



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตแก๊สไฮโดรเจนชีวภาพจากกากตะกอนน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิล

Biohydrogen Production from Wastewater Sludge in a Recycle Paper Mill

นามผู้วิจัย นายศุภโชค ตาปนานนท์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ประไพพิศ ชัยรัตน์มโนกร, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทรา เฟื่องธรรมกิริติ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จักรกฤษณ์ มหัจฉริยวงศ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนชีวภาพจากกากตะกอนน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิล

Biohydrogen Production from Wastewater Sludge in a Recycle Paper Mill

โดย

นายสุกโขก ตาปนนานนท์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2552

ศุภโชค ตาปนานนท์ 2552: การผลิตแก๊สไฮโดรเจนชีวภาพจากกากตะกอนน้ำเสียใน
โรงงานกระดาษรีไซเคิล ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการ
สิ่งแวดล้อม) สาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์
สิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร,
D.Eng. 104 หน้า

แก๊สไฮโดรเจนเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้
ทดแทนเชื้อเพลิงจากฟอสซิลได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต
แก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิล กากตะกอนของ
ระบบบำบัดน้ำเสียมีเซลลูโลสตกค้างอยู่ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำกากตะกอนมาใช้ผลิตเอนไซม์
เซลลูเลสและก๊าซไฮโดรเจนได้ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือใช้ทาง
การเกษตรด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* (TR) และ *Phanerochaete sp.* (PC) การผลิตเอนไซม์
เซลลูเลสโดยเชื้อ TR ในการหมักด้วยฟางข้าวร่วมกับรำข้าวที่พีเอช 6 ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
(TR-Cs) สูงสุด 2.90 ± 0.02 FPU/g และเชื้อ PC ในการหมักด้วยกากตะกอนร่วมกับรำข้าวที่พีเอช 5
ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (PC-Cs) 1.53 ± 0.07 FPU/g การปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลาย
NaOH เข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ก่อนไฮโดรไลซิสด้วย TR-Cs และ PC-Cs 5 FPU ที่
พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 912.18 ± 3.77
และ 746.82 ± 11.32 mg/L ตามลำดับ และเมื่อปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น
3% ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ก่อนไฮโดรไลซิสด้วย TR-Cs และ PC-Cs 5 FPU ที่
สภาวะเดียวกันจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเป็น 1590.06 ± 14.44 และ 1447.05 ± 52.97 mg/L
ตามลำดับ การผลิตแก๊สไฮโดรเจนในสภาวะไร้อากาศใช้กากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพและ
ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ โดยหมักกากตะกอนร่วมกับเศษกระดาษที่ปรับสภาพ
ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3% ร่วมกับความร้อนและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสใน
สัดส่วนกากตะกอน 3.5% และกระดาษ 0.5% ด้วยเชื้อที่ปรับสภาพด้วยความร้อนในสภาวะไร้
อากาศโดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 216
ชม. ให้ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนสูงสุดคือ 7.23 ± 0.11 mmol/g cellulose

Supachok Tapananont 2009: Biohydrogen Production from Wastewater Sludge in a Recycle Paper Mill. Master of Science (Environmental Technology and Management), Major Field: Environmental Technology and Management, Department of Environmental Science. Thesis Advisor: Miss Prapaipid Chairattanamanokorn, D.Eng. 104 pages.

Hydrogen is an alternative and environmental friendly fuel capably substituting fossil fuels. The objective of this study was to define the suitable culture condition for the hydrogen production from sludge of a wastewater in a paper mill. The sludge contained cellulose, which can be used as a substrate for cellulase and hydrogen production. Cellulase could be produced from agricultural residues and also the sludge by *Trichoderma reesei* (TR) and *Phanerochaete sp.* (PC). The anaerobic fermentation of sludge that was pretreated and hydrolyzed with the crude cellulase was conducted to produce hydrogen. The highest production of cellulase under solid state fermentation on rice straw and rice bran with TR (TR-Cs) at pH 6 was 2.90 ± 0.02 FPU/g and that on the sludge and rice bran with PC (PC-Cs) at pH 5 was 1.53 ± 0.07 FPU/g. Pretreatment of the sludge with 3% NaOH for 2 hr. and hydrolysis with 5 FPU/g of TR-Cs and PC-Cs at 50°C and pH 4.8 for 24 hr. provided the highest concentration of reducing sugar at 912.18 ± 3.77 and 746.82 ± 11.32 mg/L, respectively. Moreover, the pretreatment with 3% NaOH under high temperature (121°C) before the enzymatic hydrolysis with TR-Cs and PC-Cs promoted the production of reducing sugar to 1590.06 ± 14.44 and 1447.05 ± 52.97 mg/L, respectively. The fermentation with heat-shock sludge of pretreated and enzymatic hydrolyzed pulping sludge (3.5%) and paper residue (0.5%) under the ratio of carbon and nitrogen (C/N) at 40, pH 6 and 37°C for 216 hr produced the highest hydrogen yield (7.23 ± 0.11 mmol/g cellulose).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ได้โดยการอุปการะและช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ประไพพิศ ชัยรัตน์มโนกร อาจารย์ที่ปรึกษาหลักและ ผศ.ดร. กัทธา เฟงธรรมกิริติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย และ คำแนะนำด้านต่าง ๆ เกี่ยวกับงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมถึงคณาจารย์ภาควิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมทุกท่านที่ให้ความรู้ ความเข้าใจและกำลังใจแก่ข้าพเจ้าอย่างดีเสมอมา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนวิจัยและทุนพัฒนากลุ่มวิจัยเพื่อการพัฒนากระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากวัตถุดิบมวลชีวภาพ โดยจุลินทรีย์ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอขอบแต่คุณพ่อสิทธิชัย คุณแม่ชูศรี ตาปนานนท์ และคณาจารย์ที่ได้อบรมสั่งสอน รวมถึงให้คำแนะนำแก่ข้าพเจ้าตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่อาจกล่าวนามได้หมดในที่นี้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นแรงใจแก่ข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีเสมอมา

ศุภโชค ตาปนานนท์

กันยายน 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	31
อุปกรณ์	31
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	72
สรุป	72
ข้อเสนอแนะ	72
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	73
ภาคผนวก	81
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์	82
ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลอง	87
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	104

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	18
2	การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	23
3	การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากแหล่งจุลินทรีย์ที่ปรับสภาพในสภาวะต่างๆ	24
4	คุณสมบัติของกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ ฟางข้าว ชานอ้อย และรำข้าว	43
5	ปริมาณสัดส่วนเซลลูโลสของกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ ฟางข้าว และชานอ้อย	44
6	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ <i>Trichoderma sp.</i> และ <i>Phanerochaete sp</i>	49
7	ปริมาณองค์ประกอบบางประการของกากตะกอนก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง	57
8	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนที่ปรับสภาพในสภาวะต่างๆ ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	58
9	ปริมาณไฮโดรเจนสะสมและผลผลิตไฮโดรเจนที่สภาวะในการหมักต่างๆ	69
10	ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกลุ่มจุลินทรีย์ด้วยสับสเตรทชนิดต่างๆ	71
ตารางผนวกที่		
ข1	ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักกากตะกอนที่สภาวะสัดส่วนของแข็งที่แตกต่างกันในสภาวะแบบแบบไร้อากาศ พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง	88
ข2	ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักกากตะกอนที่สภาวะสัดส่วนของแข็งที่แตกต่างกันด้วยสภาวะแบบไร้อากาศ พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง (ต่อ)	89

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข3 ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักแบบไร้อากาศที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 20 และ 40 พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง	90
ข4 ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4 5 และ 6 ระยะเวลา 192 ชั่วโมง	91
ข5 ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆระยะเวลา 192 ชั่วโมง	92
ข6 ปริมาณกรดไขมันระเหยจากการหมักกากตะกอนที่ปรับสภาพ ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมในสภาวะแบบไร้อากาศ ที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง	93
ข7 พีเอชในการหมักกากตะกอนที่สภาวะสัดส่วนของแข็งที่แตกต่างกันด้วยสภาวะแบบไร้อากาศ พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง	94
ข8 พีเอชในการหมักแบบไร้อากาศที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 20 และ 40 พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง	95
ข9 พีเอชในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4 5 และ 6 ระยะเวลา 240 ชั่วโมง	96
ข10 พีเอชในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆระยะเวลา 240 ชั่วโมง	97
ข11 พีเอชจากการหมักกากตะกอนที่ปรับสภาพ ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมในสภาวะแบบไร้อากาศ ที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง	98
ข12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในการหมักกากตะกอนที่สภาวะสัดส่วนของแข็งที่แตกต่างกันด้วยสภาวะแบบไร้อากาศ พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง	99

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
<p>ข13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซในการหมักแบบไร้อากาศที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 20 และ 40 พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง</p>	100
<p>ข14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4 5 และ 6 ระยะเวลา 240 ชั่วโมง</p>	101
<p>ข15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆระยะเวลา 240 ชั่วโมง</p>	102
<p>ข16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซจากการหมักกากตะกอนที่ปรับสภาพ ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมในสภาวะแบบไร้อากาศ ที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง</p>	103

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพกระบวนการผลิตกระดาษจากกระดาษรีไซเคิลและการเกิดกากตะกอน	4
2	โครงสร้างของเซลล์ลูโลส	8
3	กลไกการหมักกลูโคส โดยจุลินทรีย์กลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน	25
4	กลไกการหมักกลูโคสเพื่อผลิตไฮโดรเจนโดยย่อ	27
5	ขั้นตอนการศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานกระดาษรีไซเคิล	33
6	ผลของแหล่งสับสเตรทต่อผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ <i>Trichoderma reesei</i> และเชื้อ <i>Phanerochaete sp.</i> ในระยะเวลาต่างๆ	45
7	ผลของพีเอชเริ่มต้นผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ <i>Trichoderma reesei</i> และเชื้อ <i>Phanerochaete sp.</i> ในระยะเวลาต่างๆ	46
8	ผลของความชื้นเริ่มต้นผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ <i>Trichoderma reesei</i> และเชื้อ <i>Phanerochaete sp.</i> ในระยะเวลาต่างๆ	48
9	ผลของอุณหภูมิและการเขย่าต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่พีเอช 4.8 ระยะเวลา 12 ชั่วโมง	50
10	ผลของพีเอชต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชม	52
11	ผลของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยความร้อนต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 ระยะเวลา 24 ชม.	523
12	ผลของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารเคมีต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 ระยะเวลา 24 ชม.	54
13	ผลของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยต่างร่วมกับความร้อนต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 ระยะเวลา 24 ชม.	56

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ผลของสัดส่วนของแข็งของกากตะกอนและกระดาษต่อผลผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20 พีเอช 5 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ ระยะเวลา 216 ชม.	59
15	ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อผลผลิตไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และ กระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียสในระยะเวลา 264 ชม.	61
16	ผลของสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อผลผลิตไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) พีเอช 5 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.	62
17	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อผลผลิตไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และ กระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.	63
18	ผลของการปรับสภาพกากตะกอน การใช้เอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมต่อผลผลิต ไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอน ต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 240 ชม.	65
19	ผลของการปรับสภาพกากตะกอน การใช้เอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมต่ออัตราการ ผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) อัตราส่วน คาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.	66
20	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แก๊สไฮโดรเจนสะสม ปริมาณแก๊สรวมสะสม จากการหมักกาก ตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.	66
21	ปริมาณแก๊สไฮโดรเจน ปริมาณกรดไขมันระเหยและพีเอชจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

- ก1 กราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
(มิลลิกรัม)

86

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนชีวภาพจากกากตะกอนน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิล

Biohydrogen Production from Wastewater Sludge in a Recycle Paper Mill

คำนำ

เชื้อเพลิงฟอสซิลเป็นเชื้อเพลิงหลักที่ทุกประเทศใช้ประโยชน์ ซึ่งมีปริมาณจำกัดและลดน้อยลงไปเรื่อยๆ อีกทั้งการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิลก่อให้เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั่วโลกอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มว่าสถานการณ์นี้จะเพิ่มความรุนแรงขึ้น หากไม่ลดปริมาณการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลลง ดังนั้นการสำรวจพลังงานทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นในขณะนี้

แก๊สไฮโดรเจนเมื่อเผาไหม้กับแก๊สออกซิเจนได้ผลิตผลคือพลังงานและน้ำเท่านั้น จึงเป็นพลังงานที่สะอาดไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลได้ การผลิตแก๊สไฮโดรเจนสามารถทำได้หลายวิธีเช่น อิเล็กโทรไลซิสจากน้ำ (water electrolysis) การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากเชื้อเพลิงฟอสซิล (coal gasification), รีฟอร์มมิ่งด้วยไอน้ำ (steam reforming) และวิธีสันดาปบางส่วน (partial oxidation) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีกระบวนการทางชีวภาพในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยจุลินทรีย์ (จินตนา, 2543; มงคล, 2547) จุลินทรีย์ที่ผลิตแก๊สไฮโดรเจนมีหลายชนิดทั้งชนิดที่ต้องการออกซิเจนและชนิดที่ไม่ต้องการใช้ออกซิเจน โดยจุลินทรีย์กลุ่ม chemotrophs สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ เช่น *Acetobacterium*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Methanococcus* และ *Ruminococcus* เป็นต้น (Kondrotieva, et al., 1983; Zajic, et al., 1978) โดยปริมาณของแก๊สไฮโดรเจนที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดจุลินทรีย์และสภาวะที่ใช้ในการหมัก

กากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ และเป็นการนำของเสียมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อีก เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ที่พบมากที่สุดเซลลูโลส (เนริสา, 2543) ซึ่งมีสัดส่วนปริมาณเซลลูโลส 40-45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โครงสร้างของเซลลูโลสหลักประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4 ไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic) การย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสที่นิยมใช้

กันมี 2 วิธีคือ การไฮโดรไลซิสด้วยกรด และการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยการศึกษาที่น่าสนใจการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เอนไซม์เซลลูเลสเป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ exoglucanase (1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase), endoglucanase (1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolase) และ β -glucosidase (β -D-glucoside-4-glucohydrolase) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เชื้อรา *Trichoderma reesei* (Gome, *et al.*, 1992) เพราะง่ายต่อการปรับปรุงพันธุ์ในการปรับปรุงผลผลิต การนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมจะมีข้อจำกัดคือ ต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ค่อนข้างสูง สาเหตุหลักนั้นมาจากการใช้สารที่มีราคาแพงเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีผู้สนใจศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่มีราคาถูกมาทดแทน เช่น การนำกากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ ฟาง ชานอ้อย หรือรำข้าว ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบมาใช้ผลิตเอนไซม์ ซึ่งนอกจากจะลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์แล้ว ยังลดปริมาณของเสียได้อีกทางหนึ่ง

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ โดยมีการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Trichoderma reesei* และ *Phanerochaete sp.*

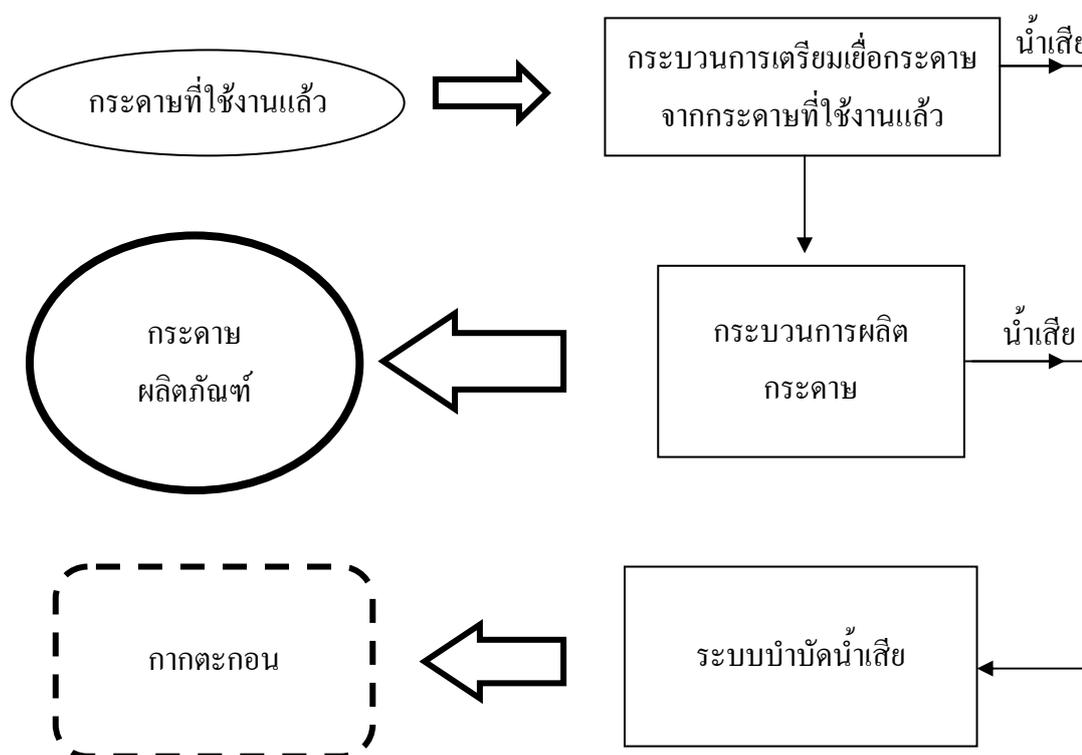
วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิล ฟางข้าว ชานอ้อยและรำข้าว
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวิซ์โดยการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิล

การตรวจเอกสาร

1. กระบวนการผลิตกระดาษจากในอุตสาหกรรมกระดาษรีไซเคิล

อุตสาหกรรมกระดาษรีไซเคิล คือ อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษจากกระดาษที่ใช้งานแล้ว ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการหลัก 2 กระบวนการ คือ กระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษจากกระดาษใช้แล้ว (recycle fiber process) เป็นกระบวนการกำจัดหมึกและสิ่งปนเปื้อนออกจากกระดาษใช้แล้ว และเปลี่ยนกระดาษใช้แล้วให้กลับเป็นเยื่อกระดาษ และกระบวนการผลิตกระดาษ (paper making) จะใช้เยื่อกระดาษที่ได้จากกระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษมาขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนภาพกระบวนการผลิตกระดาษจากกระดาษรีไซเคิลและการเกิดกากตะกอนระบบบำบัดน้ำเสีย

1.1 กระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษจากกระดาษใช้แล้ว

กระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษจากกระดาษที่ใช้แล้ว เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนเยื่อกระดาษในกระดาษที่ใช้งานแล้วให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะนำมาใช้ในการผลิตกระดาษอีกครั้ง กระบวนการผลิตเยื่อกระดาษจะมีความแตกต่างกันไปตามลักษณะของกระดาษที่ต้องการผลิต กระบวนการสำคัญในการเตรียมเยื่อกระดาษมีดังนี้

1.1.1 กระบวนการแยกเยื่อ (slushing and pulping) เป็นกระบวนการเปลี่ยนกระดาษที่ผ่านการใช้งานแล้วให้กลายเป็นเส้นใยเยื่อกระดาษให้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

1.1.2 กระบวนการกรองเยื่อกระดาษ (screening) มีจุดประสงค์เพื่อทำการแยกสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ออกจากเยื่อกระดาษ โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของสิ่งปนเปื้อนกับเยื่อกระดาษ กระบวนการกรองจะมีการทำการกรองหลาย ๆ ชั้น โดยเครื่องจักรและขนาดของตัวกรองจะแตกต่างกันไป เพื่อให้สามารถแยกเยื่อกระดาษออกจากสิ่งปนเปื้อนให้ได้มากที่สุด

1.1.3 กระบวนการทำความสะอาดเยื่อ (cleaning) เป็นกระบวนการที่จะแยกสิ่งปนเปื้อนที่มีขนาดเล็ก เช่น ทราย เศษ โลหะชิ้นเล็ก ๆ เม็ดพลาสติกขนาดเล็ก เป็นต้น

1.1.4 กระบวนการกำจัดหมึก (deinking) ในการนำเยื่อกระดาษรีไซเคิลมาใช้ในการผลิตกระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษทิชชู หรือกระดาษพิมพ์เขียน จะต้องมีการกำจัดหมึกออกจากเยื่อกระดาษที่ผ่านการทำความสะอาดแล้วในขั้นตอนแรก ในกระบวนการกำจัดหมึกจะมีการเติมสารเคมีลงไปให้น้ำเยื่อเพื่อทำปฏิกิริยาให้อนุภาคของหมึกแยกตัวออกจากเยื่อกระดาษ สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดหมึกออกจากเยื่อกระดาษคือสารเคมีประเภทสารลดแรงตึงผิวเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โซเดียมซิลิเกต (NaSiO_3) สบู่หรือกรดไขมัน เป็นต้น ในการกำจัดหมึกควรปรับสภาพความเป็นกรดด่างของน้ำในกระบวนการแยกเยื่อเพื่อให้มีค่าพีเอชอยู่ที่ประมาณ 9-10 เพื่อให้ประสิทธิภาพในการกำจัดหมึกสูงขึ้น การกำจัดหมึกมีวัตถุประสงค์หลักคือ เพื่อเพิ่มความขาวสว่าง (brightness) ของเยื่อกระดาษและกำจัดกาวหรือยางสนที่เจือปนอยู่ในเยื่อกระดาษ กระบวนการกำจัดหมึกสามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

- วิธีโฟลทเทชั่น (flotation) ในกระบวนการโฟลทเทชั่น อากาศจะถูกเป่าเข้าไปในน้ำเยื่อทำให้เกิดฟองอากาศขึ้น ฟองอากาศที่เกิดขึ้นนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวพาจุดหมึกที่ผสมอยู่ใน

เยื่อกระดาษกับน้ำเยื่อให้ลอยขึ้นสู่ผิวหน้าของเครื่องแยกหมึก และถูกแยกออกมาจากเยื่อกระดาษ โดยการกวาดผิวหน้าของน้ำเยื่อออก ในระบบโพลทเทชั่นอาจมีการเติมสารเคมีก่อตะกอน เช่น สารโพลิเมอร์ หรือสารอิเล็กโตรไลต์ เป็นต้น ลงในระบบเพื่อทำให้เส้นใยละเอียดที่มีขนาดเล็ก และเศษขยะขนาดเล็กต่าง ๆ รวมตัวกันเป็นตะกอน ซึ่งจะทำการสิ่งเจือปนเหล่านี้สามารถเกาะติดกับฟองอากาศได้ดี และสามารถกำจัดสิ่งเจือปนต่าง ๆ รวมทั้งอนุภาคหมึกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

