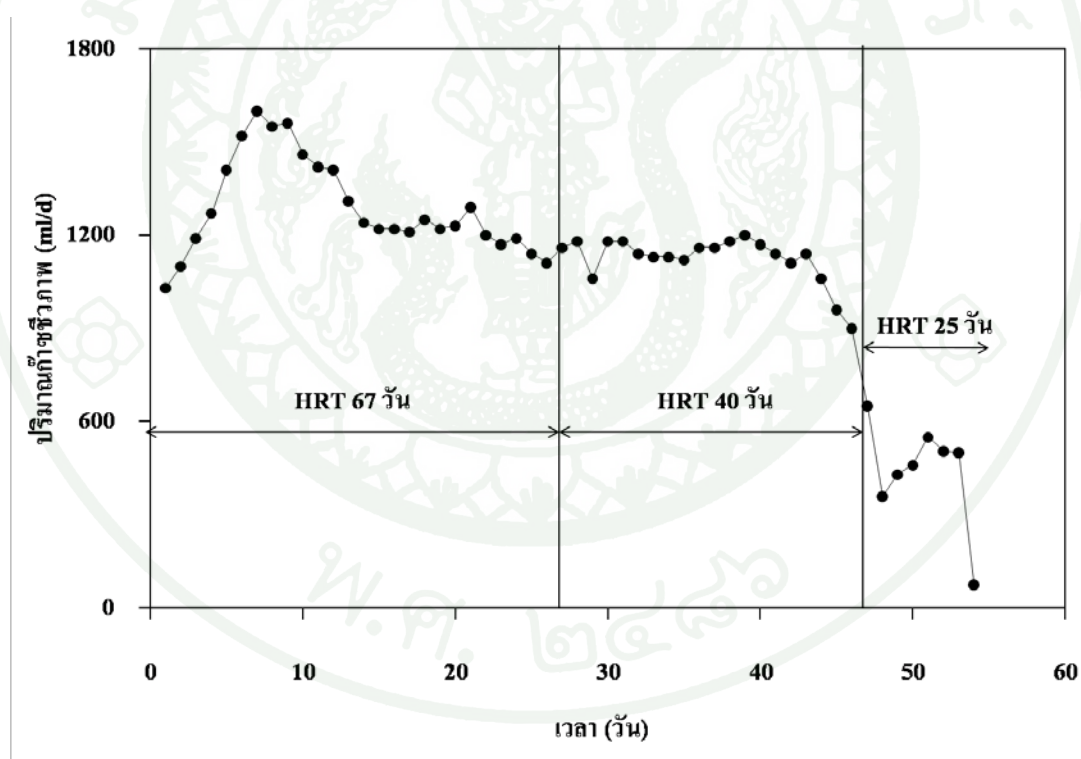
เมื่อเติมอาหารแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยเปลี่ยนระยะเวลาเก็บกักเป็น 3 ช่วง คือ 67 40 และ 25 วัน แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซชีวภาพ พบว่า ระยะเวลาเก็บกัก 67 และ 40 วัน ถึงหมักผลิตก๊าซชีวภาพปริมาณใกล้เคียงกัน โดยระยะเวลาเก็บกัก 67 วัน ถึงหมักผลิตก๊าซชีวภาพเฉลี่ย 1199.29 ± 45.99 มิลลิลิตรต่อวัน และระยะเวลาเก็บกัก 40 วัน ถึงหมักผลิตก๊าซชีวภาพเฉลี่ย 1152.86 ± 26.73 มิลลิลิตรต่อวัน ส่วนระยะเวลาเก็บกัก 25 วัน ถึงหมักผลิตก๊าซชีวภาพเฉลี่ย 503.75 ± 36.83 มิลลิลิตรต่อวัน ซึ่งมีปริมาณน้อยที่สุด (ดังตารางที่ 21 และภาพที่ 29)

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณก๊าซมีเทน พบว่า ระยะเวลาเก็บกัก 25 วัน ถึงหมักผลิตก๊าซมีเทนได้ปริมาณน้อยที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 315.00 ± 23.03 มิลลิลิตรต่อวัน ส่วนระยะเวลาเก็บกัก 67 และ 40 วัน ถึงหมักผลิตก๊าซมีเทนได้ใกล้เคียงกัน โดยระยะเวลาเก็บกัก 67 วัน ผลิตก๊าซมีเทนปริมาณ 1032.48 ± 39.59 มิลลิลิตรต่อวัน และระยะเวลาเก็บกัก 40 วัน ผลิตก๊าซมีเทนปริมาณ 1008.54 ± 23.38 มิลลิลิตรต่อวัน (ดังตารางที่ 21)

ที่ระยะเวลาเก็บกัก 67 และ 40 วัน ก๊าซชีวภาพมีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนใกล้เคียงกัน คือ 86.09 และ 87.48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาเก็บกัก 25 วัน มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนน้อยที่สุด คือ 62.53 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 ปริมาณก๊าซชีวภาพและปริมาณก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก ต่าง ๆ

ระยะเวลาเก็บกัก (วัน)	ปริมาณก๊าซชีวภาพ (ml/d)	ความเข้มข้นของก๊าซมีเทน (%)	ปริมาณก๊าซมีเทน (ml/d)
25	503.75	62.53	315.00
40	1,152.86	87.48	1,008.54
67	1,199.29	86.09	1,032.48



ภาพที่ 29 ปริมาณก๊าซชีวภาพของการหมักเพื่อผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 40 และ 67 วัน

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ พบว่า ที่ระยะเวลาเก็บกัก 25 วัน ภายในถังหมักมีค่า pH เป็น 5.14 ± 0.40 ซึ่งเป็น pH ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสร้างมีเทน มีปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมดมากที่สุด มีประสิทธิภาพการกำจัด COD ต่ำที่สุด

และมีปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพน้อยที่สุด ส่วนระยะเวลาเก็บกัก 67 และ 40 วัน มีการเปลี่ยนแปลงค่าต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน แต่ในช่วงหลังของการหมักที่ระยะเวลาเก็บกัก 40 วัน pH ภายในถังหมักมีค่าต่ำกว่า 6.8 (ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสร้างมีเทน) ปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณก๊าซชีวภาพมีแนวโน้มลดลง แสดงว่า ระยะเวลาเก็บกัก 40 และ 25 วัน น้อยเกินไปส่งผลให้จุลินทรีย์ในถังหมักมีเวลาที่จะเมแทบอลิซึม (metabolize) สารต่าง ๆ น้อย ทำให้ระบบมีสารอาหารเหลืออยู่มาก จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมภายในถังหมักซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสร้างมีเทน ดังนั้นระยะเวลาเก็บกัก 67 วัน จึงเหมาะสมสำหรับการผลิตก๊าซมีเทน โดยใช้ของเหลวที่ผ่านการหมักจากถังผลิตก๊าซไฮโดรเจนมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ สอดคล้องกับการทดลองของ Yan *et al.* (1988) ซึ่งศึกษาการผลิตก๊าซมีเทนโดยเวย์จากชีส เมื่อใช้ถังหมักแบบ upflow sludge blanket พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารอาหารเข้าสู่ระบบคงที่ อัตราการผลิตก๊าซมีเทน ($\text{LCH}_4 \text{ g}^{-1} \text{COD d}^{-1}$) ลดลง เมื่อระยะเวลาเก็บกักลดลง โดยระยะเวลาเก็บกักที่สั้นมีผลต่ออัตราการผลิตก๊าซมีเทนอย่างมาก เมื่อสารอาหารเข้าสู่ระบบมีความเข้มข้นสูง

จากการทดลองของ Kavacik and Topaloglu (2010) ศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพจากการย่อยสลายผสมของเวย์จากชีสและปุยคอก พบว่า เมื่อส่วนผสมมีปริมาณของแข็งทั้งหมด 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้สูงสุด $1.510 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ที่ระยะเวลาเก็บกัก 5 วัน มีอัตราการผลิตก๊าซมีเทน 60 ± 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ระยะเวลาเก็บกัก 10 วัน มีประสิทธิภาพการกำจัด ของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหยทั้งหมด และ COD สูงสุดเป็น 49.5 49.4 และ 54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการทดลองของ Desai *et al.* (1994) ศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาเก็บกักต่อการผลิตก๊าซมีเทนจาก มูลวัว ของเสียจากสัตว์ปีก และเวย์จากชีส พบว่า สามารถผลิตก๊าซชีวภาพสูงสุด 2.2 L L^{-1} ของถังหมัก d^{-1} เป็นก๊าซมีเทน 62 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาเก็บกัก 10 วัน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพการกำจัด COD 71 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ส่วนผสมของมูลวัว ของเสียจากสัตว์ปีก และเวย์จากชีส ในอัตรา 2:1:3 (w/w)