- วิธีล้าง (washing) วิธีล้างใช้สำหรับการกำจัดอนุภาคหมึกขนาดเล็กกว่า 15 ไมครอนลงมา ซึ่งกำจัดด้วยวิธีโพลทเทชั่นได้ยาก วิธีการล้างจะนำเอาน้ำเยื่อที่ผ่านการผสมสารเคมีสำหรับกำจัดหมึกแล้วมาฉีดผ่านบนตะแกรงโค้ง (deasher) น้ำและจุดหมึกจะถูกแยกทะลุตะแกรงออกไป

1.1.5 กระบวนการกระจายเยื่อ (dispenser) เป็นกระบวนการที่จะช่วยเพิ่มคุณภาพให้แก่เยื่อกระดาษที่นำกลับมาใช้ใหม่และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ กระบวนการกระจายเยื่อมีหน้าที่หลักคือการแตกสิ่งเจือปนที่ปนเปื้อนอยู่ในเยื่อกระดาษ เช่น สารเคลือบผิวและสารเติมแต่งในกระดาษ ก้อนสิ่งสกปรก ที่เกิดจากการจับตัวกันของสิ่งปนเปื้อน และเยื่อกระดาษที่มีการจับตัวเป็นก้อน เป็นต้น

1.1.6 กระบวนการฟอกขาว (bleaching) เป็นกระบวนการที่ช่วยเพิ่มคุณสมบัติด้านความขาวของเยื่อกระดาษ ทำให้กระดาษผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้มีคุณภาพสูงขึ้น ในการผลิตเยื่อกระดาษรีไซเคิล ไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการฟอกขาวเสมอไป การนำกระบวนการฟอกขาวมาใช้ในการผลิตเยื่อกระดาษรีไซเคิลจะทำเฉพาะกรณีที่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูง อย่างเช่น กระดาษขาวที่ใช้ในสำนักงาน เป็นต้น สารเคมีที่ใช้ในการฟอกขาวเยื่อกระดาษมีหลายชนิด เช่น สารเคมีประเภทที่ไม่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โซเดียมไดไทโอไนท์ ($Na_2S_2O_4$) เป็นต้น สารเคมีที่มีสารคลอรีนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ($NaOCl$) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ออกซิเจน (O_2) ร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการฟอกขาวเยื่อกระดาษรีไซเคิลอีกด้วย

1.2 กระบวนการผลิตกระดาษ

กระบวนการผลิตกระดาษจะเริ่มจากการกำจัดสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับเยื่อกระดาษ ออกโดยกระบวนการกรอง จากนั้นจึงส่งเข้าสู่เครื่องจักรผลิตกระดาษ (paper machine) เพื่อแปรรูปเยื่อกระดาษให้เป็นกระดาษผลิตภัณฑ์ โดยกระบวนการต่างๆ ในการผลิตกระดาษอาจมีการเติมสารเคมีเพื่อปรับแต่งคุณภาพของกระดาษ เช่น แป้ง ผงสี (pigments) กาว (binder) และสารเติมแต่งอื่นๆ เป็นต้น

จากกระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษและการผลิตกระดาษนี้จะทำให้เกิดน้ำเสียออกมา และถูกส่งไปยังระบบบำบัดน้ำเสีย

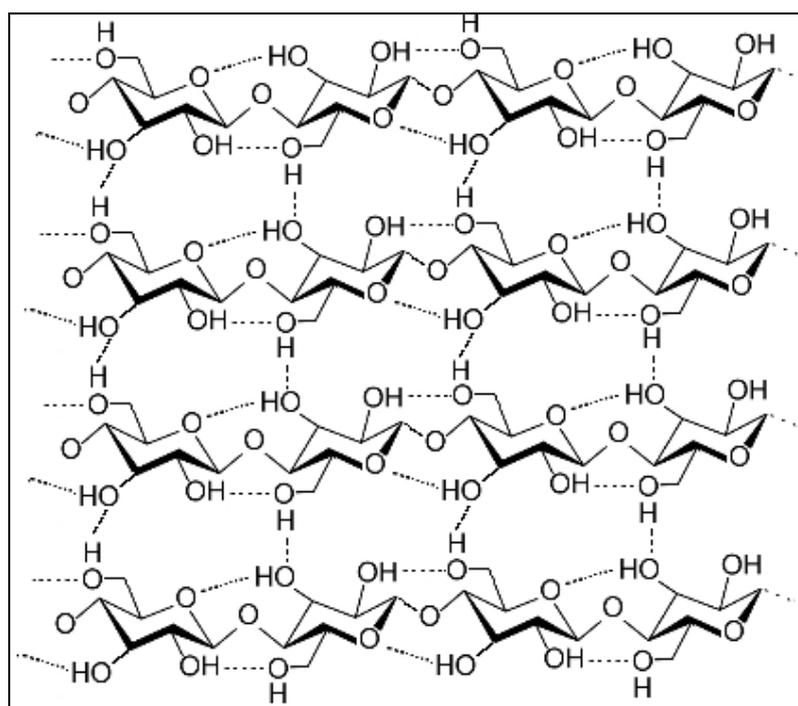
1.3 กากตะกอนน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิล

กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษมีองค์ประกอบของเซลลูโลส (cellulose) เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ (polymer) ชนิดหนึ่งที่พบในธรรมชาติ ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงและเป็นโครงสร้างให้กับพืช โดยทั่วไปเซลลูโลสจะอยู่ร่วมกับเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และ ลิกนิน (lignin) เช่น ไม้ กระดาษ และฟ้าย เป็นต้น โครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส (glucose) หลายโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β 1-4, กลูโคซิดิกเป็นโมโนเมอร์หลายหน่วยยาวประมาณ 4,000 ถึง 8,000 โมเลกุล (ภาพที่ 2) เซลลูโลสโมเลกุลมีความแข็งแรงสูงมาก ซึ่งสลายได้โดยการย่อยด้วยกรด ค่าง หรือเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เซลลูโลสที่มีโครงสร้างในลักษณะผลึกที่เป็นระเบียบ (crystalline) จะแข็งแรงและทนต่อการถูกไฮโดรไลซิสด้วยกรด ค่างหรือเอนไซม์ ส่วนเฮมิเซลลูโลส มีโครงสร้างในลักษณะอสัณฐาน (amorphous) ไม่เป็นระเบียบ มีความแข็งแรงต่ำ ถูกไฮโดรไลซิสได้ง่ายด้วยกรด (acid) หรือ ค่าง (base) เจือจางดังนั้นการนำเซลลูโลสมาใช้จึงควรมีการปรับสภาพเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้ประโยชน์ (สุภาวินี, 2550)

การย่อยสลายเซลลูโลสที่นิยมใช้มี 2 วิธี คือ การไฮโดรไลซิสด้วยกรด และการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (สุกัลักษณ์, 2543)

1.3.1 การไฮโดรไลซิสด้วยกรด (acid hydrolysis)

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดมีเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกคือการใช้สารละลายกรดเข้าไปทำลายโครงสร้างของเซลลูโลส โดยกรดทำให้เซลลูโลสพองตัว ขั้นตอนที่ 2 เติมน้ำเพื่อลดความเป็นกรด จากนั้นใช้ความร้อนซึ่งทำให้เซลลูโลสถูกตัดเป็น โมเลกุลเล็กๆ คือ น้ำตาล ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรด คือ ความเข้มข้นของกรดที่ใช้จะต้องมีความเข้มข้นสูง และใช้อุณหภูมิที่สูง ทั้งนี้เพื่อให้โครงสร้างประเภท crystalline ซึ่งทนต่อการย่อยด้วยกรดเกิดการแตกตัวให้หมดด้วย กรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 41 เปอร์เซ็นต์ หรือกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (ศุกลักษณ์, 2543) แต่การย่อยสลายด้วยกรดไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยกรดไม่จำเพาะเจาะจงและมีความเสี่ยงอันตรายในกระบวนการผลิตสูง



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา: ศุกลักษณ์ (2543)

1.3.2 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

ปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ปฏิกิริยาไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกทำปฏิกิริยาต่อไป เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้รวมเรียกว่าเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสหรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ทั้งในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม (ศุภลักษณ์, 2543)

2. เอนไซม์เซลลูเลส

การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลลูโลสเป็นกลูโคสนั้นเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มที่เรียกว่า เซลลูเลส ซึ่งจะย่อยเซลลูโลสโดยการตัดพันธะ glycosidic เอนไซม์เซลลูเลสแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ endo- β -glucanase, exo- β -glucanase และ β -glucosidase ซึ่งมีกิจกรรมแตกต่างกัน (สุภาวีนี, 2550; Fan and Lee, 1983)

2.1 ชนิดของเอนไซม์เซลลูเลส

2.1.1 เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (EC 3.2.1.4; 1,4- β -D glucan 4-glucanohydrolase) หรืออาจเรียกว่าเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ทำหน้าที่ในการตัดพันธะ β -1,4 -glycosidic ของโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม จำเพาะต่อโครงสร้างในลักษณะรูปร่างไม่เป็นระเบียบ

2.1.2 เอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส หรือเอกโซกลูคาเนส (EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glucan; cellobiohydrolase (CBH)) ทำหน้าที่ตัดพันธะ β -1,4 glycosidic จากปลายของสายโซ่เซลลูโลส ซึ่งอาจย่อยจากปลายรีดิวซ์ (reducing end) หรือปลายนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) (Eriksson and Wood, 1985; Terri, 1997) มีความจำเพาะต่อโครงสร้างในลักษณะที่เรียงตัวเป็นระเบียบ ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลเซลโลไบโอส การทำงานคล้ายกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสคือ แสดงกิจกรรมสูงต่อเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (amorphous cellulose) แต่แสดงกิจกรรมต่ำต่อเซลลูโลสที่มีโครงสร้างเรียงตัวเป็นระเบียบ (crystalline cellulose)

2.1.3 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21; β -D-glucoside glucohydrolase) ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลเซลโลไบโอส หรือเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ ได้ผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

2.2.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารเริ่มต้น การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ จะต้องมี การรวมตัวกันของเอนไซม์-สารเริ่มต้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของ โมเลกุลทั้งสอง ถ้ามีสารเริ่มต้นพอเพียง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นสองเท่าจะทำให้ อัตราเร็วเพิ่มขึ้น ไปเป็น 2 เท่าด้วย แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อไปเรื่อย ๆ อัตราการ เกิดปฏิกิริยาเป็นแนวระนาบเพราะสารเริ่มต้นเริ่มหมดไป ทำให้เป็นตัวจำกัดการเกิดปฏิกิริยาได้ อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับ การชนกันของ โมเลกุล ซึ่งจะชนกันมากขึ้นเมื่อปริมาณ เอนไซม์หรือสารเริ่มต้นมากขึ้น

อัตราการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นนั้น ถ้าให้เอนไซม์เป็นตัวคงที่และเพิ่ม ปริมาณสารเริ่มต้นขึ้นเรื่อยๆ นั้น ปฏิกิริยาได้เป็น 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของสาร เริ่มต้น

ระยะที่ 2 อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มลดลงเนื่องจากปริมาณของเอนไซม์เริ่มเป็น ตัวจำกัด

ระยะที่ 3 อัตราเร็วถึงจุดอิ่มตัว

2.2.2 พีเอช (pH) พีเอชของสารละลายจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ใน หลายด้าน เอนไซม์แต่ละชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์จะลดลง เมื่อพีเอชสูงหรือต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสม พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 6-8 การใช้เอนไซม์ในสารละลายที่พีเอชสูงมากหรือต่ำมาก จะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ

เนื่องจากเอนไซม์ประกอบด้วยกลุ่มอะมิโนและคาร์บอกซิล เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงประจุของไฮโดรเจนไอออนในสารละลาย ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

พีเอชลดลง $-NH_2$ กลายเป็น $-NH_3^+$

พีเอชเพิ่มขึ้น $-COOH$ กลายเป็น $-COO^-$

พีเอชอยู่ที่ isoelectric point

$-NH_2$ ยังคงเป็น $-NH_2$

$-COOH$ ยังคงเป็น $-COOH$

นอกจากพีเอชจะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์แล้วยังมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาอีก 2 ทาง คือ

- กิจกรรมของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับการปรากฏของกลุ่มอะมิโน และกลุ่มคาร์บอกซิลซึ่งทั้ง 2 กลุ่มอาจจะมีประจุหรือไม่มีประจุก็ได้แต่เอนไซม์จะทำงานได้ดีเพียงเมื่อกลุ่มทั้ง 2 มีประจุหรือไม่มีประจุแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ ถ้าเอนไซม์ทำงานได้ดีเมื่อกลุ่มอะมิโนไม่มีประจุพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้มักจะสูง ในขณะที่ถ้าเอนไซม์ทำงานได้ดีเมื่อคาร์บอกซิลเป็นกลางพีเอชที่เหมาะสมจะต่ำ

- พีเอชควบคุมการแตกตัวของสารเริ่มต้น ซึ่งมีหลายปฏิกิริยาต้องเกิดการแตกตัวของสารเริ่มต้นก่อน ปฏิกิริยาจึงจะดำเนินต่อไปได้

2.2.3 อุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้พลังงานจลน์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วย อัตราการเพิ่มความเร็วของปฏิกิริยาคำนวณได้จากค่า Q_{10} หรือ temperature quotient ค่า Q_{10} ของเอนไซม์มักจะมีค่ามากกว่า 1 ขึ้นไป

$$Q_{10} = \frac{\text{อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ } X^\circ + 10^\circ C}{\text{อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ } X^\circ C}$$

2.2.4 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (reaction product) อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สามารถวัดได้จากอัตราการหายไปของสารเริ่มต้นหรืออาจจะวัดจากการปรากฏขึ้นของผลิตภัณฑ์ หรือทำทั้ง 2 วิธีพร้อมกัน แต่ไม่ว่าจะวัดโดยวิธีใด จะพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดช้าลงนี้ เป็นเพราะเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังเกิดเพราะมีการลดลงของสารเริ่มต้น และผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มากขึ้น จนถึงความเข้มข้นหนึ่ง อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ (reversibility) โมเลกุลของผลิตภัณฑ์จะรวมกับเอนไซม์แทนสารเริ่มต้นทำให้ปฏิกิริยาถูกจำกัดได้

2.2.5 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (inhibitors) มีสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ สารเหล่านี้อาจจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น โลหะหนักต่าง ๆ หรืออาจจะเป็นสารอินทรีย์ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic) หรือโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

- competitive inhibitor เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารเริ่มต้นมาก และเข้าแย่งทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ active site ของเอนไซม์ เมื่อเกิดการรวมกันเป็นเอนไซม์-สารยับยั้ง (enzyme-inhibitor) จะทำให้ปริมาณของเอนไซม์ลดลง ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง สารยับยั้งเหล่านี้อาจจะเปลี่ยนหรือไม่เปลี่ยนไปก็ได้ การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นให้มากขึ้นจะลดผลของ competitive inhibitor ได้

- non competitive inhibitor สารชะงักการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะเข้ารวมกับเอนไซม์แต่จะไม่รวมที่ active site สารพวกนี้มีลักษณะต่างจากสารเริ่มต้น การเพิ่มปริมาณของสารเริ่มต้นจะไม่สามารถลบล้างผลของสารเหล่านี้ได้ โลหะที่เป็นพิษทั้งหลาย และสารที่รวมหรือทำลาย กลุ่มซัลไฟไฮดริล มักจะเป็นสารในกลุ่มนี้ เช่น การที่มีออกซิเจนมาก จะทำให้ -SH ถูกออกซิไดซ์ เกิดไดซัลไฟด์บริดจ์ขึ้นมา ซึ่งทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้ active site รวมกับสารเริ่มต้นไม่ได้ ส่วนโลหะ เช่น Hg^{+2} และ Ag^{+} จะเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของกลุ่มซัลไฟไฮดริล เกิดเป็น เมอแคปไทด์ (mercaptides) ซึ่งไม่ละลายน้ำ

- uncompetitive inhibitor สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ชนิดนี้ไม่รวมกับเอนไซม์อิสระ และไม่ผลกระทบบต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ และสารเริ่มต้น แต่จะเข้ารวมกับเอนไซม์-สารเริ่มต้น ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ การชะงักการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีสารเริ่มต้นมากขึ้น สารชะงักชนิดนี้มักจะพบในปฏิกิริยาซึ่งมีสารเริ่มต้นสองชนิด

2.3 การปรับสภาพสับสเตรทก่อนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

การปรับสภาพสับสเตรทก่อนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ เช่น การเพิ่มพื้นที่ผิวของสับสเตรท การทำให้โครงสร้างของสับสเตรทเสียสภาพ หรือการลดปริมาณสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น (Hendriks and Zeeman, 2009) ทำให้สารละลายเอนไซม์ซึมเข้าสับสเตรทได้ง่ายขึ้น การปรับสภาพสับสเตรทสามารถทำได้ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.3.1 การใช้เครื่องกลลดขนาด

การลดขนาดของสับสเตรทด้วยเครื่องกลเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของสับสเตรทและทำลายโครงสร้างของสับสเตรท ทำให้สารละลายเอนไซม์สามารถเข้าถึงสับสเตรทได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การที่โครงสร้างของสับสเตรทถูกทำลายจึงทำให้เอนไซม์ทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้นด้วย (Hendriks and Zeeman, 2009)

2.3.2 การปรับสภาพสับสเตรทด้วยความร้อน

ความร้อนจากการปรับสภาพทำให้สารประกอบบางชนิด เช่น ลิกนิน หรือเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น ทำให้โครงสร้างของสับสเตรทที่มีพื้นผิวเพิ่มขึ้นสารละลายเอนไซม์สามารถเข้าถึงสับสเตรทได้มากขึ้น ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จึงสูงขึ้นด้วย (Zhao *et al.*, 2009)

2.3.3 การปรับสภาพสับสเตรทด้วยสารเคมี

การปรับสภาพสับสเตรทด้วยสารเคมีจะทำให้โครงสร้างของสับสเตรทเสียสภาพ สารเคมีทำปฏิกิริยากับสับสเตรททำให้สารประกอบประเภทลิกนิน เฮมิเซลลูโลสละลายออกมาจากโครงสร้างของสับสเตรท เอนไซม์จึงทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท อุณหภูมิ ชนิดของสารเคมี และความเข้มข้นของสารเคมี สารเคมีที่ใช้ในการปรับสภาพสับสเตรทได้แก่ NaOH, HCl, H₂SO₄, CaCl₂ หรือ H₂O₂ เป็นต้น (Zhao *et al.*, 2009; Zhang and Cai, 2008)

Zhao *et al.* (2009) ปรับสภาพขานอ้อยด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3, 5, 7 และ 9% โดยการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 9% ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด การปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 7% ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส สำหรับการปรับสภาพด้วยค่าร่วมกับความร้อนที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคือ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

Tokuyasu *et al.* (2008) ศึกษาการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อ *Trichoderma ongibrachiatum* โดยปรับสภาพเซลลูโลสด้วย CaCl_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะทำให้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 0.527 mmol/mg of cellulose เป็น 1.14 nmol/mg of cellulose

Dienes *et al.* (2004) ศึกษาประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าจากเชื้อ *Trichoderma sp.* 2 ชนิด พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ที่ 50-60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่าแต่เอนไซม์เซลลูเลสอาจเสถียรภาพได้ และพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส อยู่ที่พีเอช 5 และหากเอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งผลิตต่างกันช่วงพีเอชที่เหมาะสมก็อาจต่างกันด้วย

3. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเชื้อรา

ในธรรมชาติเชื้อราจะย่อยสลายอินทรีย์สารต่างๆเพื่อใช้ในการดำรงชีพและขยายพันธุ์ โดยเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ต่างๆออกมาย่อยแหล่งอาหารเพื่อนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและประเภทของแหล่งอาหารนั้นๆ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งขึ้นอยู่กับความเหมาะสม การที่จะให้ผลผลิตเอนไซม์สูงและคุณภาพดีนั้นจะต้องมีการควบคุมสถานะต่างๆ ให้เหมาะสม เช่น พีเอช, ความชื้น, แหล่งอาหาร หรือการปนเปื้อน เป็นต้น รวมทั้งต้องคำนึงถึงราคาต้นทุนในการผลิตด้วย โดยเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Trichoderma reesei*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma koningii*, *Phanerochaete sp.* เป็นต้น (Gome *et al.*, 1992;

สุภาวินี, 2550) นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟาง, ข้าว, ชานอ้อย, แกลบ หรือรำ เป็นต้น เป็นแหล่งอาหารในการผลิตได้ (เนริสา, 2543)

3.1 การเพาะเลี้ยงราเส้นใย (เยาพา, 2540)

สามารถจะแบ่งการเพาะเลี้ยงได้ 2 ประเภท ตามลักษณะของสับสเตรทที่ใช้เพาะเลี้ยง คือ

3.1.1 solid substrate fermentation

เป็นการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยเชื้อราจะเจริญบนสับสเตรทที่มีลักษณะแข็ง เช่น ข้าวเปลือก, ถั่ว, ฟาง, ข้าวโพด ฯลฯ โดยการเลี้ยงก็จะเลี้ยงในขวด ถุงพลาสติก หรือถาด ซึ่งเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็งก็จะใช้สับสเตรทเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นตัวยึดเกาะให้เส้นใยเจริญเติบโต ดังนั้นในอาหารแข็งเหล่านี้ต้องมีความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม เช่น การผลิตอาหารหมักคอง ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว เอนไซม์บางชนิด การเลี้ยงดอกเห็ด เป็นต้น

3.1.2 liquid substrate fermentation

เป็นการเพาะเลี้ยงราเส้นใยในอาหารเหลว โดยที่สับสเตรทอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นของเหลว ซึ่งอาหารเหลวนั้นจะมีแหล่งคาร์บอนและธาตุอาหารอื่นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนั้นสามารถเพาะเลี้ยงได้ในถังหมัก (fermenter) ซึ่งสามารถจะควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้เช่น พีเอช, การเติมอากาศ หรือ อุณหภูมิ เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้พื้นที่น้อยกว่า solid substrate fermentation การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะใช้ในอุตสาหกรรมผลิต กรดซิตริก เอนไซม์ หรือสารแอนติไบโอติก เป็นต้น