จากการทดลองของ Yang *et al.* (2003) ศึกษาการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการแอสซิโดเจเนซิสจากน้ำเสียชีสเวย์และการผลิตมีเทน พบว่า ในกระบวนการแอสซิโดเจเนซิส อัตราการผลิตกรดอะซิติก และกรดบิวทิริก สูงสุด คือ ระยะเวลาเก็บกัก 0.40 วัน pH 6.0 อุณหภูมิ 54.1 องศาเซลเซียส และระยะเวลาเก็บกัก 0.22 วัน pH 6.5 อุณหภูมิ 51.9 องศา

เซลล์ชีส ตามลำดับ โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดอะซิติกเพื่อผลิตก๊าซมีเทน การหมักแบบสองขั้นตอนนี้มีอัตราการผลิตก๊าซมีเทน 43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการหมักแบบขั้นตอนเดียว

จากการทดลองของ Venetsaneas *et al.* (2009) ศึกษาการใช้เวย์จากชีสเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและมีเทน โดยกระบวนการหมักสองขั้นตอนแบบต่อเนื่อง พบว่า การหมักเวย์ซึ่งไม่ถูกเจือจางที่สภาวะ mesophilic ระยะเวลาเก็บกัก 24 ชั่วโมง เมื่อควบคุม pH 5.2 ด้วยการเติม NaHCO_3 มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน $0.78 \pm 0.05 \text{ mol H}_2 / \text{mol}$ กลูโคสบริโภคน ส่วนการควบคุม pH อย่างอัตโนมัติ มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจน $0.61 \pm 0.04 \text{ mol H}_2 / \text{mol}$ กลูโคสบริโภคน น้ำทิ้งจากการผลิตก๊าซไฮโดรเจนถูกย่อยต่อโดยถังหมักเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพในสภาวะ mesophilic อย่างต่อเนื่อง ที่ระยะเวลาเก็บกัก 20 วัน ผลิตก๊าซมีเทนประมาณ 1 L/วัน และ 6.7 ลิตรของมีเทนต่อลิตรของอาหารที่เข้าระบบ

เมื่อนำของเหลวที่ผ่านการหมักจากถังหมักผลิตก๊าซมีเทนที่ระยะเวลาเก็บกัก 67 วัน มาศึกษาปริมาณธาตุอาหาร พบว่ามีปริมาณดังนี้ ไนโตรเจน 0.21 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ฟอสฟอรัส $0.02 \pm (1.63 \times 10^{-3})$ เปอร์เซ็นต์ (w/w) โพแทสเซียม $0.15 \pm (2.36 \times 10^{-3})$ เปอร์เซ็นต์ (w/w) แคลเซียม $0.07 \pm (5.19 \times 10^{-3})$ เปอร์เซ็นต์ (w/w) และแมกนีเซียม $(5.00 \times 10^{-3}) \pm 0$ เปอร์เซ็นต์ (w/w) แสดงว่าของเหลวที่ผ่านการหมักจากถังหมักผลิตก๊าซมีเทนมีปริมาณธาตุอาหารต่าง ๆ น้อยจึงไม่เหมาะที่จะนำของเหลวที่ผ่านการหมักจากถังหมักผลิตก๊าซมีเทนมาใช้เป็นปุ๋ย

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

เมื่อนำผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้งมาเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตก๊าซไฮโดรเจนซึ่งเป็นขั้นตอนแรกของการผลิตก๊าซชีวภาพซึ่งมีการผลิตก๊าซมีเทนในขั้นตอนที่สอง พบว่าเกิดการสะสมของกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น ทำให้โปรตีนในน้ำนมตกตะกอน ดังนั้นจึงต้องแยกโปรตีนออกจากน้ำนมโดยการผสมกับ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำนม ให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เกิดการตกตะกอนโปรตีนและแยกออกก่อนนำของเหลวไปเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป

สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการหมักแบบสองขั้นตอนในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยแบ่งการหมักเป็นสองถัง ซึ่งถังหมักแรกสามารถผลิตก๊าซชีวภาพที่มีความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนเป็น 32.99 เปอร์เซ็นต์ จากเซลล์ตรง และ 55.80 เปอร์เซ็นต์ จากเซลล์อิสระ ส่วนถังหมักที่สองสามารถผลิตก๊าซชีวภาพที่มีความเข้มข้นของก๊าซมีเทนเป็น 86.09 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองนี้สามารถปรับปรุงคุณภาพก๊าซชีวภาพที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้งได้โดยก๊าซชีวภาพมีความเข้มข้นของก๊าซไฮโดรเจนและมีเทนเพิ่มขึ้น เนื่องจากโดยทั่วไปก๊าซชีวภาพประกอบด้วยก๊าซมีเทน 55-65 เปอร์เซ็นต์ ก๊าซไฮโดรเจน 0-1 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซชนิดอื่น ๆ (Polprasert, 1996)

ข้อเสนอแนะ

การเพิ่มปริมาณก๊าซไฮโดรเจนจากการหมักผลิตภัณฑ์นมเหลือทิ้ง หากต้องการให้กระบวนการหมักเป็นไปอย่างต่อเนื่อง ขึ้นแรกควรแยกโปรตีนในนมออกไปก่อน หลังจากนั้นจึงนำไปผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วยเซลล์ตรึงของเชื้อ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังแรก ถึงแม้ว่าผลผลิตจากการหมักด้วยเซลล์อิสระจะให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนมากกว่าเซลล์ตรึง แต่การหมักด้วยเซลล์อิสระจะมีปัญหาในการแยกเซลล์ออกจากของเหลวเพื่อนำไปหมักต่อในถังมีเทน

ส่วนขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเทนนั้น มีความน่าสนใจที่จะทดลองในรูปแบบเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงของแบคทีเรียที่สร้างมีเทน แบบถังหมักใบเดียว (หมักกรด + หมักมีเทน) และถังหมักสองถัง (หมักกรดถังแรก + หมักมีเทนถังที่สอง) เพื่อต้องการหาระบบผลิตก๊าซไฮโดรเจน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ดวงพร สามีตติยะ. 2540. การใช้น้ำผลไม้ตระกูลส้มเป็นตัวตกตะกอนต่อคุณภาพของเต้าหู้แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดิยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์. 2549. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ *Lactococcus lactis* IO-1 โดยวิธี Taguchi. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิธิยา รัตนานนท์. 2551. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ฟิลิฐ ศรีสุริยจันทร์. 2540. การบำบัดน้ำเสียโรงนมโดยแบคทีเรียแลกติก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพลิน เหล็กทอง. 2546. คู่มือการวิเคราะห์พืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2548. ตำราปฏิบัติการชีวเคมีเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 4 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2552. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 6 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. การตรึงเอนไซม์และเซลล์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

มัทนียา จงนิตยกาล. 2545. การบำบัดน้ำทิ้งขั้นต้นของโรงนมด้วยแบคทีเรียแลกติก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มันสิน ตันทุลเวศม์. 2540. คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

รังสิณี โสธรวิทย์. 2553. เคมี่และจุลชีวะวิทยาเบื้องต้นของอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิวลี ไทยถาวร. 2537. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. ศูนย์ปฏิบัติการพิมพ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, ปทุมธานี.

สุวณี สุกเวชย์ และ มาลัย วรจิตร. 2536. แบคทีเรียพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 1 โรงพิมพ์ศิริยอด จำกัด, กรุงเทพฯ.

สุเทพ สิริวิทยาปกรณ์. 2529. ระบบบำบัดน้ำปฏิกูลจากบ้านพักอาศัย เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการ เรื่องการออกแบบระบบบำบัดน้ำเสียจากชุมชนมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมใจ ศิริโชค. 2544. จุลชีวะวิทยาอุตสาหกรรม. บริษัท พิมพ์ดี จำกัด, กรุงเทพฯ.

อารียา วิรัชวรกุล. 2546. การผลิตก๊าซชีวภาพจากเศษอาหารโดยกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนแบบสองขั้นตอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุษากร นิยม. 2535. การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานโดยระบบแอกซิเวตเต็ดสลัดจ์และระบบฟอกซ์เบดแอเรชั่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adams, M.W. 1990. The structure and mechanism of iron-hydrogenase. **Biochim. Biophys. Acta.** 1020: 115–45.

- Andersch, W., H. Bahl and G. Gottschalk. 1983. Level of enzymes involved in acetate butyrate acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. **Eur. J. Appl. Microbiol.** 18: 327–32.
- Archer, D.B. and B.H. Kirsop. 1991. The microbiology and control of anaerobic digestion, pp.49-91. In A.W., ed. **Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology**. Elsevier Applied Science Publisher, London.
- Baffert, C., M. Demuez, L. Cournac, B. Burlat, B. Guigliarelli and P. Bertrand. 2008. Hydrogen activating enzymes: activity does not correlate with oxygen sensitivity. **Angew. Chem. Int. Edit.** 47: 2052–4.
- Ballongue, J., J. Amine, H. Petitdemange and R. Gay. 1986. Regulation of acetate kinase and butyrate kinase by acids in *Clostridium acetobutylicum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 35: 295–301.
- Blangy, D., H. Buc and Monod J. 1968. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** 31: 13–35.
- Belitz, H.D., Grosch W. and Schieberle P. 2004. **Food Chemistry**. Springer-Verlage, Germany.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed. The William and Wilkins Co., Baltimore.
- Chen, W.M., Z.J. Tseng, K.S. Lee and J.S. Chang. 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **Int. J. Hydrogen Energ.** 30: 1063–70.
- Chen, S.D., K.S. Lee, Y.C. Lo, W.M., Chen J.F. Wu, C.Y. Lin and J.S. Chang. 2008. Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species. **Int. J. Hydrogen Energ.** 33: 1803–1812.

- Cheng, S.S., S.M. Chang and S.T. Chen. 2002. Effects of volatile fatty acids on a thermophilic anaerobic hydrogen fermentation process degrading peptone. **Water Sci. Technol.** 46: 209-14.
- Collet, C., N. Adler, J.P. Schwitzguebel and P. Peringer. 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. **Int. J. Hydrogen Energ.** 29: 1479-1485.
- Compere, A.L. and W.L. Griffith. 1979. Evaluation of substrates for butanol production. **Dev. Ind. Microbiol.** 20: 509-17.
- Cynkin, M.A. and E.A. Delwiche. 1958. Metabolism of pentoses by clostridia. I. Enzymes of ribose dissimilation in extracts of *Clostridium perfringens*. **J. Bacteriol.** 75: 331-4.
- Demuez, M., L. Cournac, O. Guerrini, P. Soucaille and L. Girbal. 2007. Complete activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners. **FEMS Microbiol. Lett.** 275: 113-21.
- Desai, M., V. Patel and D. Madamwar. 1994. Effect of temperature and retention time on biomethanation of cheese whey poultry waste cattle dung. **Environ. Pollut.** 83:311-315.
- Doelle, H.W. 1975. **Bacterial metabolism.** 2nd edition. USA.
- Ferchichi, M., E. Crabbe, G.H. Gil, W. Hintz and A. Almadidy. 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **J. Biotechnology.** 120: 402-409.
- Gerardi, M.H. 2003. **The Microbiology of Anaerobic Digesters.** John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Gheshlaghi, R., J.M. Scharer and M. Moo-Young, C.P. Chou. 2009. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. **Biotechnol. Adv.** 27: 764-781.

- Girbal, L. and P. Soucaille. 1994. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. **J. Bacteriol.** 176: 6433–8.
- Gottschalk, G. 1986. **Bacterial metabolism**. 2nd edition. Springer Verlag, USA.
- Grady, L.C.P., G.T. Daigger and H.C. Lim. 1999. **Biological Wastewater Treatment**. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Hallenbeck, P.C. and J.R. Benemann. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **Int. J. Hydrogen Energ.** 27:1185-93.
- Hartmanis, M.G.N. and S. Gatenbeck. 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. **Appl. Environ. Microbiol.** 47: 1277–83.
- Hernandez, P.E. 1982. Transport of D-glucose in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 28: 469-77.
- Jo, J.H., D.S. Lee, D. Park and J.M. Park. 2008. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. **Bioresource Technol.** 99: 6666-6672.
- Jones, D.T. and D.R. Woods. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. **Microbiol. Rev.** 50: 484-524.
- Jungermann, K., R.K. Thauer, G. Leimenstoll and K. Decker. 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. **Biochim. Biophys. Acta.** 305: 268-80.

- Kavacik B. and B. Topaloglu. 2010. Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. **Biomass Bioenerg.** 34: 1321-1329.
- King, P.W., M.C. Posewitz, M.L. Ghirardi and M. Seibert. 2006. Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. **J. Bacteriol.** 188: 2163–72.
- Klein, M., M.B.A. Schumacher, M. Fritsch and W. Hartmeier. 2010. Influence of hydrogenase overexpression on hydrogen production of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. **Enzyme Microb. Tech.** 46: 384–390.
- Kotze, J.P. 1969. Glycolytic and related enzymes in clostridial classification. **Appl. Microbiol.** 18: 744–7.
- Kyrtopoulos, S.A. and P.N. Satchell. 1972. Kinetic studies with phosphotransacetylase: IV. Inhibition by products. **Biochim. Biophys. Acta.** 276: 383–91.
- Levin, D.B., L. Pitt and M. Love. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **Int. J. Hydrogen Energ.** 29: 173–89.
- Lin, P.Y., L.M. Whang, Y.R. Wua, 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. **Int. J. Hydrogen Energ.** 32: 1728–1735.
- Mandal, B., K. Nath and D. Das. 2006. Improvement of biohydrogen production under decrease partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. **Biotechnol. Lett.** 28: 831–5.
- Mansi, E.M.T. E., C.F.A. Bryce, A.L. Demain, A.R. Allman. 2007. **Fermentation Microbiology and Biotechnology.** Taylor and Francis Group.

- Marty, B. 1984. Microbiology of anaerobic digestion, pp. 72-89. *In* Bruce, A. M., A. Kouzeli Katsiri and P. J. Newman (eds.). **Anaerobic digestion of sewage sludge and organic agricultural wastes**. Elsevier Applied Science Publishers, New York.
- Mathews, J. and G. Wang. 2009. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **Int. J. Hydrogen Energ.** 34: 7404-7416.
- Meinecke, B., J. Bertram and G. Gottschalk. 1989. Purification and characterization of the pyruvateferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. **Arch. Microbiol.** 152: 244-50.
- Menon, S. and S.W. Ragsdale. 1997. Mechanism of the *Clostridium thermoaceticum* pyruvate:ferredoxin oxidoreductase: evidence for the common catalytic intermediacy of the hydroxyethylthiamine pyrophosphate radical. **Biochemistry**. 36: 8484-94.
- Mitchell, W.J., K.A. Albaseri and M. Yazdanian. 1995. Factors affecting utilization of carbohydrates by clostridia. **FEMS Microbiol.** 17: 317-29.
- _____ and M. Tangney. 2005. Carbohydrate uptake by the phosphotransferase system and other mechanisms, p. 165-85. *In* Durre P, ed. **Handbook on Clostridia**. CRC Press.
- Mitchell, R.J., J.S. Kim, B.S. Jeon and B.I. Sang. 2009. Continuous hydrogen and butyric acid fermentation by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755: Effects of the glucose concentration and hydraulic retention time. **Bioresour Technol.** 100: 5352-5355.
- Nath, K. and D. Das. 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various 1 approaches. **Appl. Microbiol. Biot.** 65: 520-9.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-380.

- Oh, S.E., Y. Zuo, H. Zhang, M.J. Guiltinan, B.E. Logan and J.M. Regan. 2009. Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. **Int. J. Hydrogen Energ.** 34: 9347-9353.
- Ounine, K., H. Petitdemange, G. Raval and R. Gay. 1983. Acetone-butanol production from pentoses by *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnol Lett.** 5: 605–10.
- Pattra, S., S. Sangyoka, M. Boonmee and A. Reungsang. 2008. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **Int. J. Hydrogen Energ.** 33: 5256-5265.
- Polprasert, C. 1996. **Organic Waste Recycling Technology and Management**. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex.
- Prince, E.C. and P.N. Cheremisinoff. 1981. **Production and Utilization**. Ann Arbor Science, Michigan.
- Rao, G. and R. Murtharasan. 1987. Altered electron flow in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum* induced by viologen dyes. **Appl. Environ. Microb.** 53: 1232-5.
- Rogers, P. 1986. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. **Adv. Appl. Microbiol.** 31: 1-60.
- Schreiber, W. and P. Durre. 1999. The glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase of *Clostridium acetobutylicum*: isolation and purification of the enzyme, and sequencing and localization of the gap gene within a cluster of other glycolytic genes. **Microbiology.** 145: 1839-47.
- Shuler, M. L. and F. Kargi. 2002. **Bioprocess Eng.** Prentice Hall, Inc., USA.