3.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อราเส้นใย

การเจริญเติบโตของราเส้นใยในอาหารแข็ง จะแตกต่างกับการเจริญเติบโตของราเส้นใยในอาหารเหลว โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในถังหมักที่มีไบพัดกวนนั้น เชื้อราจะเพิ่มจำนวนโดยการแตกหักของ mycelium แต่ในบางครั้งเส้นใยของเชื้อราอาจจะรวมกันเป็นกลุ่มทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า pellet ซึ่งลักษณะนี้จะเกิดขึ้นกับเส้นใยของเชื้อราเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

ลักษณะ pellet นั้น ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อัตราส่วนของคาร์บอน:ไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของสปอร์ในเชื้อที่เติม

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยในรูปแบบ pellet มีความหนืดน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราเจริญเป็นเส้นใย และปัญหาเกี่ยวกับ mixing และ gas transfer น้อยกว่า แต่ปัญหาที่พบในราที่ form pellet ก็คือการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ (โดยทั่วไปจะเกิดโดยวิธี diffusion) ซึ่งอยู่ข้างใน pellet ก็จะสามารถได้ยากกว่า โดยการเจริญเติบโตของเส้นใยจะเกิดขึ้นที่เส้นใยด้านนอกของ pellet

สำหรับการเจริญเติบโตของราเส้นใยในอาหารแข็ง ส่วนของปลายเส้นใยทั้งสองด้าน จะมีการเจริญเติบโตยื่นออกมา แต่ทิศทางของการเจริญเติบโตและอัตราการเจริญเติบโตนั้นจะขึ้นอยู่กับสารอาหารและชนิดของสับสเตรท โดยทั่วไปพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารแข็งจะต่ำกว่าอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเหลวมาก โดยค่าเฉลี่ยของ doubling time ของราจำพวกเห็ดในอาหารเหลวที่เลี้ยงในถังหมักจะมีค่าประมาณ 4-8 ชั่วโมง ขณะที่ค่า doubling time ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง จะมีค่าประมาณ 5.5 วัน

3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของราเส้นใย

สภาพแวดล้อมมีผลต่อการเจริญเติบโตของราเส้นใย ตลอดจนคุณภาพของผลผลิต เช่น ชนิดของ สับสเตรท, พีเอช, อุณหภูมิ ฯลฯ สับสเตรทสำหรับ solid substrate fermentation ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ขี้เลื่อย, ฟาง, ข้าวโพด, ข้าวฟ่าง โดยสับสเตรทเหล่านี้จะมีแหล่งคาร์บอนซึ่งก็คือคาร์โบไฮเดรตเป็นอาหารหลัก เชื้อราจะเจริญได้แตกต่างกันบนสับสเตรทแต่ละชนิด สำหรับค่าพีเอชและอุณหภูมิ ก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของราเส้นใยเพราะ พีเอชและอุณหภูมิจะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ โดยทั่วไป พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้าง mycelium คือ พีเอชประมาณ 5.0 - 6.0

Kansoh *et al.* (1999) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei*. โดยใช้แหล่งสับสเตรทเป็นขานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยสารเคมี ซึ่งพบว่าการใช้ขานอ้อยที่ปรับสภาพด้วย 16% NaOH+0.1% AQ+1% H₂O₂+0.3% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เป็นแหล่งสับสเตรทที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดคือ 7.4 U/ml

Olsson *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* Rut C-30 บนแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันโดยแหล่งคาร์บอนที่ทำการศึกษาคือ cellulose sugar beet pulp และ sugar beet pulp ที่ปรับสภาพด้วยความร้อน พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเป็น cellulose ร่วมกับ sugar beet pulp ที่ปรับสภาพในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เอนไซม์ endoglucanase สูงสุดคือ 0.49 U/ml

Szabo *et al.* (1996) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ในอาหาร α cellulose cellobiose และ cellobiose:glucose ที่พีเอช 5 ซึ่งให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 1.41 1.18 และ 2.15 mg/ml ตามลำดับ

Igarashi *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ในอาหารเหลวที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่มีการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26.5 องศาเซลเซียส ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ β -glucosidase , endoglucanase และ exoglucanase สูงสุดเป็น 750 0.008 และ 500 U/L ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการศึกษการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

4. คุณสมบัติของไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนเป็นธาตุที่เบาที่สุดและเป็นองค์ประกอบของน้ำที่เป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดของสิ่งมีชีวิตบนโลก โดยทั่วไปในชั้นบรรยากาศของโลกมีแก๊สไฮโดรเจนประมาณ 0.1 ppm. แก๊สไฮโดรเจนความแข็งแรงในการยึดโมเลกุล เท่ากับ 436 kJ/mol (104 kcal/mol) ดังนั้น เมื่อต้องการให้ไฮโดรเจนโมเลกุลทำปฏิกิริยา จึงต้องใช้พลังงานเพื่อทำลายความแข็งแรงในการยึดโมเลกุลดังกล่าว เช่น เพิ่มอุณหภูมิ ใช้สารเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ไฮโดรเจนอะตอมประกอบด้วยนิวเคลียส ภายในนิวเคลียสมีโปรตอน และนิวตรอน โดยมีอิเล็กตรอนวิ่งรอบนอก เหมือนธาตุอื่นๆ ไฮโดรเจนมี 3 ไอโซโทปขึ้นกับจำนวนโปรตอน และจำนวนนิวตรอนที่ต่างกัน ดังนี้ (มงคล, 2547)

ตารางที่ 1 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Fungal species	Substrate	FPA (IU/ml)
<i>Aspergillus ustus</i>	Wheat bran	3.80
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	Oil palm fruit fiber	0.95
<i>Neurospora crassa</i> 4335 (cell-1)	Wheat straw	1.33
<i>Penicillium capsulatum</i>	Beet pulp	2.70
<i>Talaromyces emersonii</i> UCG208	Wheat bran/beet pulp (1:1)	18.0
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Wheat straw	4.30
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Steam-treated willow	1.55
<i>Trichoderma harzianum</i> KM07	Wheat bran	11.00
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Dairy manure	1.72
<i>Trichoderma reesei</i> MCG77	Beet pulp	7.70
<i>Scytalidium thermophilum</i> 3-A	Apple pomace	0.39
<i>Scytalidium thermophilum</i> 3-A	Lentil bran	0.23
<i>Scytalidium thermophilum</i> 3-A	Bagasses	0.21

ที่มา: Haq *et al.* (2006); Kang *et al.* (2004) และ Zhiyou *et al.* (2005)

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

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

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

ไฮโดรเจนสามารถอยู่ในรูปทั้งของแข็ง ของเหลวและแก๊ส ไฮโดรเจนที่เป็นของแข็ง ไม่มีสี โครงสร้างผลึก 6 เหลี่ยม molar volume = 24.56 L/mol ไฮโดรเจนที่เป็นของเหลวไม่มีสี ค่า viscosity ต่ำ เคลื่อนที่ได้เร็วและไฮโดรเจนที่เป็นแก๊สไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ แก๊สไฮโดรเจน 1 ลิตร มีมวล 0.0898 กรัม

5. กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจน

กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนมีหลายวิธี โดยขึ้นกับความเหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับแก๊สไฮโดรเจนสามารถผลิตได้ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (มณฑล, 2547)

1) รีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ (steam reforming) เป็นกระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจน โดยการป้อนไอน้ำเข้าไปทำปฏิกิริยากับ แก๊สมีเทน ได้แก๊สไฮโดรเจน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์โดยปฏิกิริยาคูดความร้อน



2) วิธีสันดาปบางส่วน (partial oxidation)

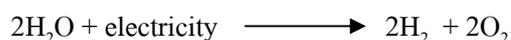


3) รีฟอร์มมิงด้วยความร้อน (auto thermal reforming) เป็นการรวมกันระหว่างปฏิกิริยาการเผาไหม้บางส่วน และปฏิกิริยารีฟอร์มมิงด้วยไอน้ำ

4) แก๊สซิฟิเคชัน/ไพโรไลซิส (gasification/pyrolysis) เป็นการให้ความร้อนแก่ชีวมวลหรือถ่านหินภายใต้สภาวะที่ควบคุม ความดัน ไอน้ำ และปริมาณออกซิเจนที่ป้อนเข้า ชีวมวล หรือถ่านหินจะถูกเปลี่ยนเป็นแก๊สผสมระหว่างไฮโดรเจน แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และสารประกอบอื่นๆ เช่น char tar และ phenols ดังปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังนี้



5) อิเล็กโทรไลซิสจากน้ำ (electrolysis of water) วิธีอิเล็กโทรไลซิส (electrolysis) จะใช้พลังงานไฟฟ้า โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังสมการ



6) วิธีทางชีวภาพ (biological treatment) เป็นการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ โดยกลุ่มจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสภาวะและชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถใช้กากของเสียที่เป็นชีวมวล (biomass) เป็นวัตถุดิบ จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการจัดการของเสียอีกทั้งเป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมและเป็น “เทคโนโลยีสีเขียว” (green technology) สำหรับอนาคต

6. การผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ ทั้งชนิดที่เป็นโฟโตโทรฟิเคยูคาริโอตและโปรคาริโอต (phototrophic eukaryote and prokaryote) และเคโมโทรฟิเคยูคาริโอตและโปรคาริโอต (chemotrophic eukaryote and prokaryote) ในที่นี้จะกล่าวถึงกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตแก๊สไฮโดรเจน 2 กลุ่มคือ กลุ่มโฟโตโทรฟ (phototrophs) และกลุ่มเคโมโทรฟ (chemotrophs) (มงคล, 2547)

6.1 กลุ่มโฟโตโทรฟ (phototrophs)

6.1.1 สาหร่าย (algae) สาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ เช่น *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Ceremium* และ *Corallina* เป็นต้น โดยการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของสาหร่ายเกิดขึ้นเมื่อมีการปรับตัวภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ระยะเวลาที่มีการปรับตัวจะเกิดการ

กระตุ้นหรือสังเคราะห์เอนไซม์ไฮโดรจีเนส (hydrogynase) โดยอิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านจาก ferredoxin เพื่อไปใช้ในการรีดิวซ์โปรตอน (H^+) ไปเป็นแก๊สไฮโดรเจน ปฏิกริยาดังกล่าวถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งระยะเวลาในการปรับตัวนั้นจะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 30 นาทีถึง 4 ชั่วโมง (มงคล, 2547)

6.1.2 oxygenic phototrophic bacteria กลุ่มนี้ได้แก่ cyanobacteria หรือแบคทีเรียสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจน เช่น *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Chlorogloea* และ *Spirulina* เป็นต้น โดย cyanobacteria เป็นจุลินทรีย์กลุ่ม oxygenic phototrophic prokaryote ที่มีระบบแสง 2 ระบบเหมือนสาหร่าย และพืชสีเขียว กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของ cyanobacteria คล้ายกับสาหร่าย แต่ส่วนใหญ่จะผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน

6.1.3 anoxygenic phototrophic bacteria แบคทีเรียกลุ่ม anoxygenic phototrophic bacteria ประกอบด้วย 3 กลุ่มคือ (1) non-sulfur purple bacteria (2) sulfur purple bacteria (3) green sulfur bacteria โดยกระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีรงควัตถุที่ต่างจาก cyanobacteria และสาหร่าย คือเป็น bacteriochlorophyll และ carotenoid กระบวนการสังเคราะห์แสงของแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ได้ใช้ออกซิเจนเป็นผลิตภัณฑ์ และสามารถใช้อารประกอบซัลไฟด์ สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบไซโอซัลเฟต สารประกอบอินทรีย์ หรือโมเลกุลไฮโดรเจนเป็นสารรับอิเล็กตรอนได้

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีแสงหรือไม่มีแสง โดยภายใต้สภาวะที่มีแสง แสงจะไปกระตุ้นแบคทีเรียโอฟีลล์ให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนเพื่อไปสร้างสารให้พลังงานสูง (ATP) และเกิดการรีดิวซ์ NAD และ ferredoxin จากการใช้ ATP และภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำให้ได้แก๊สไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ แต่ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแสงจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอินทรีย์ที่เป็นสับสเตรท

6.2 กลุ่มเคโมโทรฟ (chemotrophs)

6.2.1 แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic bacteria)

แบ่งแบคทีเรียได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่ม strictly anaerobic bacteria เช่น *Acetobacterium*, *Acetomicrobium*, *Bacteroides* และ *Clostridium* เป็นต้น
- กลุ่ม facultative anaerobic bacteria เช่น *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Escherichia* และ *Enterobacter* เป็นต้น

กระบวนการผลิตแก๊สไฮโดรเจนของแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจนในสภาวะที่ไม่ใช้แสงเป็นแบบ clostridial system โดยแก๊สไฮโดรเจนจะถูกผลิตผ่านทางเอนไซม์ H_2 :ferredoxin oxidoreductase ดังสมการ



6.2.2 แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria)

แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนบางชนิดที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในสภาพที่มีออกซิเจน ได้แก่ *Azomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Methylomonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Xanthobacter* เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการรายงานผลการศึกษาค้นคว้าการผลิตแก๊สไฮโดรเจนชีวภาพจากสับสเตรทหลากหลายชนิดด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ต่างๆซึ่งแสดงในตารางที่ 2 การปรับสภาพกลุ่มจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทนต่อสภาวะนั้นๆตายไปทำให้เกิดการปรับตัวของกลุ่มจุลินทรีย์ขึ้นสำหรับการหมักเพื่อผลิตแก๊สไฮโดรเจน โดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีจุลินทรีย์ที่ผลิตแก๊สมีเทนซึ่งใช้แก๊สไฮโดรเจนทำให้ได้ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนลดลง ดังนั้นในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนชีวภาพจึงต้องมีการกำจัดจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตแก๊สมีเทนก่อน (Wang and Wan, 2009) ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปรับสภาพด้วยกรด ค่าความร้อน หรือ สารเคมีอื่นๆ เป็นต้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	สับสเตรท	ผลผลิตไฮโดรเจน
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucose	2.0 mol/mol glucose
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucose	1.08 mol/mol glucose
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Xylose	0.73 mol/mol xylose
<i>Clostridium butyricum</i> CGS2	Starch	9.95 mmol/g COD
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	Sucrose	2.07 mol/mol hexose
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	Chitinous wastes	2.2 mol/mol substrate
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Cellulosic biomass	2.3 mol/mol glucose
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactose	3.0 mol/mol lactose
<i>Clostridium</i> sp. strain no. 2	Cellulose	0.3 mol/mol glucose
<i>Clostridium</i> sp. Fanp2	Glucose	0.2 mol/L
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Glucose	1.0 mol/mol glucose
<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC 13534	Glucose	0.05 mol/L
<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	Glycerol	0.6 mol/mol glycerol
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Starch	1.09 mol/mol starch
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005	Molasses	3.5 mol/mol sugar
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Sucrose	6 mol/mol sucrose
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Cellobiose	5.4 mol/mol cellobiose

ตารางที่ 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	สับสเตรท	ผลผลิตไฮโดรเจน
<i>Escherichia coli</i> MC13-4	Glucose	1.2 mol/mol glucose
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	2.0 mol/mol glucose
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	2.0 mol/mol glucose
<i>Pseudomonas sp. GZ1</i>	Waste sludge	0.007 mol/g TCOD
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KU001	Glucose	2.4 mol/mol glucose
<i>Thermotoga elfii</i>	Glucose	84.9 mmol/L
<i>Hydrogen-producing bacterial</i> B49	Glucose	0.1 ml/L
<i>Ruminococcus albus</i>	Glucose	2.52 mol/mol glucose
<i>Citrobacter amalonaticus</i> Y19	Glucose	8.7 mol/mol glucose
<i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3	Glucose	1.93 mol/mol glucose

ที่มา: Wang and Wan (2009)

ตารางที่ 3 การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากแหล่งจุลินทรีย์ที่ปรับสภาพในสภาวะต่างๆ

แหล่งจุลินทรีย์	การปรับสภาพเชื้อ	แหล่งสับสเตรท	ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจน
Digested sludge	Heat-shock	Glucose	1.8 mol/mol glucose
Cattle manure sludge	Acid	Glucose	1.0 mol/mol glucose
Methanogenic granules	Chloroform	Glucose	1.2 mol/mol glucose
Digested wastewater	Base	Sucrose	6.12 mol/mol sucrose
Anaerobic sludge	Sodium 2-bromoethanesulfonate	Dairy wastewater	0.0317 mmol/g COD

ที่มา: Wang and Wan (2009)

7. กลไกการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจนจากน้ำตาลกลูโคส

กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงเพื่อผลิตไฮโดรเจนโดยมีกลูโคสเป็นแหล่งอาหารแสดงดังภาพที่ 3 เมื่อกลูโคสได้รับพลังงาน ATP จะถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate จากนั้นเอนไซม์ pyruvate:Fd oxidoreductase (PFOR) จะย่อย pyruvate เพื่อสร้าง ferredoxin และ pyruvate ถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA โดย acetyl-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็น volatile fatty acid (VFAs) ซึ่งขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียและสภาวะในการหมักนั้นๆ

จากภาพที่ 3 การหมักกลูโคสด้วยจุลินทรีย์ชนิดไม่ใช้ออกซิเจนจะผลิต VFAs ขึ้นมา และได้แก๊สไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม โดยแก๊สไฮโดรเจนเกิดได้จาก ferredoxin ที่ถูกเอนไซม์ hydrogenase ย่อย การเกิดของ VFAs บางชนิดนั้นอาจใช้ NADH ในกระบวนการด้วย ดังนั้นในการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจนนั้น ชนิดของ VFAs จึงต้องมี ferredoxin เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก และในกระบวนการเกิด VFAs หากมีการใช้ NADH ไม่เกินจากที่กระบวนการหมักสร้างได้จะทำให้ได้แก๊สไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ แต่หากมี NADH ไม่เพียงพอจะทำให้ต้องดึงแก๊สไฮโดรเจนมาแทน NADH ในกระบวนการเกิด VFAs ทำให้แก๊สไฮโดรเจนที่ได้ลดลง การเกิดของ VFAs ชนิดต่างๆ มีผลต่อการเกิดแก๊สไฮโดรเจนดังนี้

1 กรดบิวทริก (butyric acid)

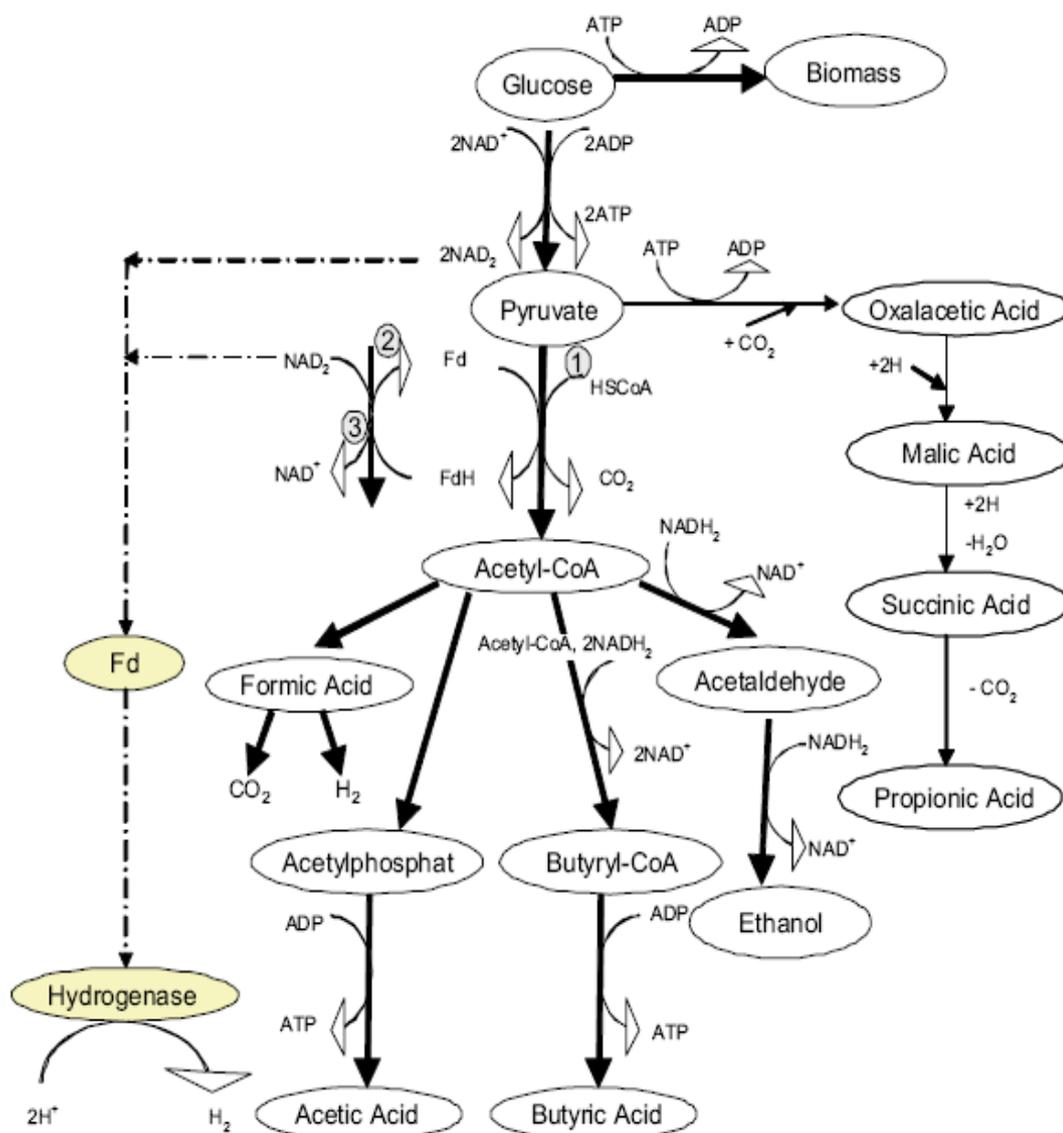
ในระหว่างการหมักกลูโคส 1 โมลในสภาวะไร้อากาศที่เกิดกรดบิวทริก 1 โมล จะให้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม 2 โมล จาก ferredoxin ที่เกิดจากการย่อยของ pyruvate ดังแสดงในสมการด้านล่าง



2 กรดอะซิติก (acetic acid)

ในการหมักกลูโคสที่เกิดอะซิติก 1 โมลจะให้ไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม 2 โมล จาก ferredoxin ที่เกิดจากการย่อยของ pyruvate และ NADH แต่การหมักโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท จะเกิดกรดอะซิติก 2 โมล ดังนั้นเมื่อหมักกลูโคส 1 โมลก็จะเกิดแก๊สไฮโดรเจนถึง 4 โมล