- Taha, S.M., S.A.Z. Mahmoud, Y.Z. Ishac, M.E Sawy and M.E. E Demerdash. 1973. Acetone-butanol fermentation in Egypt: II. Use of various raw materials. **Egypt. J. Microbiol.** 8: 15–27.
- Taylor, G.T. 1982. The Methanogenic bacteria. Prog. **Ind. Microbiol.** 16: 231-329.
- Thauer, R.K., K. Jungermann and K. Dekker. 1977. Energy conservation in chemotropic 1 anaerobic bacteria. **Bacteriol. Rev.** 41: 100-80.
- Uyeda, K. and S. Kurooka. 1970. Crystallization and properties of phosphofructokinase from *Clostridium pasteurianum*. **J. Biol. Chem.** 245: 3315-24.
- Vardar-Schara, G, Maeda T, Wood TK. 2007. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbiol. Biotechnol.** 1: 107-25.
- Vazquez, I.V. and H.M. P. Varaldo. 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renew. Sust. Energ.** 13: 1000-1013.
- Veliky, I.A. and R.J.C. Mclean. 1994. **Immobilized biosystem: theory and practical application.** Chapman & Hall Inc., USA.
- Venetsaneas, N., G. Antonopoulou, K. Stamatelatos, M. Kornaros and G. Lyberatos. 2009. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresour. Tech.** 100: 3713-3717.
- Vignais, P.M., B. Billoud and J. Meyer. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. **FEMS Microbiol Rev.** 25: 455–501.
- Yan, J.Q., P.H. Liao and K.V. Lo. 1988. Methane Production from Cheese Whey. **Biomass.** 17: 185-202

Yang, K., Y. Yu and S. Hwang. 2003. Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. **Water Res.** 37: 2467-2477.

Yu Y., M. Tangney, H.C. Aass and W.J. Mitchell. 2007. Analysis of the mechanism and regulation of lactose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Appl. Environ. Microb.** 73:1842-50.

Zhang, H., M. A. Bruns and B. E. Logan. 2006. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. **Water Res.** 40: 728-734.

Zeid, A.A.A., M. Fouad and M. Yassein. 1976. Fermentative production of acetone-butanol by *Clostridium acetobutylicum*. **Indian J. Technol.** 14: 349-52.





สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. Biochemical oxygen demand (BOD)

BOD คือปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ค่า BOD นี้จะบอกถึงคุณลักษณะของน้ำเสียนั้นว่ามีสารอินทรีย์ปนอยู่มากหรือไม่ ถ้าค่า BOD มีมาก แสดงว่ามีสารอินทรีย์ปนอยู่มาก แต่ถ้าค่า BOD น้อยแสดงว่ามีสารอินทรีย์ปนอยู่น้อยด้วย

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 ขวดมาตรฐานความจุ 250-300 มิลลิลิตร มีจุกปิดได้สนิทปากกว้างออกเล็กน้อยมี ร่องหนีจุกและปากขวดเพื่อให้มีน้ำหล่ออยู่เสมอขณะ incubate ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อ ป้องกันการดึงอากาศจากภายนอกเข้าไปในขวด ขวดนี้ต้องล้างให้สะอาดทุกครั้งก่อนนำมาใช้

1.1.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส

1.1.3 ตู้เย็นขนาด 6 คิวบิกฟุต

1.1.4 กระบอกตวงขนาด 1,000 มิลลิลิตร

1.2 สารเคมี

1.2.1 น้ำกลั่นบริสุทธิ์คุณภาพสูงปราศจากคลอรีน อัลคาไลน์ดี กรด และสารอินทรีย์ มี ทองแดงปนได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ละลาย KH_2PO_4 8.5 กรัม K_2HPO_4 21.75 กรัม $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 33.4 กรัม และ NH_4Cl 1.7 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วเจือจาง ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้ควรจะมีค่า pH 7.2

1.2.3 สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต ละลาย $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 22.5 กรัม ในน้ำ กลั่นแล้วเจือจางปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.2.4 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ละลาย CaCl_2 ที่อบแห้ง 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้ว เจือจางปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.2.5 สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจาง ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.2.6 สารละลายโซเดียมซัลไฟด์ 0.025 N ละลาย Na_2SO_3 ที่อบแห้ง 1.575 กรัม ในน้ำ กลั่นแล้วเจือจางปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้ไม่คงที่สลายตัวได้ง่าย จึงควรเตรียม เฉพาะเวลาที่ต้องการเท่านั้น

1.2.7 สารละลายกรดและด่าง 1 N สำหรับใช้ปรับค่า pH ให้เป็นกลาง

1.2.8 การเติมน้ำเชื้อ (seeding) เพื่อต้องการให้มีจำนวนแบคทีเรียเพียงพอในการย่อย สลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย น้ำเสียประเภทสารอินทรีย์ เช่น น้ำโสโครกจากบ้านเรือนซึ่งมีแบคทีเรีย อยู่เป็นจำนวนมากแล้วก็ไม่จำเป็นต้องเติมน้ำเชื้อลงไปอีก

ตัวอย่างน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่น้อยหรือไม่มีเลย เช่น น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย คลอรีน น้ำทิ้งที่อุณหภูมิสูง เป็นกรดหรือด่างแรงจะต้องเติมเชื้อลงในน้ำที่ใช้เจือจาง น้ำเชื้อ มาตรฐานเตรียมได้จากน้ำโสโครกจากบ้านเรือนที่ปล่อยให้ตกตะกอนและใส่ไว้ในตู้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จึงดูดเอาน้ำส่วนบนมาใช้ โดยทั่วไปแล้วใช้น้ำเชื้อมาตรฐาน 1-2 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ใช้เจือจาง 1,000 มิลลิลิตร

น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมหลายชนิดที่มีสารอินทรีย์ที่เชื้อแบคทีเรียจากน้ำ โสโครกจากบ้านเรือนไม่สามารถย่อยสลายได้ ในกรณีเช่นนี้จะต้องเตรียมน้ำเชื้อจากดิน ทำให้เชื้อ เติบโตขึ้นกับน้ำทิ้งชนิดนั้นเสียก่อนหรือเก็บจากแหล่งรับน้ำได้จุดที่ทิ้งน้ำเสีย นั้น (โดยปกตินิยมเก็บที่ ระยะ 2-3 กิโลเมตร) การทำให้เชื้อเติบโตขึ้นกับน้ำเสียที่ต้องการนั้นทำได้โดยการเป่าอากาศให้น้ำ โสโครกหรือจากแหล่งน้ำทิ้ง แล้วค่อย ๆ เพิ่มปริมาณน้ำเสียที่ต้องการหา BOD ลงไปทุกวัน จนกระทั่งได้เชื้อที่เติบโตขึ้นกับน้ำเสีย นั้นเจริญขึ้นจนเป็นที่น่าพอใจ

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1.3.1 การเตรียมน้ำสำหรับใช้เจือจาง

ก. ตวงน้ำกลั่นให้มากกว่าปริมาณที่ต้องการใช้ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะที่สะอาด

ข. เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และเพอริกคลอไรด์ ตามลำดับ ใช้สารละลายแต่ละชนิด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำเจือจาง 1,000 มิลลิลิตร

ค. เป่าอากาศที่สะอาด เพื่อเพิ่มปริมาณสารละลายออกซิเจนให้กับน้ำเจือจางเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง

ง. เติมน้ำเชื้อ 2 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ใช้เจือจาง 1,000 มิลลิลิตร ในกรณีที่ต้องใช้

1.3.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำที่จะวิเคราะห์

ก. ตัวอย่างน้ำที่เป็นด่างหรือกรดจะต้องปรับให้เป็นกลาง คือ pH ประมาณ 7 ด้วย H_2SO_4 1 N หรือ NaOH 1 N แล้วแต่กรณี

ข. ตัวอย่างน้ำที่มีสารประกอบคลอรีนส่วนเหลือ โดยปกติถ้าตั้งตัวอย่างน้ำทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมงคลอรีนส่วนที่เหลือก็จะสลายตัวไป แต่ถ้าตัวอย่างน้ำที่ปรับให้เป็นกลางแล้วยังมีคลอรีนส่วนเหลืออยู่มากต้องกำจัดโดยใช้โซเดียมซัลไฟด์ การหาปริมาณคร่าว ๆ ของโซเดียมซัลไฟด์ที่จะเติมทำได้โดยใช้ตัวอย่างน้ำ 100-1,000 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก (1+1) หรือกรดซัลฟูริก (1+50) 10 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตด้วยโซเดียมซัลไฟด์ 0.025 N ใช้น้ำแบ่งเป็นอินดิเคเตอร์ ก็จะทราบปริมาณโซเดียมซัลไฟด์ที่ต้องใช้ แล้วจึงนำตัวอย่างน้ำที่กำจัดคลอรีนส่วนเกินแล้วไปหาค่า BOD ต่อไป

ค. ตัวอย่างน้ำที่มีโลหะหนักหรือสารเป็นพิษชนิดอื่นปนอยู่ จะต้องศึกษาและกำจัดเสียก่อนเป็นพิเศษ

1.3.3 วิธีเจือจาง

ก. เลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างในการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่า BOD อยู่ในช่วงที่กำหนด แล้วจึงเลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างเจือจางที่สูงกว่าและต่ำกว่าที่อยู่ติดกันไปอีก 2 ชั้น ตามตารางผนวกที่ 1 ดังนั้นจำเป็นต้องรู้ค่า BOD โดยประมาณของน้ำเสียก่อน

ข. ค่อย ๆ รินน้ำเจือจาง 700-800 มิลลิลิตร ในกระบอกตวงขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยพยายามอย่าให้มีฟองอากาศ

ค. เติมตัวอย่างน้ำจำนวนที่ต้องการแล้วเติมน้ำเจือจางจนปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ง. ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน อย่าให้มีฟองอากาศ

จ. ค่อย ๆ รินใส่ขวด BOD 3 ขวด ปิดจุกแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 2 ขวด ส่วนขวดที่เหลือนำไปหา DO ทันที เพื่อทราบค่า DO ที่จุดเริ่มต้น (D1)

ฉ. ทำเช่นเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2 ถึงข้อ 5 สำหรับเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างเจือจางที่ต่ำกว่าและสูงกว่า ตามลำดับ

1.3.4 การหาปริมาณ DO

หาปริมาณ DO ที่จุดเริ่มต้นโดยวิธี Azide modification of the iodometric method ดังที่จะกล่าวต่อไป

1.3.5 การเพาะเลี้ยง (incubation)

เพาะเลี้ยงโดยเก็บ 2 ขวดของแต่ละเปอร์เซ็นต์ตัวอย่าง เจือจางในตู้เย็นมีอุณหภูมิ 20 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงนำออกมาหาปริมาณ DO (D2) เหมือนการหาปริมาณ DO ที่จุดเริ่มต้น

1.3.6 การลดปริมาณ DO เนื่องจากน้ำเชื้อ

ในกรณีที่มีการเติมน้ำเชื้อลงในน้ำกลั่นสำหรับเชื้อจางก็จะต้องหาปริมาณ DO ที่ลดลง เนื่องจากน้ำเชื้อในน้ำเชื้อจาง แล้วนำไปคิดคำนวณเทียบตามเปอร์เซ็นต์ของน้ำเชื้อที่ใช้ในการเชื้อจางตัวอย่างน้ำ โดยปกติแล้วปริมาณ DO ที่ลดลงเนื่องจากน้ำเชื้อไม่ควรเกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3.7 การควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อจาง

รินน้ำกลั่นที่ใช้เชื้อจางแต่ไม่ได้ใส่น้ำเชื้อลงในขวด BOD 2 ใบ ปิดจุกแล้วเอาขวดหนึ่งเพาะที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วนอีกขวดหนึ่งหาปริมาณ DO ทันที ผลต่างของปริมาณ DO ที่ได้ในตอนแรกและตอนหลัง (5 วัน) จะเป็นเครื่องชี้ให้เห็นคุณภาพของน้ำกลั่นที่ใช้เป็นน้ำเชื้อจาง ถ้าปรากฏว่าปริมาณ DO ลดลง ผลที่ได้ไม่นั้นไม่ควรใช้เป็น blank collection ปกติแล้วปริมาณ DO ไม่ควรลดเกินกว่า 0.2 มิลลิกรัม หรือที่ดีแล้วไม่ควรเกิน 0.1 มิลลิกรัม

1.3.8 การพิจารณาผลเพื่อใช้คำนวณค่า BOD

ผลที่น้ำเชื้อถือและจะใช้คำนวณต่อไปนั้น จะต้องมียค่าปริมาณ DO เหลืออยู่อย่างน้อย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และต้องมีการลดปริมาณ DO ลงไปอย่างน้อย 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะทำให้ค่า BOD ที่คำนวณออกมาได้นั้นถูกต้องที่สุด

1.3.9 การคำนวณ

ก. ในกรณีที่ไม่เติมเชื้อ

$$\text{มิลลิกรัม/ลิตร BOD} = (D1-D2) / P$$

ข. ในกรณีที่เติมเชื้อ

$$\text{มิลลิกรัม/ลิตร BOD} = [(D1-D2)-(B1-B2)f] / P$$

D1 = DO ของตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วเป็นเวลา 15 นาที ของวันที่ 0

D2 = DO ของตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วและบ่มเป็นเวลา 5 วัน

P = อัตราส่วนของตัวอย่างที่ใช้ต่อตัวอย่างที่เจือจางแล้ว

B1 = DO ของหัวเชื้อคูลัม (seed control) ก่อนการบ่ม

B2 = DO ของหัวเชื้อคูลัม (seed control) หลังการบ่ม 5 วัน

f = อัตราส่วนของหัวเชื้อในตัวอย่างต่อในหัวเชื้อคูลัม

$$= (\% \text{ seed in D1}) / (\% \text{ seed in B1})$$

ตารางผนวกที่ ก1 ช่วงของค่า BOD ที่วัดได้ตามค่าเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างของการเจือจาง

ช่วง BOD	% ตัวอย่าง
20,000-70,000	0.01
10,000-25,000	0.02
4,000-14,000	0.05
2,000-7,000	0.10
1,000-3,500	0.20
400-1,400	0.50
200-700	1.00
100-350	2.00
40-140	5.00
20-70	10.00
10-35	20.00
4-14	50.00
0-7	100.00

2. Dissolved oxygen (DO) โดย Azide modification of iodometric method

วิธีนี้เหมาะสำหรับการหาปริมาณสารละลายออกซิเจนในน้ำโสโครก น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำในแม่น้ำลำคลอง แต่ใช้ได้ไม่ดีกับน้ำที่มีอนุภาคของเหล็กที่มีวาเลนซ์ 2 เกินกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสารที่เป็นตัวเติมหรือลดออกซิเจนปนอยู่

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ละลาย $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 400 กรัม หรือ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 364 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2.1.2 สารละลายอัลคาไล-ไฮโดรไดด์-ไอโซไซด์ ละลาย NaOH 500 กรัม และ NaI 135 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เสร็จแล้วเติม NaN_3 10 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

2.1.3 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

2.1.4. น้ำแป้ง ละลายแป้งมัน 5 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เทลงในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ต้มจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำอีกจนได้ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดประมาณ 5 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วเติมกรด salicylic 1.25 กรัม หรือใช้ toluene 2-3 หยด เติมลงในสารละลายน้ำแป้งเพื่อกันบูด

2.1.5 สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 N ใช้ในการไตเตรท ละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.205 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดใหม่ ๆ และปล่อยให้เย็นแล้วเติมจนปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้สามารถเก็บรักษาให้คงสภาพอยู่ได้โดยเติม NaOH 0.4 กรัมต่อลิตร สารละลายมาตรฐานนี้ 1 มิลลิลิตร จะมีค่าเท่ากับปริมาณสารละลายออกซิเจน (DO) 0.200 มิลลิกรัม

ก. การหาค่ามาตรฐานของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตด้วยสารละลายไดโครเมต

1) สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.025 N ละลาย $K_2Cr_2O_7$ ที่
อบแห้งแล้ว 1.225 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2) ละลาย KI_2 กรัม ในขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ด้วยน้ำกลั่น
100-150 มิลลิลิตร

3) เติม H_2SO_4 (1+9) 10 มิลลิลิตร

4) เติมสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$ 20 มิลลิลิตร

5) ตั้งทิ้งไว้ในที่มีด 5 นาที

6) เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร โดยประมาณ

7) ไตเตรทไอโอดีนที่เกิดขึ้น ด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต

8) Normality ของสารละลายไทโอซัลเฟต = $(a \times N)/20$

a = มิลลิลิตรไทโอซัลเฟตที่ใช้

N = Normality ของสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$

9) ปรับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตให้มีความเข้มข้นแน่นอนเป็น
0.025 N

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 จากตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ในขวด 250-300 มิลลิลิตร เติมสารละลายแมงกานีส
ซัลเฟต 2 มิลลิลิตร

2.2.2 เติมสารละลายอัลคาไล-ไอโอไดค์-อาไซด์ ตามลงไปทันที 2 มิลลิลิตร ให้ปลายหลอดจมอยู่ในตัวอย่างน้ำ

2.2.3 ปิดจุกกระวังอย่าให้มีฟองอากาศติดอยู่ในขวด จับขวดคว่ำลงเขย่าแบบพลิกมือให้ขวดตั้งขึ้นและลงสลับกันอย่างน้อย 15 ครั้ง ปล่อยทิ้งไว้ให้ตะกอนที่เกิดขึ้นนอนก้น