ภาพที่ 3 กลไกการหมักกลูโคสโดยจุลินทรีย์กลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน

หมายเหตุ 1 คือ Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase (PFOR)

2 คือ Hydrogenase

3 คือ NADH: ferredoxin oxidoreductase

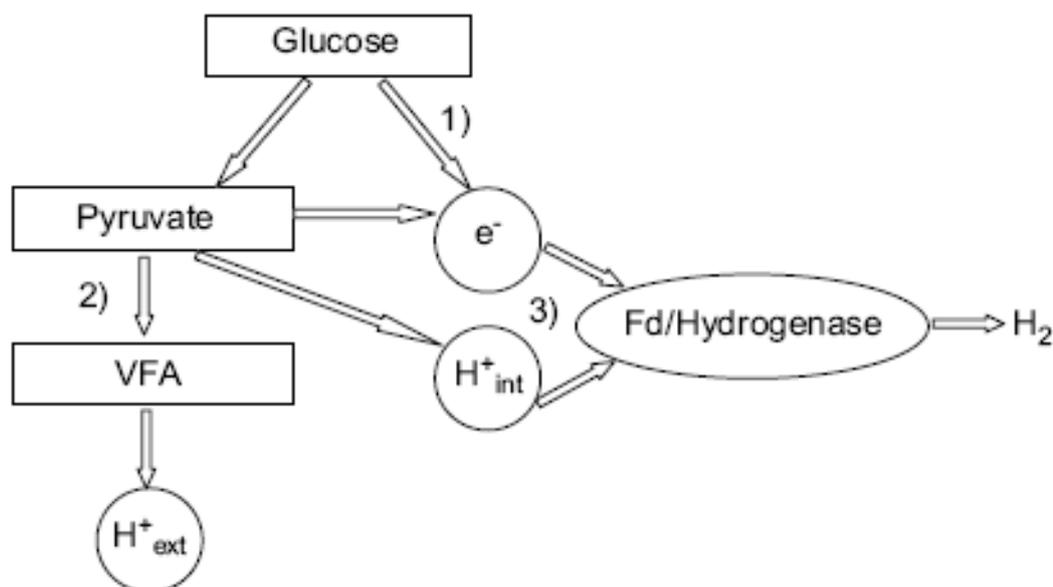
ที่มา: Ruggeri *et al.*(2009)

3 กรดโพรไพโอนิก (propionic acid)

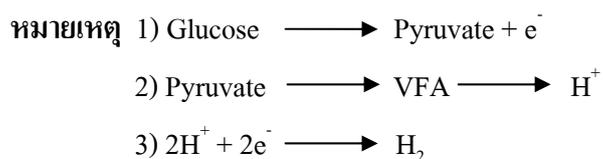
ในการหมักที่เกิดกรดโพรไพโอนิก 1 โมล ใช้ไฮโดรเจนเป็นสารตั้งต้นในการผลิต 1 โมล เนื่องจากการหมักที่เกิดกรดโพรไพโอนิก 2 โมลใช้ NADH 4 โมล ขณะที่กระบวนการหมักกรดโพรไพโอนิกผลิต NADH ได้ 2 โมล ดังนั้นต้องมีการนำไฮโดรเจนจากส่วนอื่นมาใช้ในการหมักเพื่อผลิตกรดโพรไพโอนิก ดังแสดงในสมการด้านล่าง



จากภาพที่ 3 สามารถสรุปกลไกการเกิดแก๊สไฮโดรเจนด้วยจุลินทรีย์กลุ่มไม่ต้องการออกซิเจนจากกลูโคสโดยย่อได้ตามภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กลไกการหมักกลูโคสเพื่อผลิตไฮโดรเจนโดยย่อ



ที่มา: Ruggeri *et al.*(2009)

ดังนั้นในกระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจน หากเป็นกระบวนการหมักโดยผ่านกระบวนการการเกิดกรดบิวทริก และกรดอะซิติก จะทำให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูง และกระบวนการหมักโดยผ่านกระบวนการการเกิดกรดโพรไพโอนิกที่เกิดขึ้นทำให้ผลผลิตไฮโดรเจนลดลง

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

8.1 อุณหภูมิ

การย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ 2 ช่วง คือ อุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ทำงานในช่วงนี้เรียกว่า mesophilic bacteria และอุณหภูมิระหว่าง 50-60 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ทำงานในช่วงนี้เรียกว่า thermophilic bacteria แต่การหมักอุณหภูมิที่สูงมีข้อเสียคือ thermophilic bacteria ทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ไม่ดีเท่า mesophilic bacteria (มงคล, 2547)

8.2 พีเอช (pH)

ช่วงของพีเอชที่ต่างกันจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกัน โดยช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตไฮโดรเจนคือ ระหว่าง 4.5-6.5 นอกจากนี้พีเอชยังส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์และกิจกรรมต่างๆของจุลินทรีย์ ดังนั้นพีเอชที่แตกต่างกันจะให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันไปด้วย (ดวงพร, 2545)

8.3 กรดไขมันระเหย (volatile fatty acid; VFAs)

VFAs แต่ละชนิดที่เกิดจากการหมักจะส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยการผลิตที่เกิดกรดบิวทริก และกรดอะซิติก ส่งผลให้เกิดไฮโดรเจนในระบบ แต่การผลิตกรดโพรไพโอนิก ทำให้ไฮโดรเจนในระบบลดลง นอกจากนี้การที่มี VFAs สะสมอยู่มากจะทำให้สภาวะในการหมักเป็นกรดที่ทำให้กิจกรรมและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เปลี่ยนไปตามสภาวะของพีเอชในขณะนั้น จึงทำให้การเกิดแก๊สไฮโดรเจนเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Ruggeri *et al.*, 2009)

8.4 สารอาหาร

สารอาหารแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือสารอาหารหลัก เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส เป็นต้น และสารอาหารรอง เช่นแคลเซียม แมกนีเซียม และสังกะสี เป็นต้น ปริมาณ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์น้อยที่สุดในระบบไร้อากาศคือ อัตราส่วน BOD:N:P เป็น 100:1.1:2 (Lin and Lay, 2004) โดยใช้คาร์บอนเป็นตัว สังกะสีพลังงาน ไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีน และฟอสฟอรัสในการสังเคราะห์กรด นิวคลีอิก

8.5 ระยะเวลาในการกักเก็บในระบบ (HRT)

ระยะเวลาในการกักเก็บในระบบเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมประสิทธิภาพของระบบ การย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน อัตราการย่อยสลายจะเพิ่มมากขึ้นตาม ระยะเวลาการกักเก็บส่งผลให้มีปริมาณแก๊สไฮโดรเจนที่เพิ่มมากขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง แล้วเกิดการลดลง ทั้งนี้เกิดจากจุลินทรีย์กลุ่มผลิตแก๊สมีเทน (methanogen) ที่ใช้ไฮโดรเจนเกิดการเจริญขึ้นทำให้ ปริมาณไฮโดรเจนลดลง (มงคล, 2547)

Fang and Liu (2002) ศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยเชื้อผสมที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยความร้อนแล้ว โดยใช้กลูโคส 7000 mg/L เป็นแหล่งอาหารที่พีเอชเริ่มต้นต่างกันพบว่าที่พีเอช 5.5 ให้ปริมาณผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 2.1 ± 0.1 mol/mol glucose

Fang *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทด้วยเชื้อ *Clostridium butyricum* และ *Rhodobacter sphaeroides* ที่พีเอช 7.8 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดย เมื่อใช้เชื้อ 2 ชนิดผสมกันจะทำให้ได้ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนเป็น 0.6 ml/ml glucose

Wang *et al.* (2008) ศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* X9 และ *Ethanoigenens harbinense* B49 ในอาหาร microcrystalline cellulose ที่พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ปริมาณแก๊สไฮโดรเจน 127 มิลลิลิตร โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว เพียงชั่วโมงที่ 2 แต่ยังสามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้อย่างต่อเนื่อง

Kaparaju *et al.* (2009) ศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยใช้ฟางข้าวสาลีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งสับสเตรท โดยทำการทดลองในรีแอกเตอร์แบบต่อเนื่องขนาด 700 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการกักเก็บในระบบ 72 ชั่วโมง ให้ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจน 178 ml H₂/g glucose

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปกโตรโฟมิเตอร์ ยี่ห้อรุ่น GBC 932
- 1.2 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดงานเดียว
- 1.4 ตู้อบ (oven)
- 1.5 เครื่อง autoclave
- 1.6 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ
- 1.7 เครื่อง gas chromatography (Shimadzu GC 2014)
- 1.8 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 1.9 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.10 ขวดหมัก ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 1.11 บีเปตต์ ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 1.12 บีกเกอร์ ขนาด 50 100 250 600 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 1.13 กระจกบอควง
- 1.14 หลอดทดลอง
- 1.15 เข็มฉีดยา (syringe)
- 1.16 เครื่องเขย่า

2. สารเคมี

- 2.1 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 2.3 ยูเรีย $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$
- 2.4 NH_4CO_3
- 2.5 NH_4Cl
- 2.6 กรดซิตริก $(\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COOH})_3$

- 2.7 ไตรโซเดียมซิทเรต ($C_6H_5O_7Na_3$)
- 2.8 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)
- 2.9 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
- 2.10 โซเดียมไบซัลไฟต์ ($NaHSO_3$)
- 2.11 3,5-dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)
- 2.12 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตต ($COOK(CHOH)_2COONa$)
- 2.13 ฟีนอล (C_6H_6O)

3. วัสดุอื่นๆ

- 3.1 กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ
- 3.2 ฟางข้าว
- 3.3 ชานอ้อย
- 3.4 รำข้าว
- 3.5 กระดาษสำนักงาน

วิธีการ

การศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานกระดาษรีไซเคิลแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยขั้นตอนที่ 1 เป็นการศึกษาคุณสมบัติของสับสเตรท (กากตะกอน, ฟางข้าว, ชานอ้อย และรำข้าว) และสภาวะสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR) และเชื้อ *Phanerochaete sp.* (PC) ขั้นตอนที่ 2 เป็นการศึกษาสภาวะในการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้ และการปรับสภาพ (ความร้อน สารเคมี และสารเคมีร่วมกับความร้อน) กากตะกอนก่อนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ และขั้นตอนที่ 3 ศึกษาสภาวะในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอน



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานกระดาษรีไซเคิล

1. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR) และเชื้อ *Phanerochaete sp.*(PC)

1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของกากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ ฟาง ข้าว รำข้าวและชานอ้อย

หาปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจนรวม ความชื้น เซลลูโลส ลิกนิน ใย และเซลลูโลสของกากตะกอน ฟางข้าว รำและชานอ้อย

1.2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสด้วยจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* และ *Phanerochaete sp.*

1.2.1 ศึกษาชนิดของแหล่งสับสเตรทที่เหมาะสม

ศึกษาชนิดของแหล่งอาหาร โดยใช้ฟางข้าว ชานอ้อย และกากตะกอนเป็นสับสเตรท และใช้รำข้าวเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) เป็น 25 โดยใช้สัดส่วนสับสเตรท 3 สภาวะ ซึ่งเตรียมแหล่งสับสเตรทในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ดังนี้

- 1) ฟางข้าว 1 กรัม ผสมรำข้าว 4 กรัม
- 2) ชานอ้อย 1 กรัม ผสมรำข้าว 4 กรัม
- 3) กากตะกอน 2.5 กรัม ผสมรำข้าว 2.5 กรัม

นำอาหารมาปรับความชื้นเป็น 70% ด้วยสารละลายที่มี 2.7 กรัมต่อลิตร โซเดียมอะซิเตต, 2.0 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 , 0.5 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 0.1 กรัมต่อลิตร CaCl_2 และปรับเป็นพีเอช 5 นำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 บาร์ 20 นาที หลังจากthat สับสเตรทเย็น เติมเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR) และเชื้อ *Phanerochaete sp.*(PC) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างมาสกัดเอนไซม์เซลลูเลสทุก 3 วัน ในระยะเวลาการศึกษา 12 วันโดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นด้วยวิธีของ Ghose (1987)

1.2.2 ศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสม

เติมฟางข้าว 1 กรัม ผสมรำข้าว 4 กรัม และกากตะกอน 2.5 กรัม ผสมรำข้าว 2.5 กรัม ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับความชื้นเป็น 70% ด้วยสารละลายที่มี 2.7 กรัมต่อลิตร โซเดียมอะซิเตต, 2.0 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 , 0.5 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 0.1 กรัมต่อลิตร CaCl_2 และปรับเป็นพีเอช 5 นำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 บาร์ 20 นาที หลังจากที่สับสเตรทเย็น เติมเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR) และเชื้อ *Phanerochaete sp.*(PC) ป่มที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างมาสกัดเอนไซม์เซลลูเลสทุก 3 วันในระยะเวลาการศึกษา 12 วัน โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นด้วยวิธีของ Ghose (1987)

1.2.3 ศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม

นำฟางข้าว 1 กรัม ผสมรำข้าว 4 กรัมปรับความชื้นเป็น 65 75 และ 85% ด้วยสารละลาย (2.7 กรัมต่อลิตร โซเดียมอะซิเตต, 2.0 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 , 0.5 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 0.1 กรัมต่อลิตร CaCl_2) ที่พีเอช 6 ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 บาร์ 20 นาที หลังจากที่สับสเตรทเย็น เติมเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR) และนำกากตะกอน 2.5 กรัม ผสมรำข้าว 2.5 กรัม ปรับความชื้นเป็น 60 70 และ 80% ด้วยสารละลายที่มี 2.7 กรัมต่อลิตร โซเดียมอะซิเตต, 2.0 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 , 0.5 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 0.1 กรัมต่อลิตร CaCl_2 และปรับเป็นพีเอช 5 นำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 บาร์ 20 นาที หลังจากที่สับสเตรทเย็น เติมเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR) และเชื้อ *Phanerochaete sp.*(PC) ป่มที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างมาสกัดเอนไซม์เซลลูเลสทุก 3 วันในระยะเวลาการศึกษา 15 วัน โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นด้วยวิธีของ Ghose (1987)

1.2.4 การสกัดเอนไซม์

เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 7 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดตัวอย่าง นำไปเขย่าด้วยอัตรา 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง นำไปกรองแล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ (เอนไซม์ดิบ, crude enzyme) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

1.2.5 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี Filter Paper Analysis (FPA) โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีหน่วยเป็น FPU โดย 1 FPU จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที โดยวิธีการวิเคราะห์ดำเนินการดังนี้ เติมสารละลายเอนไซม์ดิบ 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายซิริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1 ปริมาณ 50 มิลลิกรัม แช่หลอดทดลองในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ (Ghose, 1987)

1.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) โดยใส่สารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย DNS ความเข้มข้น 1% ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต้มสารละลายในหลอดทดลองในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น GBC 932 ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Ghose, 1987)

2. ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

2.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิ และการเขย่าในไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เติมกากตะกอน 2 กรัม และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสดิบ 5 FPU จาก *Trichoderma reesei* (เอนไซม์เซลลูเลส; TR-Cs) และ *Phanerochaete sp* (เอนไซม์เซลลูเลส; PC-Cs) ใน 0.05 โมล สารละลายซิริกบัฟเฟอร์ที่พีเอชเป็น 4.8 ปริมาตรรวม 40 มิลลิลิตร บ่มที่

- 1) อุณหภูมิห้อง 27 องศาเซลเซียส โดยไม่เขย่า
- 2) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่เขย่า

3) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยไม่เขย่า

4) อุณหภูมิห้อง 27 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที

เก็บสารละลายตัวอย่างในชั่วโมงที่ 6 12 และ 24 เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2.2 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการย่อย

เติมกากตะกอน 2 กรัม และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสดิบ 5 FPU จาก *Trichoderma reesei* (TR-Cs) และ *Phanerochaete sp* (PC-Cs) ในสารละลายซิทริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมล ที่พีเอชเป็น 3.8 4.8 และ 5.8 ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายตัวอย่างในชั่วโมงที่ 6 12 และ 24 เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2.3 การปรับสภาพกากตะกอนก่อนการย่อยด้วยความร้อน

เติมกากตะกอน 2 กรัม และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 27 (ชุดควบคุม), 100 และ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสดิบ 5 FPU จาก *Trichoderma reesei* (TR-Cs) และ *Phanerochaete sp* (PC-Cs) ในสารละลายซิทริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายตัวอย่างในชั่วโมงที่ 6 12 และ 24 เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2.4 การปรับสภาพกากตะกอนก่อนการย่อยด้วยกรดและด่าง

เติมกากตะกอน 2 กรัมและสารละลาย NaOH หรือ HCl ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3% 10 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง และนำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสดิบ 5 FPU จาก *Trichoderma reesei* (TR-Cs) และ *Phanerochaete sp* (PC-Cs) ในสารละลายซิทริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายตัวอย่างในชั่วโมงที่ 6 12 และ 24 เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2.5 การปรับสภาพกากตะกอนก่อนการย่อยด้วยต่างร่วมกับความร้อน

เติมกากตะกอน 2 กรัมและสารละลาย 3% NaOH 10 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 27 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำล้างด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง และนำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์โดยใช้ 5 FPU ของเอนไซม์เซลลูเลสดีบีจาก *Trichoderma reesei* (TR-Cs) และ *Phanerochaete sp* (PC-Cs) ในสารละลายซัฟฟิเออร์เข้มข้น 0.05 โมล พีเอช 4.8 ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายตัวอย่างในชั่วโมงที่ 6 12 และ 24 เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สไฮโดรเจน

3.1 ปริมาณสัดส่วนของแข็ง และการใช้กระดาษร่วม

เตรียมกากตะกอนและกระดาษที่ปรับสภาพด้วย 3% NaOH ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสด้วยสัดส่วนของแข็งในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร (ปริมาตรสารละลาย 70 มิลลิลิตร) ดังนี้

- 1) สัดส่วนของกากตะกอน 3% และ 4% (มวลต่อปริมาตร)
- 2) สัดส่วนผสมระหว่างกากตะกอนต่อกระดาษที่ 2.5:0.5, 2.0:1.0, 3.5:0.5, 3.0:1.0 และ 2.5:1.5 % (มวลต่อปริมาตร)

นำกากตะกอนและกระดาษที่เตรียมมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก TR 5 FPU ที่พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วมาใส่ขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของกากตะกอนและกระดาษโดยใช้ yeast extract เป็น 20 และปรับพีเอชให้มีค่าเป็น 5 เดิมเชื้อจุลินทรีย์ (กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1 ชั่วโมง) 1% โดยปริมาตร นำไปปรับเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอน 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเก็บตัวอย่างแก๊สชีวภาพ และตัวอย่างน้ำทุก 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพตามหัวข้อ 3.6 กรดไขมันระเหยตามหัวข้อ 3.7 พีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย

3.2 ศึกษาค่าพีเอช

เตรียมกากตะกอนและกระดาษในสัดส่วน 3.5 และ 0.5% (มวลต่อปริมาตร) ตามลำดับ ที่ผ่านการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ในปริมาตร 70 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารละลายผสมโดยใช้ yeast extract เป็น 20 และปรับพีเอชให้มีค่าเป็น 4, 5 และ 6 เดิมเชื้อจุลินทรีย์ (กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1 ชั่วโมง) 1% โดยปริมาตร นำไปปรับเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอน 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเก็บตัวอย่างแก๊สชีวภาพ และตัวอย่างน้ำทุก 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพตามหัวข้อ 3.6 กรดไขมันระเหยตามหัวข้อ 3.7 พีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย

3.3 ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

เตรียมกากตะกอนและกระดาษที่ปรับสภาพและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในสัดส่วน 3.5 และ 0.5% ตามลำดับ ในปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของสารละลายผสมโดยใช้ yeast extract เป็น 10 20 และ 40 และปรับพีเอชให้มีค่าเป็น 5 เดิมเชื้อจุลินทรีย์ (กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1 ชั่วโมง) 1% โดยปริมาตร นำไปปรับเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอน 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเก็บตัวอย่างแก๊สชีวภาพ และตัวอย่างน้ำทุก 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพตามหัวข้อ 3.6 กรดไขมันระเหยตามหัวข้อ 3.7 พีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย

3.4 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน

เตรียมกากตะกอนและกระดาษที่ปรับสภาพและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้วในสัดส่วน 3.5 และ 0.5% ตามลำดับ ในสารละลายผสม 70 มิลลิลิตร ปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 40 ด้วยแหล่งไนโตรเจนจาก yeast extract NH_4Cl NH_4CO_3 และ urea ปรับเป็นพีเอช 6 เดิมเชื้อจุลินทรีย์ (กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1 ชั่วโมง) 1% โดยปริมาตร นำไปปรับเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอน 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเก็บตัวอย่างแก๊สชีวภาพ และตัวอย่างน้ำทุก 24

ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพตามหัวข้อ 3.6 กรดไขมันระเหยตามหัวข้อ 3.7 ฟีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย

3.5 ศึกษาการปรับสภาพกากตะกอน การใช้เอนไซม์เซลลูเลสและการใช้กระดาษร่วม

3.5.1 เตรียมกากตะกอนที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (control) ที่สัดส่วนของแข็ง 4% โดยปริมาตร (70 มิลลิลิตร) ปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของส่วนผสมโดยใช้ yeast extract เป็น 40 ที่พีเอช 6 เติมเชื้อจุลินทรีย์ (กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1 ชั่วโมง) 1% โดยปริมาตร นำไปปรับเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอน 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเก็บตัวอย่างแก๊สชีวภาพ และตัวอย่างน้ำทุก 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพตามหัวข้อ 3.6 กรดไขมันระเหยตามหัวข้อ 3.7 ฟีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย

3.5.2 เตรียมกากตะกอนที่การปรับสภาพด้วยค่าร่วมกับความร้อน (pre) ที่สัดส่วนของแข็ง 4% โดยปริมาตร (70 มิลลิลิตร) ปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของส่วนผสมโดยใช้ yeast extract เป็น 40 ที่พีเอช 6 ใน 70 มิลลิลิตร เติมเชื้อจุลินทรีย์ (กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1 ชั่วโมง) 1% โดยปริมาตร นำไปปรับเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอน 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเก็บตัวอย่างแก๊สชีวภาพ และตัวอย่างน้ำทุก 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพตามหัวข้อ 3.6 กรดไขมันระเหยตามหัวข้อ 3.7 ฟีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย

3.5.3 เตรียมกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยค่าร่วมกับความร้อนที่สัดส่วนของแข็ง 4% โดยปริมาตร (70 มิลลิลิตร) และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 5 FPU ที่พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (pre+enz) ปรับค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของส่วนผสมโดยใช้ yeast extract เป็น 40 ที่พีเอช 6 เติมเชื้อจุลินทรีย์ (กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1 ชั่วโมง) 1% โดยปริมาตร นำไปปรับเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยแก๊สอาร์กอน 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเก็บตัวอย่างแก๊สชีวภาพ และตัวอย่างน้ำทุก 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพตามหัวข้อ 3.6 กรดไขมันระเหยตามหัวข้อ 3.7 ฟีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย

3.5.4 เตรียมกากตะกอนและกระดาษที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่างร่วมกับความร้อนที่สัดส่วนของแข็ง 3.5% และ 0.5% โดยปริมาตร (70 มิลลิลิตร) ตามลำดับ และไฮโดรไลซิสด้วย เอนไซม์เซลลูเลส 5 FPU ที่พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (pre+enz+p) ปรับค่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของส่วนผสมโดยใช้ yeast extract เป็น 40 ที่พีเอช 6 ใน 70 มิลลิลิตร เติมเชื้อจุลินทรีย์ (กากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1 ชั่วโมง) 1% โดยปริมาตร นำไปปรับเป็นสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยแก๊ส อาร์กอน 5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วเก็บตัวอย่างแก๊สชีวภาพ และตัวอย่างน้ำทุก 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพตามหัวข้อ 3.6 กรดไขมันระเหยตามหัวข้อ 3.7 พีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลาย

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณแก๊สไฮโดรเจน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของแก๊สไฮโดรเจนในแก๊สชีวภาพ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น Shimadzu GC 2014 ใช้หัววัดชนิด thermal conductivity detector (TCD) คอลัมน์ molecular sieve 5A และ porapak Q เป็น packing material และใช้แก๊สอาร์กอนเป็นแก๊สพาซึ่งใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ injection port และ detector เท่ากับ 60 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และอัตราการไหลของ carrier gas 40 มิลลิลิตร/นาที

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันระเหย (volatile fatty acid, VFAs)

เก็บตัวอย่างของเหลวจากการหมักนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกเอาส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์ VFAs โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี Shimadzu GC 2014 ที่มีหัววัดแบบ flame ionization detector (FID) คอลัมน์ FFAP + H₃PO₄ (0.3+0.3%) Graphite C และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพาซึ่งใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ injection port และ detector เท่ากับ 220 60 และ 260 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และอัตราการไหลของแก๊สพาเป็น 40 มิลลิลิตร/นาที

4. ระยะเวลาในการทำวิจัย

เริ่มตั้งแต่ เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2551 – เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552

5. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์

1. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* และ *Phanerochaete sp.*

1.1 องค์ประกอบของกากตะกอน ฟางข้าว รำข้าว และชานอ้อย

กากตะกอนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นกากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิล เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น เถ้า คาร์บอน ไนโตรเจน ลิกนิน ไฮโดรเซลลูโลส และอัลฟาเซลลูโลส ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4 และ 5 จากผลการศึกษากากตะกอนที่ใช้ในการศึกษานี้มีปริมาณเถ้าสูงและปริมาณคาร์บอนน้อยซึ่งหากมีการนำมาใช้ในการเป็นแหล่งสับสเตรท ควรมีการเพิ่มปริมาณคาร์บอนเพื่อให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนมากขึ้น นอกจากนี้กากตะกอนยังมีปริมาณลิกนินสูงจึงควรมีการลดปริมาณลิกนินเพื่อช่วยในกระบวนการย่อยกากตะกอนให้ดียิ่งขึ้น (Zhao *et al.*, 2009) ฟางข้าวและชานอ้อยมีปริมาณคาร์บอนและเซลลูโลสสูงจึงสามารถนำมาเป็นแหล่งสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ นอกจากนี้รำข้าวมีสัดส่วนไนโตรเจนถึง 1.6% โดยน้ำหนักแห้งซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนได้อีกด้วย

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ ฟางข้าว ชานอ้อย และรำข้าว

	คุณสมบัติ			
	ความชื้น (%)	เถ้า (%)	คาร์บอน (%)	ไนโตรเจน (%)
กากตะกอน	47.53 ± 0.56	65.39 ± 0.42	19.23 ± 0.24	0.63 ± 0.01
ฟางข้าว	7.06 ± 0.36	11.61 ± 0.14	49.10 ± 0.08	0.95 ± 0.01
อ้อย	7.72 ± 0.41	0.94 ± 0.22	55.03 ± 0.12	0.61 ± 0.01
รำข้าว	9.23 ± 0.16	10.85 ± 0.20	49.52 ± 0.11	1.61 ± 0.02
กระดาษ	2.86 ± 0.12	20.08 ± 0.78	44.40 ± 0.43	*

หมายเหตุ * คือ ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ตารางที่ 5 ปริมาณสัดส่วนเซลลูโลสของกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษ ฟางข้าว และชานอ้อย

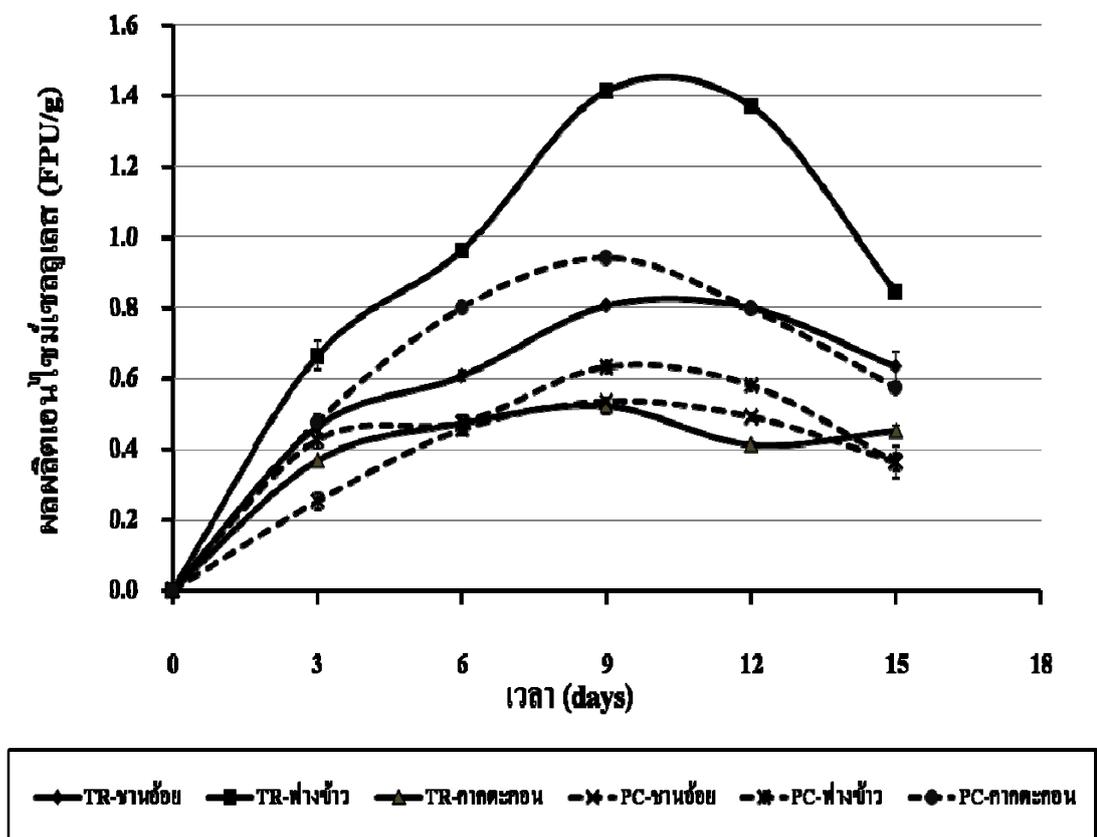
	คุณสมบัติ		
	ลิกนิน (%)	โฮโล-เซลลูโลส (%)	อัลฟา-เซลลูโลส (%)
กากตะกอน	37.65±0.16	16.06±0.62	11.60±0.03
ฟางข้าว	24.03±0.01	51.65±0.02	43.73±0.11
ชานอ้อย	14.81±0.06	63.89±2.46	48.42±0.11

1.2 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* และ *Phanerochaete sp.*

1.2.1 ผลของแหล่งสับสเตรท

เชื้อ *Trichoderma reesei* ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีฟางข้าวผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าอาหารที่มีชานอ้อยและกากตะกอน โดยเชื้อ *Trichoderma reesei* ที่เลี้ยงบนฟางข้าวให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในวันที่ 9 ของการทดลองคือ 1.41 ± 0.01 FPU/g และผลผลิตเอนไซม์ลดลงเมื่อระยะเวลาของการทดลองมากขึ้นเนื่องจากความชื้นในอาหารลดลงทำให้กิจกรรมต่างๆของจุลินทรีย์น้อยลง (Panagiotou *et al*, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 6 สำหรับเชื้อ *Phanerochaete sp.* ให้ปริมาณผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเมื่อใช้กากตะกอนเป็นสับสเตรท รองลงมาเป็นอาหารที่ประกอบด้วยฟางข้าวและชานอ้อย ตามลำดับโดยเชื้อ *Phanerochaete sp.* ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สูงสุด 0.94 ± 0.01 FPU/g บนอาหารที่มีกากตะกอนเป็นแหล่งสับสเตรทในวันที่ 9 ของการทดลองและให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเชื้อ *Trichoderma reesei* นอกจากนี้เอนไซม์จากเชื้อ *Trichoderma reesei* ยังให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงกว่าเชื้อ *Phanerochaete sp.* เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายประเภทและแหล่งสับสเตรท แต่ต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมเพื่อที่จะให้ได้ปริมาณผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มากที่สุด (Bhat, 2000)

Olsson *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* Rut C-30 บนแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันคือ cellulose sugar beet pulp และ sugar beet pulp ที่ปรับสภาพ พบว่าการใช้ cellulose ร่วมกับ sugar beet pulp ที่ปรับสภาพในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เอนไซม์ endoglucanase สูงสุด การใช้แหล่งสับสเตรทที่แตกต่างกัน คุณสมบัติของสับสเตรทก็ต่างกันด้วยเช่นเดียวกับการศึกษาของ Kansoh *et al.* (1999) ศึกษาการปรับสภาพสับสเตรทด้วยสารเคมีและความร้อน ก่อนนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเชื้อ *Trichoderma reesei* โดยพบว่า สับสเตรทชนิดเดียวกันแต่มีการปรับสภาพจะทำให้คุณสมบัติของสับสเตรทเปลี่ยนไป ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้แตกต่างกัน

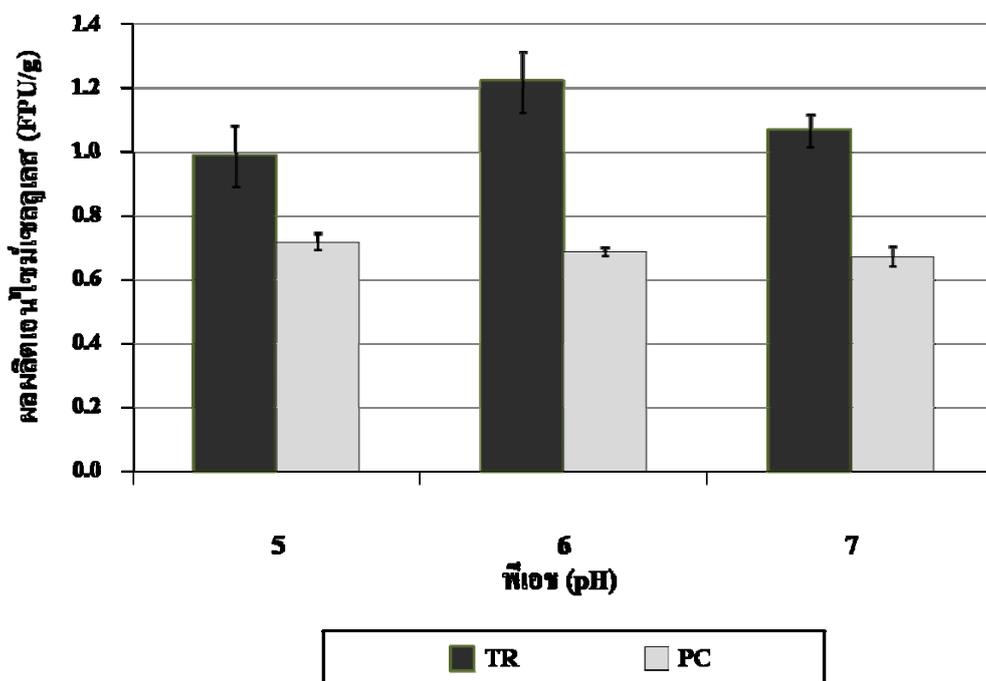


ภาพที่ 6 ผลของแหล่งสับสเตรทต่อผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Trichoderma reesei* และเชื้อ *Phanerochaete sp.* ในระยะเวลาต่างๆ

จากการศึกษานี้การเพาะเลี้ยง *Trichoderma reesei* บนฟางข้าวร่วมกับรำข้าว และการเพาะเลี้ยง เชื้อ *Phanerochaete sp.* บนกากตะกอนร่วมกับรำข้าว ให้ผลผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสสูงสุดซึ่งจะใช้เป็นแหล่งสับสเตรทในการศึกษาต่อไป

1.2.2 ผลของพีเอชเริ่มต้น

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่างกัน เนื่องจากพีเอชจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตมาช่วยแหล่งสับสเตรทเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต หากมีพีเอชที่ไม่เหมาะสมประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีอาหารในการดำรงชีพไม่เพียงพอ นอกจากนี้หากพีเอชสูงหรือต่ำมากเกินไปจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายได้ (เขาวพา, 2540) สำหรับการศึกษานี้เชื้อ *Trichoderma reesei* ผลิตกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด (1.22 ± 0.10 FPU/g) ในสารละลายที่พีเอช 6 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kansoh *et al.* (1999) ที่ได้ทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei*. โดยใช้ cellulose powder เป็นแหล่งสับสเตรท ที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอนไซม์



ภาพที่ 7 ผลของพีเอชเริ่มต้นผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Trichoderma reesei* และเชื้อ *Phanerochaete sp.* ในระยะเวลาต่างๆ

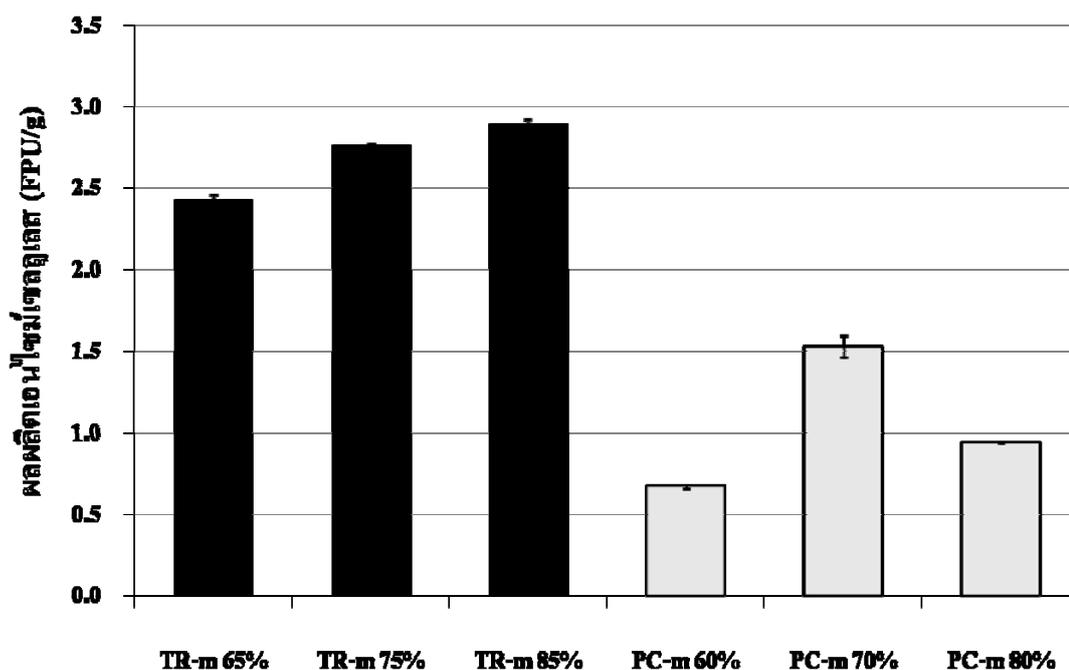
เซลลูเลส สูงสุดคือ 8.9 U/ml สำหรับเชื้อ *Phanerochaete sp.* ผลิตภัณฑ์เอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด (0.72 ± 0.03 FPU/g) ในสารละลายที่พีเอช 5 สอดคล้องกับการศึกษาของ Szabo *et al.* (1996) ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ในอาหาร α cellulose cellobiose และ cellobiose: glucose ที่พีเอช 5 ซึ่งให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด นอกจากนี้จากภาพที่ 7 เห็นได้ว่าเป็นการรบกวนในสารละลายมีผลต่อเชื้อ *Trichoderma reesei* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในขณะที่ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายมีผลเพียงเล็กน้อยต่อเชื้อ *Phanerochaete sp.* ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส อาจเป็นเพราะว่าเชื้อ *Phanerochaete sp.* มีช่วงพีเอชในการเจริญเติบโต และผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่กว้างกว่าเชื้อ *Trichoderma reesei*

จากการศึกษานี้ทำให้ได้ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* และ *Phanerochaete sp.* คือ พีเอช 5 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งจะนำไปใช้เป็นค่าพีเอชสำหรับการศึกษาต่อไป

1.2.3 ผลของความชื้นเริ่มต้น

ความชื้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เนื่องจากการย่อยสลายสเตรท จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสเตรทในรูปของสารละลายดังนั้นความชื้นในแหล่งอาหารจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ ดังนั้นความชื้นของสเตรทที่เหมาะสมจะทำให้สารละลายเอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์จึงเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้ความชื้นยังมีผลต่อปริมาณอากาศในช่องว่างของสเตรท หากมีความชื้นมากเกินไปก็จะทำให้อากาศในช่องว่างมีน้อยจึงอาจเกิดสภาวะไร้อากาศทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ภาพที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Trichoderma reesei* เจริญได้ดีบนแหล่งสเตรทที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้นทำให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยความชื้นเริ่มต้น 85% (TR-m 85%) ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดคือ 2.90 ± 0.02 FPU/g สำหรับเชื้อ *Phanerochaete sp.* เจริญได้ดีบนแหล่งสเตรทที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 70% (PC-m 70%) ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดคือ 1.53 ± 0.07 FPU/g และเมื่อปรับความชื้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้นมากกว่า 70% ทำให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลดลงเนื่องมาจากในกากตะกอนยังมีโพลีเมอร์และสารเติมแต่ง (filler) จากการผลิตกระดาษ และระบบบำบัดน้ำเสียทำให้ขนาดของช่องว่างในสเตรทมีขนาดเล็ก เมื่อความชื้นเพิ่มขึ้นจะทำให้ช่องว่างเต็มไปด้วยน้ำจึงเกิดสภาวะไร้ออกซิเจนซึ่งเชื้อ *Phanerochaete sp.* เป็นเชื้อราที่ต้องการใช้ออกซิเจนทำให้เชื้อ *Phanerochaete sp.* เจริญเติบโตได้เพียงแต่ผิวหน้าของสเตรทเท่านั้น ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจึงลดลง ส่วนเชื้อ *Trichoderma*

reesei ที่เติบโตบนอาหารที่มีฟางข้าวและรำข้าวเป็นแหล่งสับสเตรท สามารถใช้ความชื้นเริ่มต้นได้ถึง 85% เนื่องจากฟางข้าวและรำข้าวซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าช่องว่างในสับสเตรทจึงมีขนาดใหญ่จึงไม่ทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนในช่องว่างของสับสเตรท เชื้อ *Trichoderma reesei* จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า



ภาพที่ 8 ผลของความชื้นเริ่มต้นผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Trichoderma reesei* และเชื้อ *Phanerochaete sp.* ในระยะเวลาต่างๆ

จากตารางที่ 6 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma sp.* และ *Phanerochaete sp.* สามารถผลิตได้จากหลากหลายสับสเตรทเช่น ฟางข้าว เซลลูโลสทางการค้า ชานอ้อย หรือรำข้าว เป็นต้น ซึ่งจะให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากการศึกษานี้กับการศึกษาอื่นๆ ในตารางที่ 6 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีปริมาณใกล้เคียงหรือน้อยกว่าไม่มาก ซึ่งสามารถนำมาใช้งานได้

ตารางที่ 6 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma sp.* และ *Phanerochaete sp.*

จุลินทรีย์	แหล่งสับสเตรท	เซลลูเลส (FPU/ml)	อ้างอิง
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	Acid-swollen cellulose	0.54	Gadgil <i>et al.</i> (1995)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Cellulose	4.65	Velkovska <i>et al.</i> (1997)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Cellulose	2.10	Domingues <i>et al.</i> (2000)
<i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30	Cellulose: sugar beet	0.49	Olsson <i>et al.</i> (2003)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cellulose	0.75	Igarashi <i>et al.</i> (1997)
<i>Phanerochaete sp.</i>	Paper sludge: rice bran	0.68	การศึกษานี้
<i>Trichoderma reesei</i>	Rice straw: rice bran	0.46	การศึกษานี้