2.2.4 รอจนได้น้ำใสส่วนบนประมาณ 100 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เปิดจุกแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปทันที 2 มิลลิลิตร ให้กรดไหลลงไปตามคอขวด

2.2.5 ปิดจุกค่อย ๆ เขย่าจนกระทั่งตะกอนละลายหมด

2.2.6 ตวงสารละลายที่ได้ 203 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพูนขนาด 500 มิลลิลิตร (ปริมาตรจำนวนนี้จะแทนปริมาตรของตัวอย่างน้ำจริง ๆ 200 มิลลิลิตร เนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างน้ำถูกแทนที่ด้วยน้ำยาทั้งหมด 4 มิลลิลิตร คือ แมงกานีสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร และอัลคาไล-ไอโอไดค์-อาไซด์ 2 มิลลิลิตร ที่เติมลงไป ในขวดขนาด 300 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรที่จะนำมาเพื่อไตเตรทจึงควรเป็น $(200 \times 300) / (300 - 4) = 203$ มิลลิลิตร

2.2.7 ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไทโอซัลเฟต 0.025 N จนได้สีเหลืองอ่อน ๆ

2.2.8 เติมน้ำแอมโมเนีย 1-2 มิลลิลิตร และไตเตรทจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป

การคำนวณ

เนื่องจาก 1 มิลลิลิตรของ 0.025 N โซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรท จะเท่ากับ ปริมาณ DO 0.200 มิลลิกรัม เพราะฉะนั้น 1 มิลลิลิตรของโซเดียมไทโอซัลเฟตจะเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร DO เมื่อใช้ปริมาตรของตัวอย่าง 200 มิลลิลิตร ในการไตเตรท

3. Chemical oxygen demand (COD) โดย Titrimetric method

การวิเคราะห์หาค่า COD โดยวิธีรีฟลักซ์แบบปิด (Closed reflux) มีหลักการเช่นเดียวกับวิธีรีฟลักซ์แบบเปิด (Open reflux) สารอินทรีย์ที่ระเหยจะสามารถถูกออกซิไดซ์ได้มากกว่าในระบบเปิดเพราะมีเวลาสัมผัสกับสารออกซิไดซ์ได้นานกว่า ก่อนทำการทดลองทุกครั้งควรตรวจสอบฝาปิดหลอดแก้วว่ามีรอยแตกหรือไม่ ฝาจุของหลอดทดลองที่อาจเกิดชำรุดในขณะที่ทำการย่อยสลายในตู้บะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนและทำให้มีการสูญเสียของสารอินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงควรที่จะต้องระมัดระวังสำหรับการย่อยสลายในตู้บะจะใช้อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง การเลือกขนาดของหลอดที่ใช้ขึ้นอยู่กับความไว (sensitivity) ที่ต้องการ

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 0.0167 M ละลาย $K_2Cr_2O_7$ 4.913 กรัม ที่อบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 167 มิลลิลิตร เติม $HgSO_4$ 33.3 กรัม คนให้ละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเจือจางให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.1.2 กรดซัลฟิวริกเอเจนต์ ละลาย Ag_2SO_4 22 กรัม ลงในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 ขวด ซึ่งมีน้ำหนัก 4.0 กิโลกรัม (ต้องใช้เวลาในการละลาย 1-2 วัน)

3.1.3 สารละลายเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ ละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.695 กรัม และ 1,10 phenanthroline monohydrate 1.485 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.4 สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 M ละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot H_2O$ 39.2 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ในการย่อยสลายทุกครั้งที่จะนำมาใช้ เติมสารเคมีตามตารางผนวกที่ 2 ในภาชนะย่อยสลายเติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอโรอินเป็น

อินดิเคเตอร์ 1-2 หยดทำประมาณ 1-2 หลอด ไตเตรทจนถึงจุดยุติจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง

Molarity ของ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ = (มิลลิลิตร $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times 0.1$) / มิลลิลิตร $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 ล้างหลอดย่อยสลายและฟาจุกด้วยกรดซัลฟิวริก 20 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปใช้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์

3.2.2 เลือกใช้ปริมาตรของตัวอย่างน้ำและสารเคมีที่เหมาะสม ตามตารางผนวกที่ 2

3.2.3 นำตัวอย่างน้ำมาใส่หลอดย่อยสลายหรือแอมพูล เดิมสารละลายที่ใช้ในการย่อยสลาย ซึ่งได้แก่สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต

3.2.4 ค่อย ๆ เทกรดซัลฟิวริกหรือเจนต์ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นตัวอย่างน้ำและสารละลายในการย่อยสลาย

3.2.5 ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่นหรือถ้าใช้แอมพูลก็ให้เชื่อมให้สนิท แล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลาย ๆ ครั้งเพื่อผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึง

3.2.6 นำหลอดทดลองนี้ไปใส่เครื่องย่อยสลาย (block digester) หรือตุ๋น ซึ่งได้ทำให้อุ่นถึงอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสก่อน ใช้เวลาริฟลักซ์ 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง โดยนำหลอดทดลองมาวางในที่ว่างหลอดทดลอง

3.2.7 เปิดฟาจุก แล้วจึงใส่แท่งแม่เหล็กที่หุ้มด้วยทีเอฟอี (TFE covered magnetic bar) ถ้าใช้แอมพูล ให้เทของผสมลงไปในภาชนะที่ใหญ่กว่า เพื่อนำไปไตเตรท เดิมเฟอโรอินดิเคเตอร์ประมาณ 1-2 หยด คนโดยใช้เครื่องกวนชนิดใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) อย่างรวดเร็ว ในขณะที่ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 M จุดยุติจะเปลี่ยนอย่างรวดเร็วจากสีฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง ถึงแม้บางครั้งสีฟ้าอมเขียวอาจจะกลับมาปรากฏอีกในหลายนาที

ถัดมา และในลักษณะเดียวกันให้ทำรีฟลักซ์และไตเตรทเบลงค์ที่มีรีเอเจนต์กับน้ำกลั่นในปริมาตรเท่ากับตัวอย่างน้ำด้วย

การคำนวณ

มิลลิกรัม/ลิตร COD = $[(A-B) \times M \times 8,000] / \text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}$

A = มิลลิลิตร $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้ในการไตเตรทเบลงค์

B = มิลลิลิตร $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่างน้ำ

M = Molarity ของ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$

ตารางผนวกที่ ก2 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่าง ๆ ของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย

ขนาดของ ภาชนะ ย่อยสลาย	ตัวอย่างน้ำ (ml)	สารละลายใน การย่อยสลาย (ml)	กรดซัลฟิวริก รีเอเจนต์ (ml)	ปริมาตรทั้งหมด (ml)
หลอดย่อยสลาย				
16×100 mm	2.5	1.5	3.5	7.5
20×150 mm	5.0	3.0	7.0	15.0
25×150 mm	10.0	6.0	14.0	30.0
แอมพูล				
มาตรฐาน				
10 ml	2.5	1.5	3.5	7.5

4. ของแข็งทั้งหมด (total solids, TS)

ของแข็งทั้งหมด หมายถึง ปริมาณสารที่เหลืออยู่ในภาชนะหลังจากระเหยน้ำออกจากสารตัวอย่างจนหมด แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักของของแข็งในภาชนะนั้น จะได้ปริมาณของของแข็งทั้งหมด

4.1 วิธีการวิเคราะห์

4.1.1 การเตรียมจานระเหย จานที่จะใช้ต้องอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน สมมติ = A มิลลิกรัม

4.1.2 เลือกใช้ปริมาตรตัวอย่างน้ำให้เหมาะสม

4.1.3 ถ้วย ๆ รินตัวอย่างน้ำที่ต้องการหาของแข็งทั้งหมดใส่ในจานระเหย นำไประเหย น้ำออกให้หมดบน water bath หรือ hot plate นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น

4.1.4 ชั่งน้ำหนักจานระเหยทันทีที่เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง สมมติ = B มิลลิกรัม น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก็คือ น้ำหนักของปริมาณของแข็งทั้งหมด ซึ่งคำนวณออกมาในรูปของมิลลิกรัมต่อลิตร

การคำนวณ

มิลลิกรัม/ลิตร $\text{total solids} = [(A-B) \text{ มิลลิกรัม} \times 1,000] / \text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}$

5. ของแข็งระเหยทั้งหมด (total volatile solids, TVS)

ของแข็งระเหยทั้งหมด หมายถึง ปริมาณของสารที่ระเหยไปได้ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ ส่วนตะกอนที่เหลืออยู่ไม่สลายไปเรียกว่าปริมาณของแข็งคงตัว (fix solids)