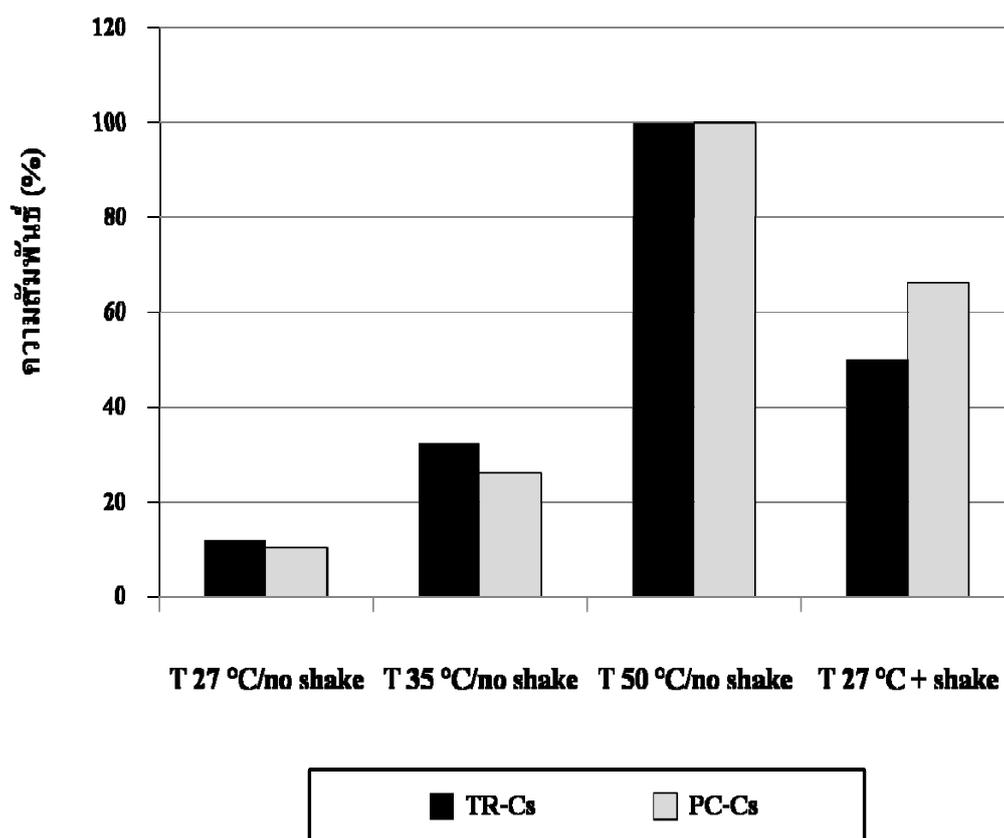
จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงสภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Trichoderma reesei* คือ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนสับสเตรทฟางข้าว 1 ส่วน ต่อรำข้าว 4 ส่วน ที่พีเอช 6 ความชื้น 85% ในขณะที่สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Phanerochaete sp.* คือ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนสับสเตรทกากตะกอน 1 ส่วนต่อรำข้าว 1 ส่วน ที่พีเอช 5 ความชื้น 70 % ซึ่งจะใช้เป็นสภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

2.1 ผลของอุณหภูมิ และการเขย่าในไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากภาพที่ 9 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงขึ้นจะให้ปริมาณน้ำตาลที่สูงขึ้นด้วย โดยเมื่อปรับอุณหภูมิในการ

ไฮโดรไลซิสเป็น 50 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดทั้งเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR-Cs) และเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Phanerochaete sp.* (PC-Cs) เนื่องมาจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการให้เอนไซม์เซลลูเลสดิบทำให้ยังมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ทำให้เมื่อไฮโดรไลซิสในสถานะที่อุณหภูมิที่ไม่สูง (27 และ 35 องศาเซลเซียส) จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีและดึงน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มาใช้ ในขณะที่การปรับอุณหภูมิในการไฮโดรไลซิสเป็น 50 องศาเซลเซียสนั้นมีเพียงแค่เชื้อจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้เท่านั้นที่ยังมีกิจกรรมและเจริญอยู่ได้ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ลดลงในปริมาณที่ไม่มาก สำหรับการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) ขณะไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสนั้นให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการที่ไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิห้องและที่ 35 องศาเซลเซียส แต่ว่ายังมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าการไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเขย่าสามารถเพิ่มการสัมผัสระหว่าง



ภาพที่ 9 ผลของอุณหภูมิและการเขย่าต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่พีเอช 4.8 ระยะเวลา 12 ชั่วโมง

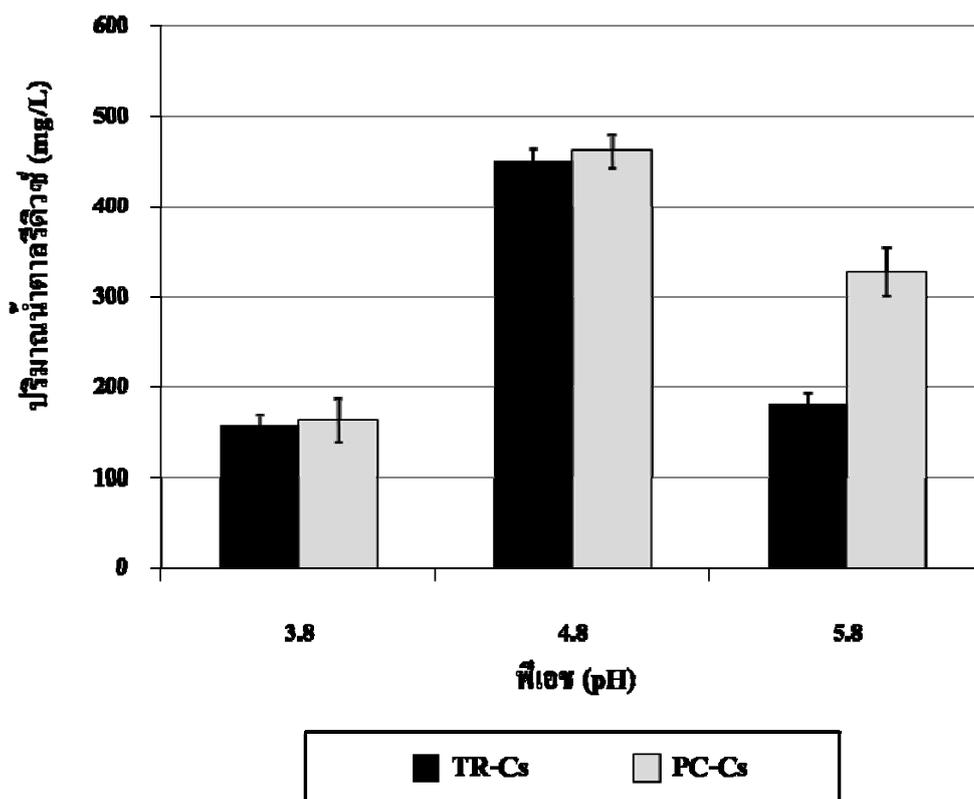
กากตะกอนและเอนไซม์เซลลูเลสได้ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่มากกว่าการไฮโดรไลซิสกากตะกอนที่อุณหภูมิห้องแต่ว่าการเขย่าที่อุณหภูมิห้องไม่ได้ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ถูกจุลินทรีย์ดึงไปใช้ ดังนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จึงน้อยกว่าการไฮโดรไลซิสกากตะกอนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kaur *et al.* (1998) ที่ได้ไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma sp.* ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด เช่นเดียวกับ Dienes *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษากาประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าจากเชื้อ *Trichoderma sp.* 2 ชนิดโดยพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ที่ 50-60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่าแต่เอนไซม์เซลลูเลสอาจเสถียรภาพได้

ดังนั้นการไฮโดรไลซิสกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในการศึกษาต่อไปจะให้อุณหภูมิในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่ 50 องศาเซลเซียส

2.2 ผลของค่าพีเอช

พีเอชมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยที่พีเอชจะส่งผลต่อกลุ่มอะมิโนและคาร์บอกซิลของเอนไซม์จึงทำให้เอนไซม์แต่ละชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลายแตกต่างกันไป สำหรับการศึกษาพีเอชในการไฮโดรไลซ์กากตะกอนโดยใช้ค่าพีเอช 3.8 4.8 และ 5.8 ดังแสดงผลในภาพที่ 10 พบว่าการไฮโดรไลซ์กากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่พีเอช 3.8 เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR-Cs) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 157.20 ± 12.35 mg/L และเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Phanerochaete sp.* (PC-Cs) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 163.02 ± 24.70 mg/L เมื่อไฮโดรไลซ์กากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่พีเอช 4.8 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดทั้ง TR-Cs และ PC-Cs คือ 449.77 ± 14.41 และ 461.42 ± 18.53 mg/L ตามลำดับ และเมื่อปรับค่าพีเอชเป็น 5.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงทั้ง TR-Cs และ PC-Cs โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 180.49 ± 12.35 และ 327.50 ± 26.76 mg/L ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dienes *et al.* (2004) ที่ศึกษาประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าจากเชื้อ *Trichoderma sp.* 2 ชนิดโดยพบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสด้วย

เอนไซม์เซลลูเลส อยู่ที่พีเอช 5 และหากเอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งผลิตต่างกันช่วงพีเอชที่เหมาะสมก็อาจต่างกันด้วย



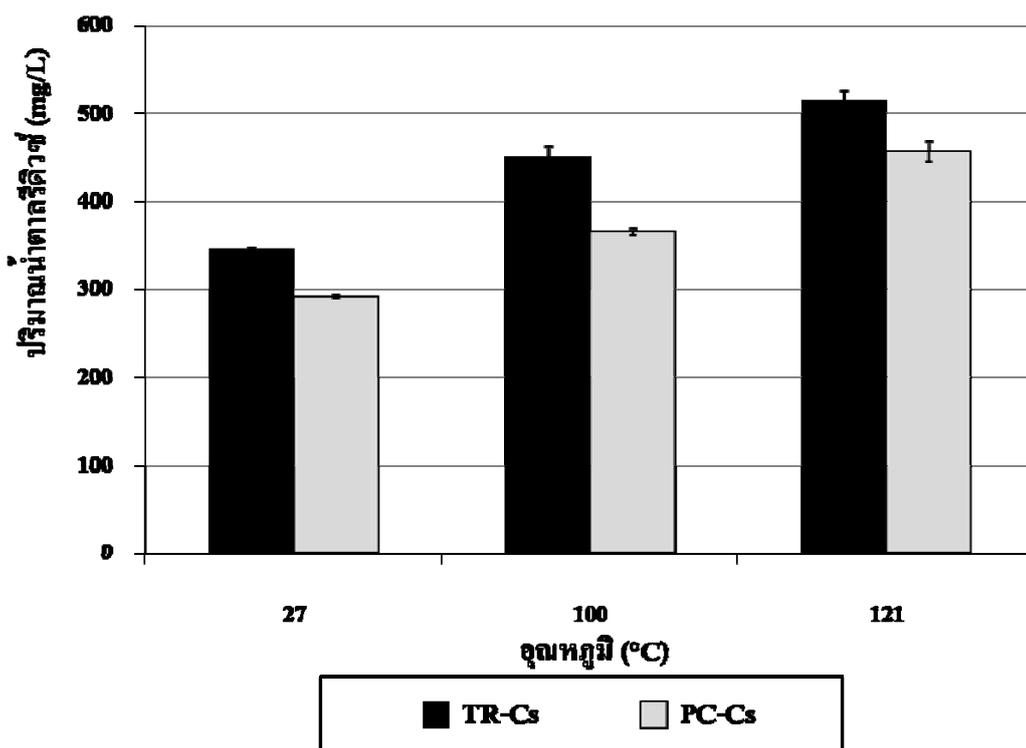
ภาพที่ 10 ผลของพีเอชต่อการผลิตน้ำตาลรีดิซซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชม

จากการศึกษาพบว่าที่พีเอช 4.8 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสกากตะกอนของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 ผลการปรับสภาพกากตะกอนด้วยความร้อน

การปรับสภาพกากตะกอนด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ก่อนการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตน้ำตาลรีดิซซ์ได้สูงสุดทั้ง TR-Cs และ PC-Cs คือ 514.77 ± 11.31 และ 456.09 ± 11.31 mg/L ตามลำดับ จากภาพที่ 11 เมื่อปรับสภาพกากตะกอนก่อนไฮโดรไลซ์ด้วยความร้อนสูง จะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิซซ์สูงขึ้นด้วย เพราะความร้อนจะทำให้โครงสร้างของ

เซลลูโลสในกากตะกอนเสียสภาพ (Zhang and Cai, 2008) นอกจากนี้การที่อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นทำให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินอาจจะละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น โครงสร้างของสับสเตรทจึงมีพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้นด้วย ส่งผลให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถซึมผ่านไปยังเซลลูโลสและย่อยกากตะกอนได้ง่ายขึ้น (Zhang and Cai, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhao *et al.* (2009) ที่ได้ปรับสภาพขานอ้อยด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ก่อนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ พบว่าการปรับสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น



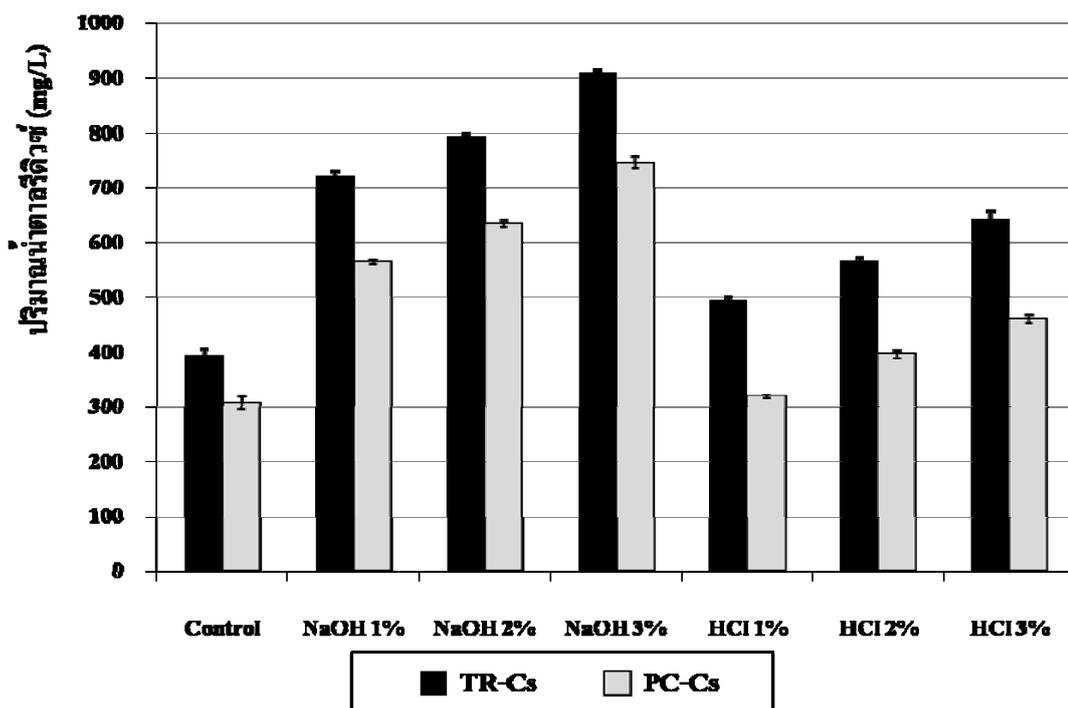
ภาพที่ 11 ผลของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยความร้อนต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 ระยะเวลา 24 ชม.

2.4 ผลของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารเคมี

จากการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 และ 3% โดยมวลต่อปริมาตรที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสก่อนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วย TR-Cs คือ 722.81 ± 7.54 , 794.82 ± 3.77 และ 912.18 ± 3.77 mg/L ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วย PC-Cs คือ 565.45 ± 3.77 , 636.13 ± 5.66

และ 746.82 ± 11.32 mg/L ตามลำดับ ส่วนการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลาย HCl เข้มข้น 1, 2 และ 3% ก่อนการไฮโดรไลซิสด้วย TR-Cs คือ 496.10 ± 3.77 , 566.78 ± 5.66 และ 642.80 ± 15.09 mg/L ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วย PC-Cs คือ 320.06 ± 3.77 , 397.41 ± 7.54 และ 461.42 ± 7.54 mg/L ตามลำดับ จากภาพที่ 12 แสดงให้เห็นว่า การปรับสภาพด้วยสารเคมีที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นด้วยทั้งการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH และ HCl โดยการปรับสภาพด้วยสารเคมีนี้จะทำให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินละลายน้ำออกมาได้เพิ่มขึ้น ทำให้พื้นที่ผิวในการสัมผัสเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการปรับสภาพด้วยความร้อน จึงทำให้เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซิสเซลลูโลสในกากตะกอนเพิ่มขึ้นด้วย (Zhang and Cai, 2008)

นอกจากนี้การปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลาย NaOH จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลาย HCl เนื่องจากการปรับสภาพกากตะกอนด้วย



ภาพที่ 12 ผลของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารเคมีต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 ระยะเวลา 24 ชม.

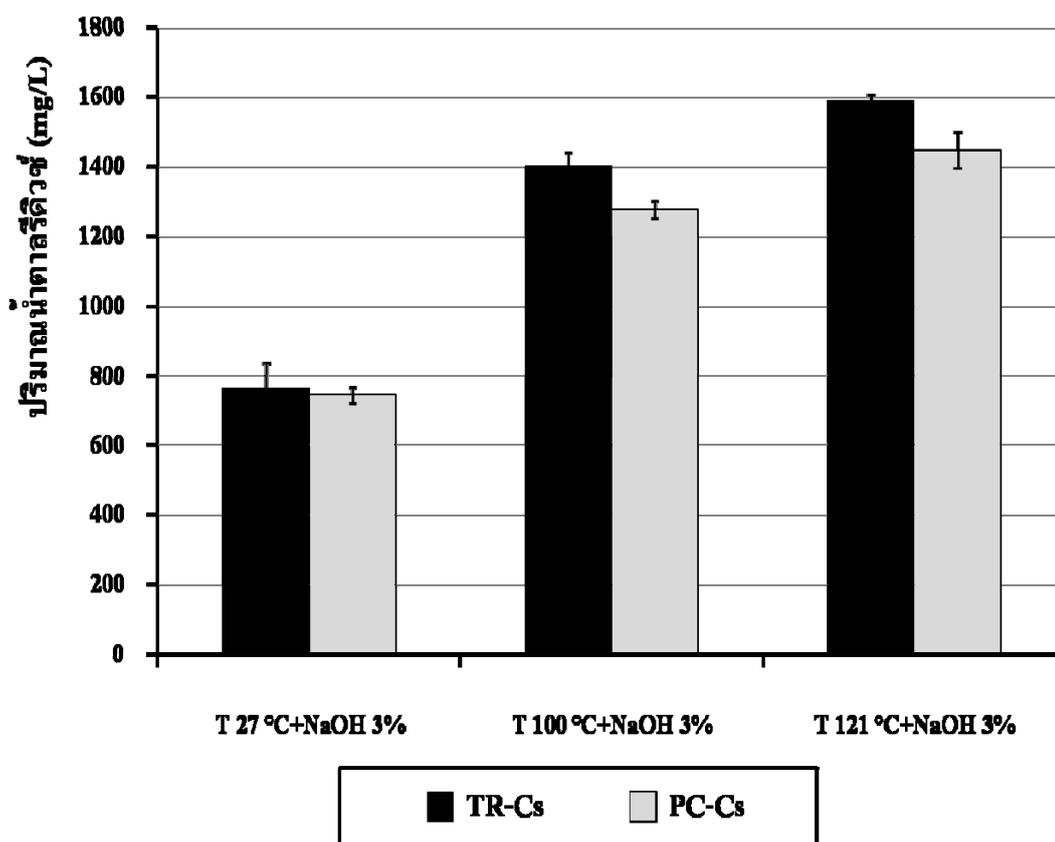
สารละลายต่างจะลดปริมาณลิกนินได้มากกว่าการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายกรด โดยลิกนินที่เหลืออยู่จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมคือสารประกอบกลุ่ม furfural ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จึงน้อยกว่าการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายต่าง (Hendriks and Zeeman, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhao *et al.* (2009) ที่ศึกษาการปรับสภาพขานอ้อย ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3, 5, 7 และ 9% พบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นด้วย โดยที่การปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 9% จะได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด จากการศึกษานี้ สารละลายที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยสารเคมีคือ สารละลาย NaOH เข้มข้น 3% เป็นข้อมูลในการศึกษาเรื่องการปรับสภาพกากตะกอนร่วมกับความร้อนในขั้นต่อไป

2.5 ผลของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารเคมีร่วมกับความร้อน

การปรับสภาพกากตะกอนด้วยวิธีการต่างๆเช่น สารละลายต่าง กรด หรือความร้อน จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ดังนั้นหากนำวิธีการเหล่านี้มาใช้ร่วมกันอาจมีความเป็นไปได้ที่จะได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบถึงสารเคมีและความร้อนที่ใช้ในการปรับสภาพกากตะกอนที่ดีที่สุด จึงนำมาปรับสภาพกากตะกอนร่วมกันซึ่งแสดงในภาพที่ 13 เมื่อความใช้ความร้อนร่วมกับสารละลาย NaOH เข้มข้น 3% ในการปรับสภาพกากตะกอนจะส่งเสริมให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นทั้ง TR-Cs และ PC-Cs โดยการปรับสภาพกากตะกอนในสารละลาย NaOH ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ก่อนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก TR-Cs และ PC-Cs ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1402.79 ± 38.52 และ 1276.81 ± 24.08 mg/L ตามลำดับ การเพิ่มอุณหภูมิในการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารละลายต่างเป็น 121 องศาเซลเซียส ก่อนไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส TR-Cs และ PC-Cs จะเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เป็น 1590.06 ± 14.44 และ 1447.05 ± 52.97 mg/L ตามลำดับ สำหรับการปรับสภาพด้วยสารละลายต่างร่วมกับความร้อนช่วยส่งเสริมให้ปริมาณรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเนื่องจาก ต่างจะมีประสิทธิภาพในการละลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนินหลุดออกจากโครงสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น (Zhang and Cai, 2008; Hendriks and Zeeman, 2009)

หลังจากปรับสภาพของกากตะกอนด้วย 3% NaOH ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ปริมาณสัดส่วนของแก้ว ลิกนิน ไฮโลเซลลูโลสและอัลฟาเซลลูโลสได้เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับกากตะกอนก่อนการปรับสภาพ (ตารางที่ 7) โดยพบว่าการปรับสภาพจะทำให้ปริมาณลิกนิน

ไฮโลเซลลูโลสและอัลฟาเซลลูโลสลดลง ปริมาณของเถ้าเพิ่มขึ้น สัดส่วนของปริมาณไฮโลเซลลูโลสต่อลิกนินของกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพกากตะกอนเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่า ปริมาณลิกนินลดลงมากกว่าปริมาณไฮโลเซลลูโลสที่สูญเสียในกระบวนการปรับสภาพ ซึ่งทำให้การไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสมีประสิทธิภาพมากขึ้น ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จึงเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Zhang and Cai (2008) ที่ได้ทำการศึกษาการปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลาย 2% NaOH พบว่าปริมาณลิกนินลดลงและปริมาณของเถ้าเพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังนั้นเมื่อไฮโดรไลซิสกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นด้วย



ภาพที่ 13 ผลของการปรับสภาพกากตะกอนด้วยค่าร่วมกับความร้อนต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 ระยะเวลา 24 ชม.

ตารางที่ 7 ปริมาณองค์ประกอบบางประการของกากตะกอนก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

		เถา (%)	ลิกนิน (%)	ไฮโดร-เซลลูโลส (%)	อัลฟา-เซลลูโลส (%)	อัตราส่วนไฮโดรเซลลูโลสต่อลิกนิน
กากตะกอน	ก่อน	65.39	13.03	25.77	18.75	1.98
	หลัง	68.80	7.75	23.67	15.43	3.05
กระดาษ	ก่อน	20.08	1.76	57.32	28.09	32.65
	หลัง	22.66	1.49	68.18	40.04	45.81

จากการไฮโดรไลซิสกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายด่างด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* (TR-Cs) และเชื้อ *Phanerochaete sp.* (PC-Cs) พบว่าการไฮโดรไลซิสด้วย TR-Cs ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการไฮโดรไลซิสด้วย PC-Cs (ตารางที่ 8) ซึ่งมีผลมาจากการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเป็นการทำงานร่วมกันของกลุ่มเอนไซม์ 3 ชนิด คือ endo- β -glucanase (EC 3.2.1.4), exo- β -glucanase (EC 3.2.1.91) และ β -glucosidase (EC 3.2.1.21) ดังนั้นการที่เชื้อจุลินทรีย์ต่างชนิดหรือสภาวะในการผลิตต่างกันจะทำให้กลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสมีความสามารถในการไฮโดรไลซิสสับสเตรทได้ไม่เท่ากัน (Juhász *et al.*, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Matins *et al.* (2008) ที่ได้ทำการศึกษา คุณสมบัติในการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* และ *Penicillium echinulatum* โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วยที่วัดจาก FPA ที่เท่ากัน และไฮโดรไลซิสเซลลูโลสชนิดเดียวกัน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่เท่ากัน โดยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์

การปรับสภาพกากตะกอนทำให้โครงสร้างของกากตะกอนเปลี่ยนแปลงเพื่อให้ง่ายต่อการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารละลายด่างช่วยย่อยสารประกอบอื่นๆ และทำให้โครงสร้างกลุ่มไฟเบอร์ในกากตะกอนหลวมมากขึ้น จึงง่ายต่อการซึมผ่านของสารละลายเอนไซม์ และเมื่อใช้ความร้อนสูง ช่วยให้เกิดปฏิกิริยาของด่างเพิ่มขึ้น (Zhang

and Cai, 2008) การที่ใช้อุณหภูมิในการปรับสภาพเพิ่มจาก 27 เป็น 100 และ 121 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วย TR-Cs 183 และ 207% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบการปรับสภาพด้วยค่าที่อุณหภูมิ 100 และ 121 องศาเซลเซียส พบว่าการปรับสภาพด้วยค่าที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการปรับสภาพกาคตะกอนด้วยสารละลายต่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเพียง 13% ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกาคตะกอนด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่จะใช้ต่อในการผลิตแก๊สไฮโดรเจน คือ การปรับสภาพกาคตะกอนด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* 5 FPU ที่พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

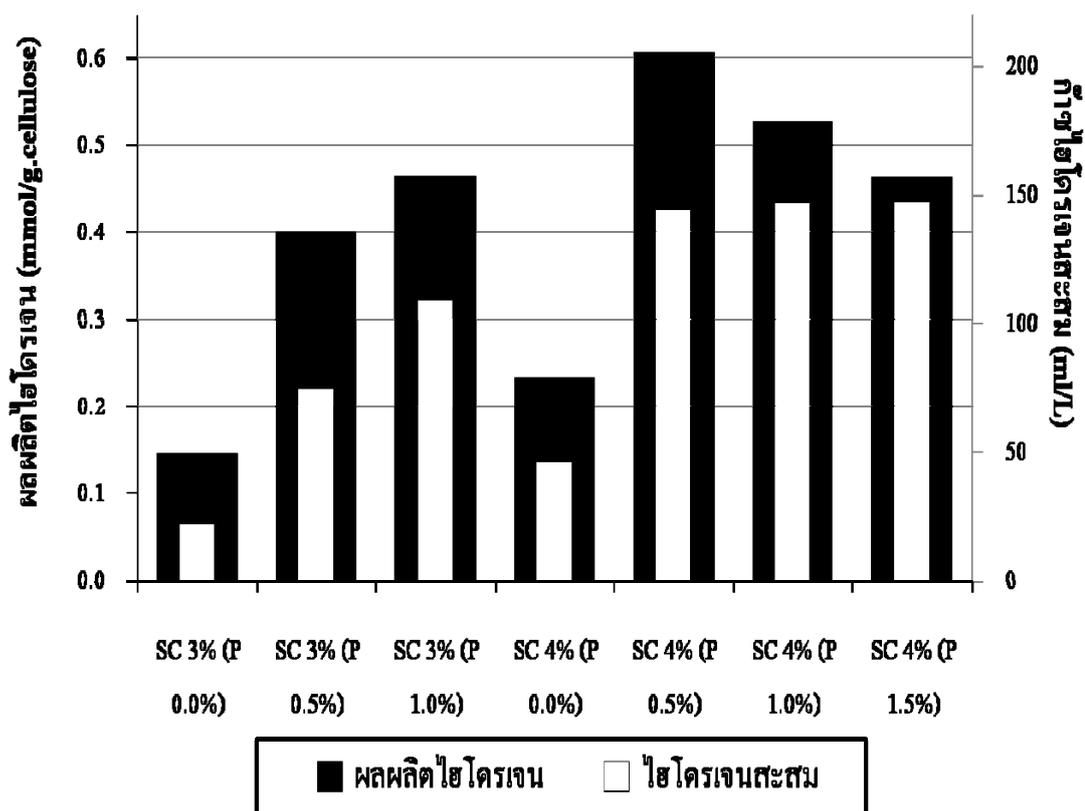
ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสกาคตะกอนที่ปรับสภาพในสภาวะต่างๆด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

สภาวะในการปรับสภาพ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/L)	
		TR-Cs	PC-Cs
Control	27	394.74±11.32	308.06±13.20
T 100°C	100	450.76±11.32	365.41±3.77
T 121°C	121	514.77±11.31	456.09±11.31
NaOH 1%	27	722.81±7.54	565.45±3.77
NaOH 2%	27	794.82±3.77	636.13±5.66
NaOH 3%	27	912.18±3.77	746.82±11.32
HCl 1%	27	496.10±3.77	320.06±3.77
HCl 2%	27	566.78±5.66	397.41±7.54
HCl 3%	27	642.80±15.09	461.42±7.54
T 100°C + NaOH 3%	100	1402.79±38.52	1276.81±24.08
T 121°C + NaOH 3%	121	1590.06±14.44	1447.05±52.97

3. การผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพ

3.1 ผลของสัดส่วนของแข็งของกากตะกอนและกระดาษ

เนื่องจากกากตะกอนที่ใช้ในการทดลองนี้ มีปริมาณคาร์บอนเพียง 19.23% จึงเพิ่มปริมาณคาร์บอนโดยการเติมกระดาษสำนักงานที่ผ่านการปรับสภาพเช่นเดียวกับกากตะกอนร่วม โดยกระดาษที่ใช้ในการศึกษามีความชื้น $2.86 \pm 0.12\%$, เถ้า $20.08 \pm 0.78\%$ และคาร์บอน $44.40 \pm 0.43\%$ จากภาพที่ 14 เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตไฮโดรเจนจากสภาวะการหมักที่สภาวะของแข็ง 3% โดยไม่เติมกระดาษเพิ่ม (SC 3% (P0.0%)) และสัดส่วนของแข็ง 4% (SC 4% (P0.0%)) จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสัดส่วนของแข็งเพิ่มขึ้น คือ 0.15 ± 0.01 และ 0.23 ± 0.02 mmol/g cellulose



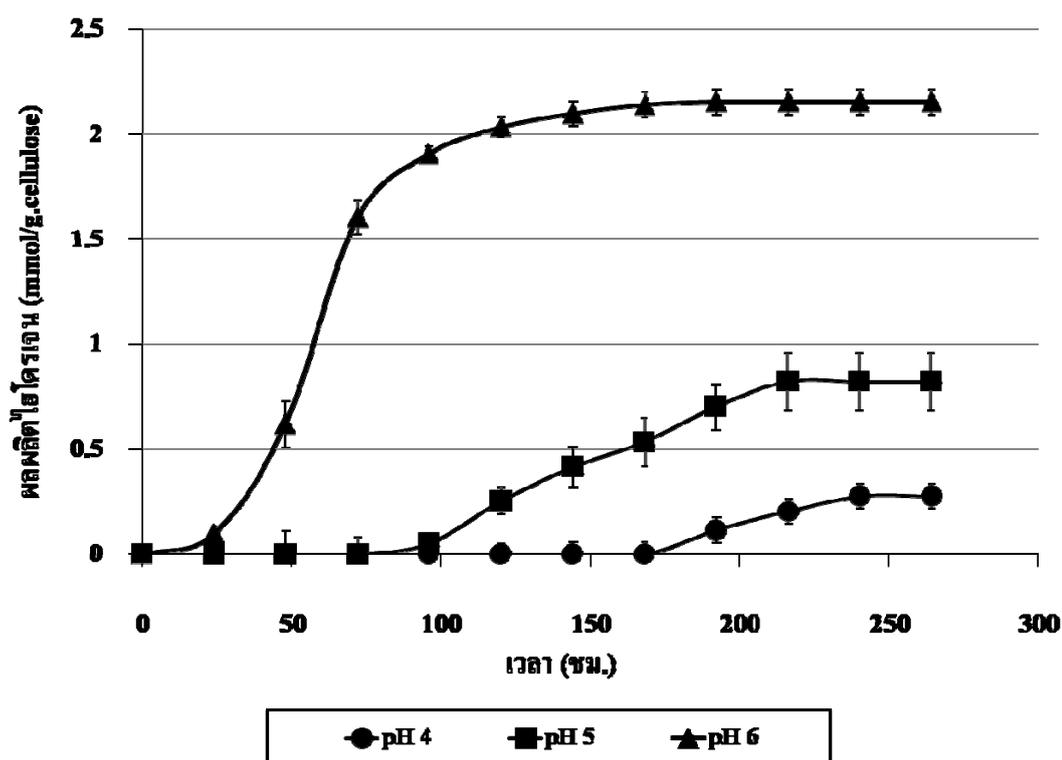
ภาพที่ 14 ผลของสัดส่วนของแข็งของกากตะกอนและกระดาษต่อผลผลิตไฮโดรเจนโดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20 พีเอช 5 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 216 ชม.

ตามลำดับ และเมื่อคุณผลผลิตไฮโดรเจนเมื่อเพิ่มปริมาณคาร์บอน โดยการใช้กระดาษที่ผ่านการปรับสภาพ (P 0.5 และ 1.0%) ในสัดส่วนของแข็ง 3% พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกระดาษเป็น 1.0% จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าคือ 0.46 ± 0.01 mmol/g cellulose ในขณะที่สัดส่วนของแข็ง 4% การเพิ่มปริมาณกระดาษจะทำให้ผลผลิตไฮโดรเจนต่อกรัมคาร์บอนลดลง แต่เมื่อคุณปริมาณไฮโดรเจนสะสม (ภาพที่ 14) พบว่าการเพิ่มปริมาณคาร์บอนด้วยกระดาษจะให้ปริมาณคาร์บอนสะสมเพิ่มขึ้น แต่เมื่อคำนวณเทียบกลับปริมาณคาร์บอนทำให้ค่าที่ได้น้อยลง การที่สัดส่วนของแข็งเพิ่มขึ้นแล้วทำให้ปริมาณผลผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากมีแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้น ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีขึ้น (สัดส่วนคาร์บอนต่อไฮโดรเจนที่เท่ากัน) ทำให้ปริมาณแก๊สไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น จากการศึกษาในสภาวะสัดส่วนของแข็งที่จะนำไปใช้ต่อไปคือ SC 4%(P0.5%) ซึ่งให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 0.61 ± 0.03 mmol/g cellulose

3.2 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

จุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็สามารถเจริญเติบโตได้ดีตามสภาวะที่แตกต่างกันแต่ละกลุ่มกัน โดยพีเอชจะมีผลโดยตรงต่อกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ ค่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อโปรตีน ประจุของกรดอะมิโน polypeptide chain และมีอิทธิพลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน โดยปกติเอ็นไซม์จะหมดกิจกรรมที่ค่าพีเอชต่ำมากหรือสูงมาก ทำให้เอ็นไซม์และสารต่างๆ ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลาย (ดวงพร, 2545) จากภาพที่ 15 การใช้สภาวะในการหมักที่พีเอชต่ำจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้ช้า โดยที่พีเอช 4 เริ่มผลิตแก๊สไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 192 และที่พีเอช 5 เริ่มผลิตแก๊สไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 96 ส่วนที่พีเอช 6 เริ่มผลิตแก๊สไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 24 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 0.28 ± 0.02 , 0.82 ± 0.13 และ 2.15 ± 0.06 mmol/g cellulose ตามลำดับ

Fang and Liu (2002) ได้ทำการศึกษการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยเชื้อผสมที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยใช้กลูโคส 7000 mg/L เป็นแหล่งอาหารที่พีเอชเริ่มต้นต่างกันพบว่าที่พีเอช 5.5 ให้ปริมาณผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 2.1 ± 0.1 mol/mol glucose จากการศึกษาที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนคือ พีเอช 6



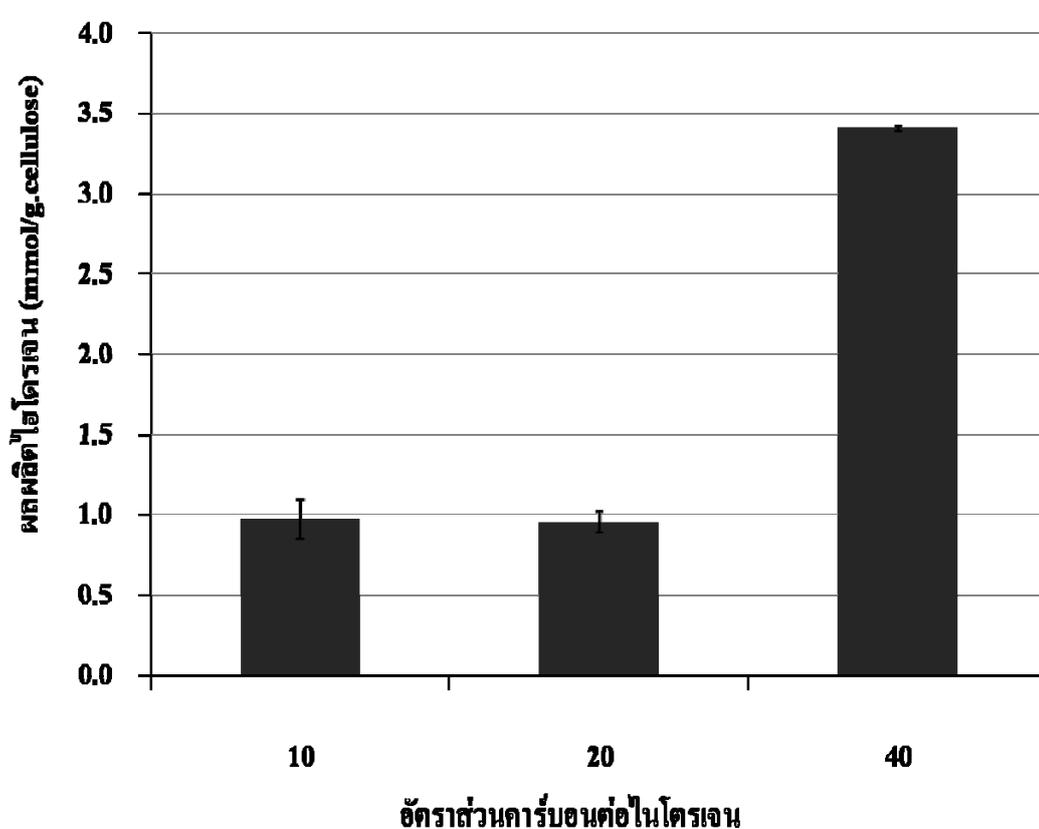
ภาพที่ 15 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อผลผลิตไนโตรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และ กระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 264 ชม.

3.3 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio)

ปริมาณแก๊สชีวภาพสะสมที่ 240 ชั่วโมง ในสภาวะที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 20 และ 40 เป็น 190.50, 180.67 และ 200.00 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกันมาก แต่ผลผลิตไนโตรเจนแตกต่างกันซึ่งเป็นผลมาจากร้อยละในปริมาณแก๊สชีวภาพของแก๊สไนโตรเจนมากน้อยแตกต่างกัน โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 ให้ผลผลิตไนโตรเจนสูงสุดคือ 2.39 ± 0.02 mmol/g cellulose ซึ่งแสดงไว้ในภาพที่ 16 การที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ แต่ผลผลิตที่ได้เป็นแก๊สชนิดอื่นทำให้ปริมาณแก๊สไนโตรเจนน้อย อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมจะทำให้มีปริมาณแก๊สไนโตรเจนที่เกิดขึ้นสูงด้วย ซึ่งถ้ามีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำเกินไปจะทำให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียในระบบสูง แต่ถ้ามีอัตราส่วนนี้มากเกินไปทำให้ไนโตรเจนมีปริมาณไม่

เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งในสภาวะเช่นนี้จะส่งผลต่อกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ และทำให้การผลิตแก๊สไฮโดรเจนลดลงได้ (Lin and Lay, 2004)

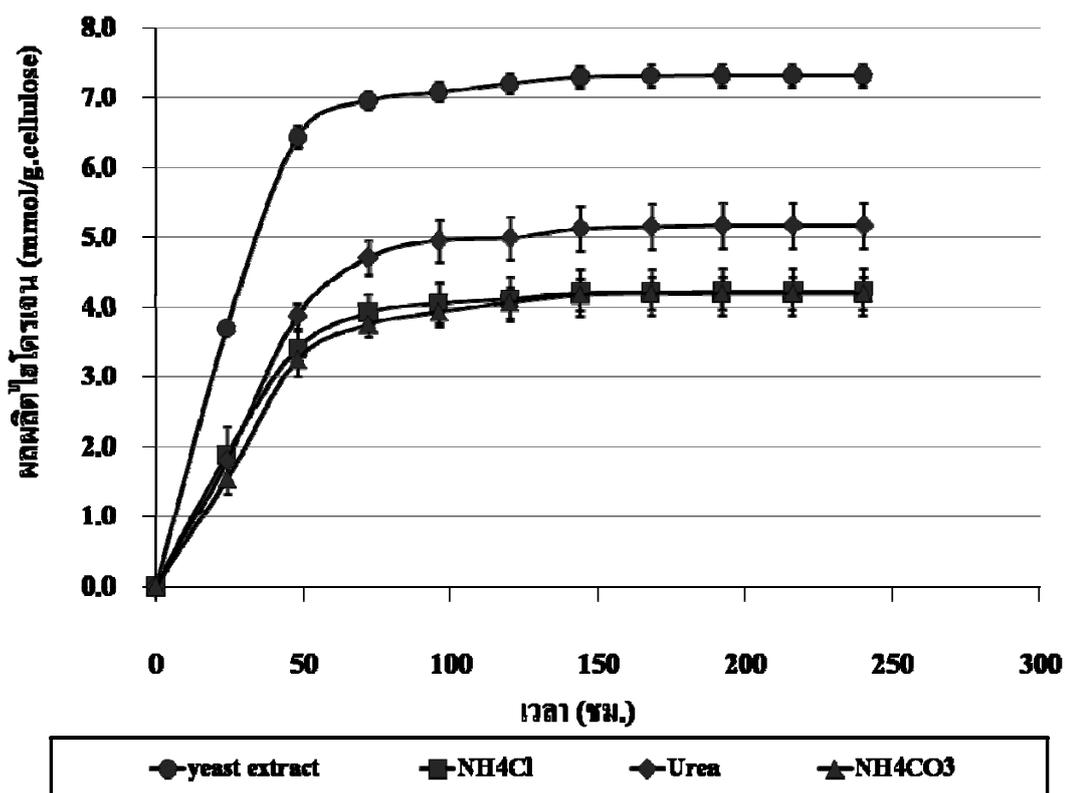
นอกจากนี้ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญสำหรับโปรตีน กรดนิวคลีอิก และเอนไซม์มีความสำคัญต่อเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจึงต้องมีปริมาณที่เหมาะสมกับกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ (Bisailon *et al.*, 2006) ดังนั้นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนคือ 40



ภาพที่ 16 ผลของสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อผลผลิตไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) พีเอช 5 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.