5.1 วิธีการวิเคราะห์

5.1.1 นำจานระเหยที่ได้จากการหาปริมาณของแข็งทั้งหมดแล้ว นำไปเผาในเตาเผา (muffle furnace) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 550 องศาเซลเซียส จนหนักคงที่ (ประมาณ 15-20 นาที)

5.1.2 ปล่อยให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักของแข็งที่เหลืออยู่ (fix solids)

การคำนวณ

มิลลิกรัม/ลิตร fix solids = (มิลลิกรัม fix solids $\times$ 1,000) / มิลลิลิตรตัวอย่าง
 ดังนั้น มิลลิกรัม/ลิตร total volatile solid = มิลลิกรัม/ลิตร total solid – มิลลิกรัม/ลิตร fix solids

6. ปริมาณไนโตรเจน

หลักการ

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนมาเป็น $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ โดยการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้น มี K_2SO_4 และ CuSO_4 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพิ่มจุดเดือดของสารละลายใน flask ให้สูงขึ้น กลั่นหาปริมาณไนโตรเจนในสารละลายที่ได้จากการย่อย โดยให้สารละลายทำปฏิกิริยากับด่าง (NaOH) ใช้สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เป็นตัวจับก๊าซ NH_3 จากนั้นไตเตรทหาปริมาณ NH_3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน (0.01 N) ใช้ mixed indicator ในการดูจุดยุติ (end point)

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl โดยสรุปมี 2 ขั้นตอนดังรายละเอียดที่จะกล่าวต่อไป

6.1 สารเคมี

6.1.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (96% AR grade)

6.1.2 K_2SO_4 และ CuSO_4 (อัตราส่วน 20: 1)

6.1.3 สารละลาย 40 % NaOH (w/v) AR grade

ละลาย NaOH 400 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

6.1.4 Mixed indicator

ละลาย methyl red 0.05 กรัม และ bromocresol green 0.075 กรัม ใน 95% ethanol 100 มิลลิลิตร

6.1.5 สารละลาย 0.3 % H_3BO_3 (w/v)

สารละลาย H_3BO_3 ปริมาณ 6 กรัม ในน้ำที่ปราศจากไอออนพร้อมปรับปริมาตรเป็น 2000 มิลลิลิตร

6.1.6 Na_2CO_3 (AR grade)

6.1.7 สารละลาย 1 N กรดไฮโดรคลอริก

ใส่น้ำที่ปราศจากไอออนลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ไปเปิดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป 83 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

6.1.8 สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.01 N

เจือจางสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในข้อ 7 ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1 N) 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นประมาณ 0.01 N

ทำการ standardize ด้วย Na_2CO_3 โดยชั่ง Na_2CO_3 (ที่ผ่านการอบ $105^\circ C$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) 0.00x กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนประมาณ 20 มิลลิลิตรเพื่อละลาย Na_2CO_3 เมื่อละลายหมดแล้วหยด mixed indicator 2-3 หยด ไตเตรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.01 N จนถึงจุดยุติ

สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้ไทเทรต คำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกได้ดังนี้

Normality ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก = $\frac{(\text{น้ำหนักของ Na}_2\text{CO}_3 \times 2 \times 100)}{(105.99 \times \text{ปริมาตรของกรดที่ใช้})}$

6.2 วิธีการ

6.2.1 การย่อย

ชั่งตัวอย่าง 0.5 - 1 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม catalyst K_2SO_4 10 กรัม กับ CuSO_4 0.5 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25-30 มิลลิลิตร นำไปย่อยในชุดเตาไฟฟ้า เริ่มเปิดไฟอ่อน ๆ ก่อน จนกระทั่งไอกรดได้ระเหยไปเป็นส่วนใหญ่แล้ว ค่อยเพิ่มอุณหภูมิของเตาย่อยให้สูงขึ้น จนกระทั่งสารละลายในขวดใสเป็นสีเขียว ไฟอ่อน เอาออกจากเตาทิ้งไว้ให้เย็น นำสารละลายที่เย็นแล้วมาเติมน้ำกลั่นและถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร โคนล่าง 3-4 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 30 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

6.2.2 การกลั่น

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในข้อ 1 แล้ว 10 มิลลิลิตร ใส่ในเครื่องกลั่นชนิด micro distillation เติม 40 เปอร์เซ็นต์ NaOH 5 มิลลิลิตร นำขวดชมพูขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลาย 0.3 เปอร์เซ็นต์ H_3BO_3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติม mixed indicator 2-3 หยด นำไปวางใต้ก้าน condenser โดยให้ปลายก้าน condenser จุ่มได้สารละลาย เปิดระบบการกลั่นให้ทำงาน ถ้ามีไนโตรเจนสารละลาย H_3BO_3 ในขวดชมพูจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเขียว กลั่นให้ได้สารละลายประมาณ 75 มิลลิลิตร หรือประมาณ 10 นาที ปิดเครื่องกลั่น นำสารละลายในขวดรูปชมพู่มาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.01 N บันทึกปริมาตรสารละลายที่ใช้ โดยดูจุดยุติจากสารละลายสีเขียวเริ่มเป็นสีชมพูอ่อน

การคำนวณ

$$\% \text{ ใน โตรเจน} = [\text{Normality Std. HCl} \times \text{cc.HCl (titrate)} \times 250 \times 100 \times 14] / [1000 \times 10 \times \text{wt.sample (g)}]$$

7. การย่อยตัวอย่างโดยใช้กรดผสมไนตริกและเปอร์คลอริก

วิธีการ

7.1 การย่อย

ชั่งตัวอย่าง 1-2 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่ glass bead 4-5 เม็ด (เพื่อป้องกันการกระเด็นขณะย่อย) แขนวแท่งแก้วใส่กรวยแก้ว เติมกรดไนตริกเข้มข้น 15-18 มิลลิลิตร กรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 5-7 มิลลิลิตร (อัตราส่วน $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 3:1$) หลังจากเติมกรดทั้งสองชนิดแล้วตั้งทิ้งไว้ค้างคืนในตู้ดูดไอกรด ก่อนนำขึ้นย่อยบนแผ่นให้ความร้อน เมื่อเริ่มย่อยจะใช้อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส กรดไนตริกซึ่งมีจุดเดือดประมาณ 120 องศาเซลเซียส การย่อยระยะนี้จะเกิดควันสีขาวของเปอร์คลอริกย่อยต่อประมาณ 1-2 ชั่วโมง สารละลายจะเริ่มใส การย่อยตัวอย่างจะเสร็จสมบูรณ์เมื่อควันขาวเจือจางลงมากแล้ว สารละลายใน flask จะใสและเหลือปริมาตรประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปกรอง

7.2 การกรอง

เติมน้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออนลงในขวดตัวอย่างที่ย่อยสมบูรณ์แล้วพอควร ต้มให้ร้อนบนแผ่นให้ความร้อน กรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ล้างสารละลายตัวอย่างซ้ำด้วยน้ำกลั่นร้อนครั้งละ 10 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง ใช้ rubber polishman ถูรอบ ๆ ภายใน flask ให้ทั่ว ทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตร ปิดจุกเขย่าให้เข้ากั๊ต สารละลายที่ได้สามารถนำไปวิเคราะห์หา P K S Ca Mg Fe Mn Zn และ Cu ได้

8. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

หลักการ

Ammonium molybdate ทำปฏิกิริยากับ Phosphate ในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรดได้ colloid สีเหลืองของ Ammonium phosphomolybdate ความเข้มข้นของสีจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับ ปริมาณฟอสฟอรัสในสารละลาย

วิธีการ

8.1 การเตรียม Barton's solution ใช้ในการ develop สี

ชั่ง Ammonium molybdate 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 400 มิลลิลิตร พักไว้ ชั่ง Ammonium metavanadate 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แล้วรินใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นในตริกเข้มข้น 250 มิลลิลิตร ผสมกันทิ้งไว้ให้เย็น แล้วค่อยๆเติม Ammonium molybdate ที่ละลายแล้วผสมกันใน flask เขย่าให้ผสมกัน ทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชา

8.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส

ชั่ง KH_2PO_4 0.2197 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ สารละลายนี้จะมีฟอสฟอรัสเข้มข้น 50 ppm

8.3 การ develop สี

ดูดสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกรดผสมของกรดไนตริกและเปอร์คลอริกดังที่กล่าวมาแล้ว ปริมาตร 2-5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ให้สีคงที่อย่างน้อย 30 นาที

8.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสเข้มข้น 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ppm จาก สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสเข้มข้น 50 ppm

8.5 อ่านค่าความเข้มข้น

นำสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสเข้มข้น 1-10 ppm สารละลายตัวอย่าง และ blank ที่ได้ develop สีและทิ้งให้สีคงที่ครบตามเวลาแล้ว ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง กับกราฟสารละลายมาตรฐาน

8.6 การคำนวณ

เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัส = $(\text{ppm equi.} \times \text{dilution factor} \times \text{original solution} \times 100) / (10^6 \times \text{wt.sample})$

9. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุ K Ca และ Mg

9.1 สารเคมี

9.1.1 สารละลายมาตรฐานของ K Ca และ Mg ที่ความเข้มข้น 100 ppm ซึ่งเตรียมจาก KCl CaCO₃ MgSO₄·7H₂O ตามลำดับ

9.1.2 Strontium solution 1000-2000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมจากการละลาย SrCl₂·6H₂O 121.7 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 2000 มิลลิลิตร

9.2 วิธีการ

9.2.1 นำสารละลายมาตรฐานของ K Ca และ Mg ที่ความเข้มข้น 100 ppm มาเจือจางจนมีความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 ppm เติมสารละลาย SrCl₂ ในอัตราส่วน 1:10

9.2.2 นำสารละลายที่ผ่านการย่อยด้วยกรดผสมของกรดไนตริกและเปอร์คลอริกดังที่กล่าวมาแล้ว เจือจางจนมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-5 ppm เติมสารละลาย SrCl₂ ในอัตราส่วน 1:10

9.2.3 นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างจากข้อ 1 และ 2 มาทำการวัดปริมาณธาตุต่าง ๆ ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

การคำนวณ

$$\% \text{ K Ca และ Mg} = (\text{ppm equi.} \times \text{dilution factor} \times \text{original solution} \times 100) / (10^6 \times \text{wt.sample})$$

10. การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรต

สารเคมี

สารละลายไบยูเรต เตรียมจาก $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5 กรัม และ $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6 กรัม ละลายน้ำ 500 มิลลิลิตร เติม 10% NaOH 300 มิลลิลิตร ผสมกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 ลิตร

วิธีการ

10.1 ปิเปตต์สารละลายตามลำดับในตารางผนวกที่ 3

10.2 เขย่าสารละลายในหลอดให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

10.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

ตารางผนวกที่ ก3 ปริมาตรของสารละลายต่าง ๆ ในการทดสอบ

สารละลาย (ml)	หลอดทดลอง								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bovine serum albumin 10 mg/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-	-	-
น้ำกลั่น	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0	0.8	0.6	0.2
สารตัวอย่าง	-	-	-	-	-	-	0.2	0.4	0.8
สารละลายไบยูเรต	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0

11. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Nelson-Samogi Method

11.1 สารเคมี

11.1.1 สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ซังกลูโคส 0.100 กรัม ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เป็น stock solution

11.1.2 สารละลาย Law-alkalinity of Samogyi (สารละลาย A)

ก. นำ Sodium potassium tartrate 12 กรัม และ Sodium carbonate 24 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเติม NaHCO_3 16 กรัม

ข. ละลาย NaSO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็นนำสารละลายในข้อ ข. เติกลงในสารละลายข้อ ก. แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

11.1.3 เตรียมสารละลาย Arsenomolybdate reagent of Nelson (สารละลาย B)

ก. ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร

ข. ละลาย $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 2 เติมลงในสารละลายข้อ 1 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

11.2 วิธีการ

11.2.1 หากกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

11.2.2 ใส่สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

11.2.3 เติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

11.2.4 เติมสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันทีทิ้งไว้ 15 นาที

11.2.5 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟ

11.2.6 หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากสารตัวอย่าง ทำเช่นเดียวกับการหากราฟมาตรฐานของน้ำตาล และหาปริมาณของน้ำตาลโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ถ้าปริมาณน้ำตาลสูงกว่าค่ากราฟมาตรฐาน ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้

12. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก

12.1 สารเคมี

12.1.1 กรดซัลฟิวริก

12.1.2 ฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัมแล้วเติมน้ำกลั่น
อีก 95 กรัม

12.1.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.0400 กรัม ละลายใน
น้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อ
มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางผนวก
ที่ 4

ตารางผนวกที่ 4 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

หลอดที่	สารละลายกลูโคส 400 µg/ml (µl)	น้ำกลั่น (µl)	สารละลายกลูโคส มาตรฐาน (µg/ml)
1	0	1000	0
2	25	975	10
3	50	950	20
4	100	900	40
5	125	875	50
6	200	800	80

12.2 วิธีการ

12.2.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-
80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์
ลงไป 1.0 มิลลิลิตร

12.2.2 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที
ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อย ๆ ปล่อยลงที่ข้างหลอด

12.2.3 ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่ม
ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-20 นาที

12.2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้ำเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

12.2.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคสต่อไป

13. การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ (gas composition)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ คือ การวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนและมีเทน

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง gas chromatography (Shimadzu model GC-14B) ภายใต้สภาวะการทดลอง ดังนี้

- คอลัมน์บรรจุ molecular sieve 13 X
- เครื่องตรวจวัดแบบ thermal conductivity detector (TCD)
- อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ injection port 60 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ detector 70 องศาเซลเซียส
- carrier gas ที่ใช้คือ ก๊าซอาร์กอน

วิธีการวิเคราะห์

การฉีดตัวอย่างก๊าซชีวภาพโดยใช้ syringe แบบ gas tight syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดก๊าซ

ชีวภาพจากหลอดสุญญากาศที่ใช้เก็บตัวอย่างก๊าซชีวภาพมา 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง gas chromatography คำนวณหาร้อยละของก๊าซไฮโดรเจนและมีเทนโดยเทียบจากร้อยละของพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของก๊าซไฮโดรเจนและมีเทนมาตรฐานชนิดละ 30 เปอร์เซ็นต์

14. อาหารเลี้ยงเชื้อ

14.1 cook meat (1 ลิตร)

14.1.1 beef heart 20 กรัม

14.1.2 protease peptone 20 กรัม

14.1.3 dextrose 2 กรัม

14.1.4 sodium chloride 5 กรัม

14.2 Reinforced Clostridial medium (1 ลิตร)

14.2.1 beef extract 10 กรัม

14.2.2 yeast extract 3 กรัม

14.2.3 dextrose 5 กรัม

14.2.4 sodium chloride 5 กรัม

14.2.5 soluble starch 1 กรัม

14.2.6 cysteine HCl 0.5 กรัม

14.2.7 sodium acetate 3 กรัม

14.2.8 agar 0.5

14.4 Thioglycolate medium (1 ลิตร)

14.4.1 yeast extract 5 กรัม

14.4.2 tryptone 15 กรัม

14.4.3 glucose 5.5 กรัม

14.4.4 sodium thioglycolate 0.5 กรัม

14.4.5 sodium chloride 2.5 กรัม

14.4.6 L-cysteine 0.5 กรัม

14.4.7 resazurin 0.001 กรัม

14.4.8 agar 0.75 กรัม

14.5 อาหาร Lactose Yeast extract Peptone (1 ลิตร)

14.5.1 peptone 2.5 กรัม

14.5.2 yeast extract 1.5 กรัม

14.5.3 Lactose 5 กรัม



ภาคผนวก ข
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณเล็กโทสจากของเหลวซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ student's t-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)

Source	Type III Sum	df	Mean		
	of Squares		Square	F	Sig.
การตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณต่างๆ	33.052	5	6.610	0.638	0.674
REP	240.365	3	80.122	7.738	0.002
Error	155.323	15	10.355		
Total	63538.010	24			
Corrected Total	428.740	23			

หมายเหตุ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) = 0.638

ตารางผนวกที่ ข2 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนจากของเหลวซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ student's t-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)

Source	Type III Sum	df	Mean		
	of Squares		Square	F	Sig.
การตกตะกอนด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณต่างๆ	5295.484	5	1059.09	14.20	0.000
REP	358.597	3	119.532	1.604	0.230
Error	1118.073	15	74.538		
Total	13279.441	24			
Corrected Total	6772.154	23			

หมายเหตุ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) = 0.835

ตารางผนวกที่ ข3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนจากของเหลวซึ่งผ่านการตกตะกอน
ด้วย $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ จากการ
ทดลอง 4 ซ้ำ ด้วยวิธี Tukey's test

	TRT	N	Subset	
			1	2
Tukey HSD (a,b)	6.00	4	4.9062	
	5.00	4	5.8015	
	3.00	4	7.3340	
	4.00	4	7.4423	
	2.00	4		29.7155
	1.00	4		43.5979
	Sig.		0.998	0.263

หมายเหตุ Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 74.538.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุภานันท์ จันทร์ประอบ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	16 พฤศจิกายน 2525
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เคมี-ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์ พลังงาน (พ.ศ. 2550)