3.4 ผลของแหล่งไนโตรเจน

การใช้แหล่งไนโตรเจนเติม ได้แก่ urea NH_4CO_3 , NH_4Cl และ yeast extract ที่พีเอช 6 และสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุดคือ 7.33 ± 0.16 mmol/g cellulose รองลงมาคือ urea, NH_4Cl และ NH_4CO_3 ซึ่งให้ผลผลิตไฮโดรเจนเป็น 5.17 ± 0.33 , 4.23 ± 0.33 และ 4.20 ± 0.23 mmol/g cellulose ตามลำดับ เนื่องจาก yeast extract มีองค์ประกอบหลักที่ประกอบไปด้วยไนโตรเจน วิตามิน B-complex มากที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ และ โคเอนไซม์ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีความจำเป็นและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาใช้เองได้ จำเป็นต้องได้จากอาหารเท่านั้น



ภาพที่ 17 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อผลผลิตไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และ กระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

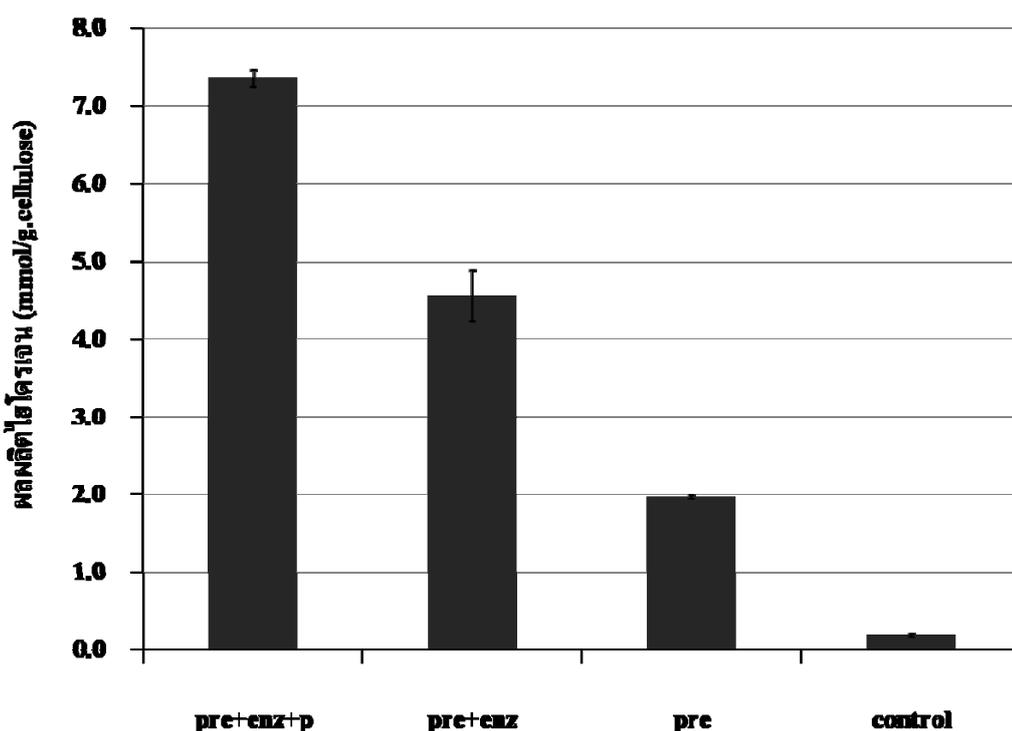
ดังนั้น yeast extract จึงช่วยสนับสนุนกระบวนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และช่วยส่งผลให้เพิ่มปริมาณแก๊สไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น แต่หากมีการเปรียบเทียบเรื่องค่าใช้จ่ายแล้ว urea อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนเนื่องจากมีราคาถูกกว่า (ผลผลิตไฮโดรเจนลดลงเหลือ 70.52% เมื่อเทียบกับการใช้ yeast extract) ดังนั้นจากการศึกษานี้พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอน

3.5 ผลการปรับสภาพกากตะกอน การใช้เอนไซม์และการใช้กากตะกอนร่วม

จากการที่กากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่แต่การนำมาใช้ประโยชน์ควรมีการปรับสภาพเซลลูโลสและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเสียก่อน เพื่อที่จะใช้ประโยชน์จากกากตะกอนได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการศึกษาี้แสดงให้เห็นถึงผลของการไม่ปรับสภาพกากตะกอน (control) การปรับสภาพกากตะกอนด้วยค่าร่วมกับความร้อนให้ผลผลิตไฮโดรเจน (pre) การใช้เอนไซม์เซลลูเลสไฮโดรไลซิสกากตะกอนที่ปรับสภาพก่อนการหมัก (pre+enz) และการใช้เอนไซม์เซลลูเลสไฮโดรไลซิสกากตะกอนการใช้กระดาษร่วมก่อนการหมัก (pre+enz+p) ต่อผลผลิตไฮโดรเจนได้แสดงไว้ในภาพที่ 18 โดยให้ผลผลิตไฮโดรเจน 0.19 ± 0.02 , 1.97 ± 0.02 , 4.56 ± 0.33 และ 7.23 ± 0.11 mmol/g cellulose ตามลำดับ และอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจนต่อชั่วโมงสูงสุดในระยะเวลา 24 ชั่วโมงคือ 2.46 ± 0.24 , 26.14 ± 0.26 , 37.45 ± 2.62 และ 74.29 ± 1.66 ml/L-hr. ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้การปรับสภาพกากตะกอนด้วยค่าร่วมกับความร้อน(pre)ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการไม่ปรับสภาพกากตะกอน (control) ถึง 10.7 เท่า โดยการปรับสภาพจะทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากขึ้นจุลินทรีย์จึงสามารถเข้าไปย่อยสลายสับสเตรทได้มากขึ้นทำให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วย (Zhang and Cai, 2008; Hendriks and Zeeman, 2009) นอกจากนี้การปรับสภาพกากตะกอนจะทำให้ปริมาณเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นอุปสรรคและตัวยับยั้งในการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ลดลงอีกด้วย (Hendriks and Zeeman, 2009)

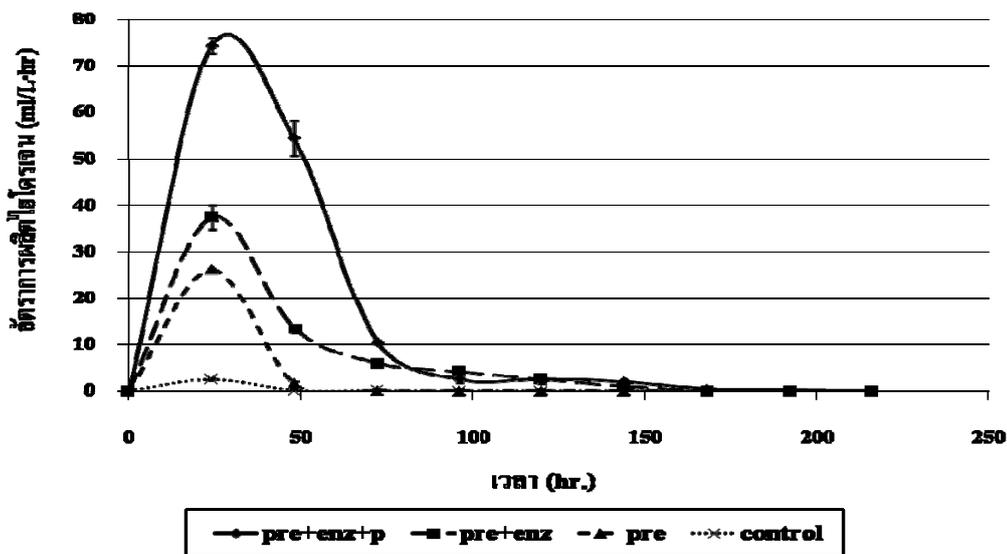
การใช้เอนไซม์เซลลูเลสไฮโดรไลซิสกากตะกอนที่ปรับสภาพก่อนการหมัก (pre+enz) จะให้ปริมาณผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการปรับสภาพกากตะกอนด้วยค่าร่วมกับความร้อนให้ผลผลิตไฮโดรเจน (pre) ถึง 2.3 เท่า เพราะนอกจากการปรับสภาพกากตะกอนจะทำให้เซลลูโลสถูกย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายขึ้นแล้วการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จะช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสและช่วยย่อยกากตะกอนได้มากขึ้นทำให้ผลผลิต

ไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้การใช้เอนไซม์เซลลูเลสไฮโดรไลซิติกากตะกอนและการใช้
 กระดาษที่ผ่านการปรับสภาพร่วม (pre+enz+p) จะให้ผลผลิตไฮโดรเจนมากกว่าการใช้เอนไซม์
 เซลลูเลสไฮโดรไลซิติกากตะกอนที่ปรับสภาพก่อนการหมัก (pre+enz) ถึง 1.7 เท่า เนื่องจากมี
 ปริมาณคาร์บอนและเซลลูโลสที่สูงกว่าจึงได้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิติกากตะกอนที่
 กากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพเพียงอย่างเดียว ดังนั้นผลผลิตไฮโดรเจนที่ได้จากการเติมกระดาษที่
 ผ่านการปรับสภาพจึงสูงกว่าด้วยเช่นกัน

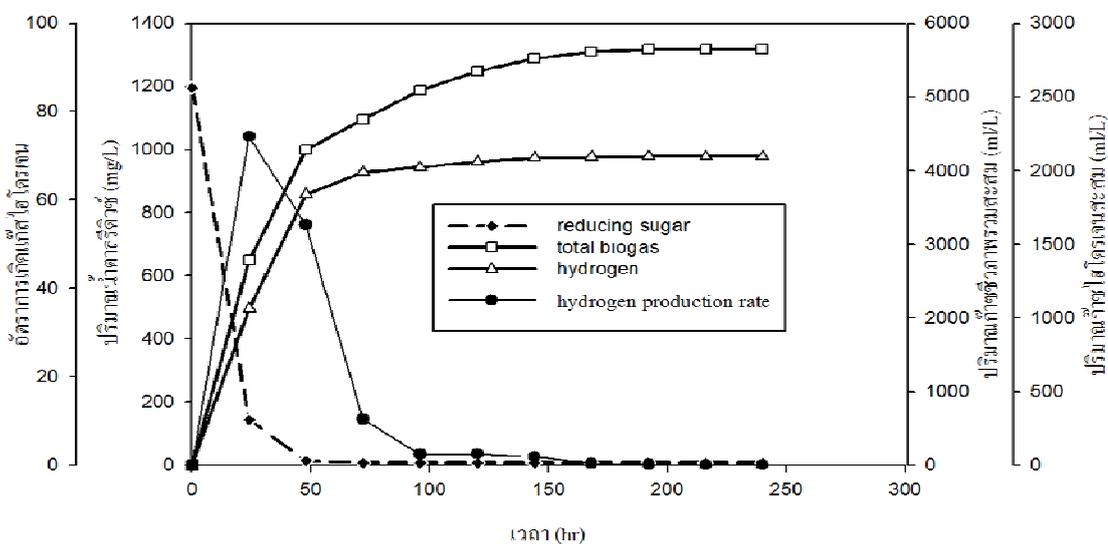


ภาพที่ 18 ผลของการปรับสภาพกากตะกอน การใช้เอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมต่อผลผลิต
 ไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อ
 ไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.

จากภาพที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จะลดลงอย่างมากในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ
 เหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียงเล็กน้อย การที่ปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือน้อยอาจเกิดจากอัตราการ
 ย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสน้อยกว่าอัตราการนำกลูโคสไปใช้ของจุลินทรีย์จึงทำให้เหลือ
 ปริมาณน้ำตาลหลังจากชั่วโมงที่ 24 น้อยลงแต่ยังมีแก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา



ภาพที่ 19 ผลของการปรับสภาพกากตะกอน การใช้เอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมต่ออัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.



ภาพที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แก๊สไฮโดรเจนสะสม ปริมาณแก๊สรวมสะสม จากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.

ของ Wang *et al.* (2008) ที่ทำการศึกษการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* X9 และ *Ethanoigenens harbinense* B49 ในอาหาร microcrystalline cellulose ที่ พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณแก๊สไฮโดรเจน 127 มิลลิลิตร โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วเพียงชั่วโมงที่ 2 แต่ยังสามารถผลิตแก๊สไฮโดรเจนได้อย่างต่อเนื่อง

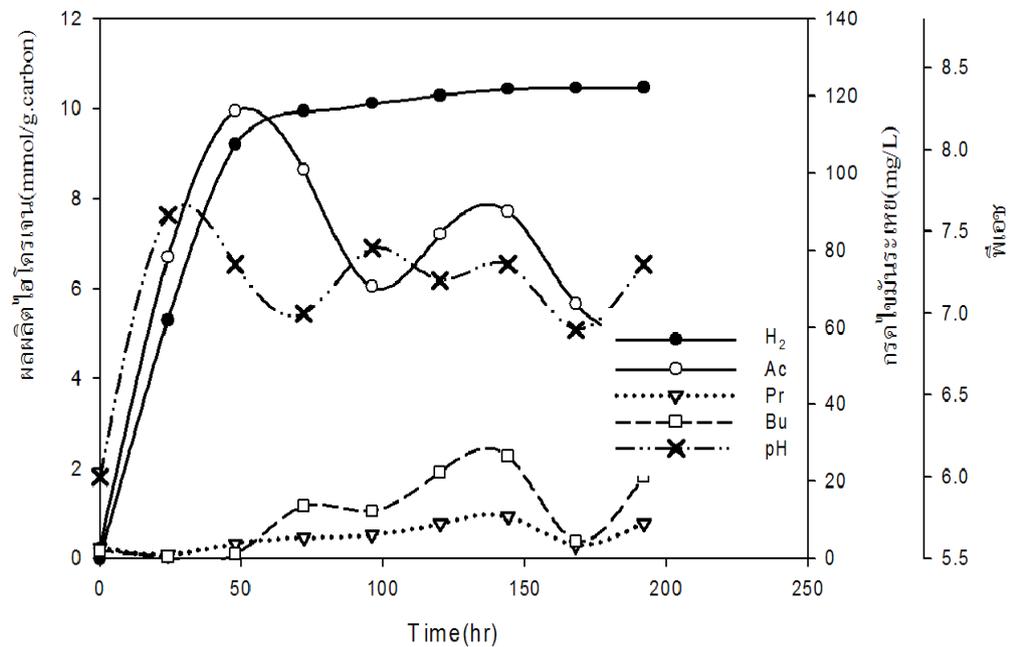
3.6 ปริมาณของกรดไขมันระเหย (volatile fatty acid, VFA)

ปริมาณกรดไขมันระเหยที่เกิดจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) ที่ผ่านการปรับสภาพ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 6 ปริมาตร 70 มิลลิลิตร แสดงในภาพที่ 21 กรดไขมันระเหยที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่คือ กรดอะซิติก จากการย่อยกลูโคส 1 โมล จะเกิดกรดอะซิติก บิวทริกและโพรไพโอนิก ดังแสดงในสมการข้างล่าง โดยการย่อยกลูโคส 1 โมล จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก 2 โมล ได้แก๊สไฮโดรเจน 4 โมล การย่อยกลูโคส 1 โมล ที่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดบิวทริก 1 โมล ได้แก๊สไฮโดรเจน 2 โมล และการย่อยกลูโคส 1 โมล ที่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดโพรไพโอนิก 2 โมล จะต้องใช้แก๊สไฮโดรเจน 2 โมล ดังนั้นสัดส่วนของกรดไขมันระเหยที่เกิดขึ้นจึงมีความสัมพันธ์กับผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่ได้จากการหมัก การศึกษานี้มีกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Wen-Hsing *et al.* (2009) ที่ศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อแบคทีเรียผสมในการหมัก และมีกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักเช่นเดียวกัน เนื่องจากมีปริมาณกรดอะซิติกสูง ปริมาณกรดบิวทริกต่ำ ทำให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนที่สูง



จากผลการศึกษาทำให้ทราบถึงสถานะที่เหมาะสมในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนโรงงานกระดาษ (ตารางที่ 9) คือ การหมักกากตะกอน (3.5%) ร่วมกับกระดาษ (0.5%) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วย 3% NaOH ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (2 ชั่วโมง) และนำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 5 FPU โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 ใช้ yeast

extract เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอช 6 ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับสภาพการหมักแบบไร้อากาศด้วย แก๊สอาร์กอน และใช้เชื้อเริ่มต้น 10% โดยปริมาตร หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 21 ปริมาณแก๊สไฮโดรเจน ปริมาณกรดไขมันระเหยและพีเอชจากการหมักกากตะกอน (3.5%) และกระดาษ (0.5%) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 พีเอช 6 หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 240 ชม.

ตารางที่ 10 แสดงผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนที่ได้จากการศึกษานี้เปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นพบว่า เมื่อใช้กลูโคส ซูโครส หรือแป้ง เป็นแหล่งสับสเตรทในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจะให้ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนสูงกว่าการใช้สับสเตรทที่เป็นสารโมเลกุลที่ซับซ้อนกว่าเช่น น้ำเสียจากอุตสาหกรรมนม และกากตะกอนน้ำเสียโรงงานกระดาษ เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องมีกระบวนการย่อยสับสเตรทที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลเล็กเพื่อเข้าสู่กระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ได้เสียก่อน จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานกระดาษรีไซเคิลที่ปรับสภาพและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้

ตารางที่ 9 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมและผลผลิตไฮโดรเจนที่สภาวะในการหมักต่างๆ

สภาวะการหมัก	pH	C:N Ratio	ระยะเวลา การหมัก (hr)	ปริมาณแก๊ส ไฮโดรเจนสะสม (ml/L)	ผลผลิตแก๊ส ไฮโดรเจน (mmol/g cellulose)
สัดส่วนของแข็ง					
SC 3% (P 0.0%)	5	20	216	21.56±6.07	0.15±0.04
SC 3% (P 0.5%)	5	20	216	75.19±6.54	0.40±0.03
SC 3% (P 1.0%)	5	20	216	108.83±10.03	0.46±0.01
SC 4% (P 0.0%)	5	20	216	46.05±17.55	0.23±0.02
SC 4% (P 0.5%)	5	20	216	144.40±8.24	0.61±0.03
SC 4% (P 1.0%)	5	20	216	146.84±1.84	0.53±0.01
SC 4% (P 1.5%)	5	20	216	147.40±20.67	0.46±0.04
C:N Ratio					
10	5	10	240	194.08±24.64	0.68±0.09
20	5	20	240	191.06±12.60	0.67±0.04
40	5	40	240	680.76±2.78	2.39±0.01

ตารางที่ 9 (ต่อ)

สภาวะการหมัก	pH	C:N Ratio	ระยะเวลาการ หมัก (hr)	ปริมาณแก๊ส ไฮโดรเจนสะสม (ml/L)	ผลผลิตแก๊ส ไฮโดรเจน (mmol/g cellulose)
พีเอช					
4	4	20	240	79.01±9.13	0.28±0.02
5	5	20	240	233.96±38.38	0.82±0.13
6	6	20	240	612.61±16.91	2.15±0.06
แหล่งไนโตรเจน					
Yeast Extract	6	40	216	2093.24±32.42	7.23±0.16
NH ₄ Cl	6	40	216	1168.20±89.29	5.32±0.33
Urea	6	40	216	1474.71±67.20	5.17±0.33
NH ₄ CO ₃	6	40	216	1195.80±65.86	4.20±0.23
การปรับสภาพกากตะกอนและการใช้เอนไซม์					
pre+enz+p	6	40	216	2093.24±32.42	7.23±0.11
pre+enz	6	40	216	915.48±66.23	4.56±0.33
pre	6	40	216	396.25±4.33	1.97±0.02
control	6	40	216	36.96±3.95	0.19±0.02

ตารางที่ 10 ผลผลิตแก๊สไฮโดรเจนจากกลุ่มจุลินทรีย์ด้วยสับสเตรทชนิดต่างๆ

กลุ่มจุลินทรีย์	สับสเตรท	ผลผลิตไฮโดรเจน	อ้างอิง
Cattle manure sludge	Glucose	1.0 mol/mol glucose	Cheong and Hansen (2006)
Digested sludge	Glucose	1.8 mol/mol glucose	Wang and Wan (2008)
Methanogenic granules	Glucose	1.2 mol/mol glucose	Hu and Chen (2007)
Digested wastewater	Sucrose	6.12 mol/mol sucrose	Zhu and Beland (2006)
Anaerobic sludge	Starch	2.2 mol/mol hexose	Lin <i>et al.</i> (2008)
Anaerobic sludge	Dairy wastewater	0.032 mmol/g COD	Mohan <i>et al.</i> (2008)
Anaerobic sludge	Food waste	1.8 mol/mol hexose	Shin <i>et al.</i> (2004)
Anaerobic sludge	Paper sludge	7.23 mmol/g cellulose	การศึกษานี้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

สภาวะการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ เชื้อ *Trichoderma reesei* (TR) ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนฟางข้าวร่วมกับรำข้าวที่ความชื้น 85% พีเอช 5 และเชื้อ *Phanerochaete sp.* (PC) ให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนกากตะกอนร่วมกับรำข้าวที่ความชื้น 70% พีเอช 6 เนื่องจากกากตะกอนน้ำเสียของโรงงานกระดาษรีไซเคิลประกอบด้วยเซลลูโลสและสารประกอบอื่นๆ ซึ่งย่อยได้ยากด้วยเชื้อจุลินทรีย์จึงต้องมีการปรับสภาพกากตะกอนด้วยสารเคมีก่อนนำมาใช้ เมื่อความเข้มข้นของสารเคมีเพิ่มขึ้นจะให้ปริมาณน้ำตาลที่สูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและด่างพบว่า การปรับสภาพด้วยด่างจะทำให้ได้ผลผลิตที่สูงกว่าการปรับสภาพด้วยกรด นอกจากนี้การปรับสภาพด้วยสารละลายด่างที่อุณหภูมิสูงได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น หลังจากนั้นนำกากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์มาหมักเพื่อผลิตแก๊สไฮโดรเจน สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาคือ การใช้กากตะกอน (3.5%) ร่วมกับกระดาษ (0.5%) ที่ปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3% ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ก่อนไฮโดรไลซิสกากตะกอนและกระดาษด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* 5 FPU ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 40 โดยใช้ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนที่พีเอช 6 โดยใช้เชื้อผสมที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อน 1% โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูงกว่าการนำกากตะกอนที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์มาหมักที่สภาวะเดียวกันถึง 41.7 เท่า

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงความเป็นไปได้ในการนำกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานกระดาษรีไซเคิลมาผลิตแก๊สไฮโดรเจน หากมีการนำไปประยุกต์ใช้ควรศึกษาในระดับที่ใหญ่ขึ้นเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้านอื่นเช่น การเขย่าขณะไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ การควบคุมพีเอชระหว่างหมัก เพื่อที่จะให้ได้ผลผลิตไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อลดค่าใช้จ่ายจากการใช้ yeast extract ที่มีราคาสูง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จินตนา ขอบวิจักขณ์. 2543. การผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงด้วยแป้งมัน
สำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ดวงพร คันธโชติ. 2545. นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2544. จุลชีววิทยา ปฏิบัติการ.
พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์เจ้าพระยาพระابرบการพิมพ์ จำกัด. กรุงเทพฯ.
- มงคล งามเจริญวงษ์. 2547. การใช้แป้งดิบเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอนสำหรับการผลิตแก๊สไฮโดรเจน
โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภลักษณ์ สุดขาว. 2543. การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ endoglucanase
และสถานะในการสร้างเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุภาวินี นิลเขต. 2550. การใช้กากตะกอนเยื่อกระดาษเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกลูโคสและ
เอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *Trichoderma sp.* ในปฏิกรณ์กึ่งต่อเนื่อง ขนาดระดับ
ห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เนริสา คุณประทุม. 2543. การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จาก
การเกษตร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เยาวพา บุญปู่. 2540. การเพาะเลี้ยงราเส้นใย. **R&D Newsletter 4 (3)**. องค์การเภสัชกรรม,
กรุงเทพฯ.
- Aijie, W., N. Ren, Y. Shi and D. J. Lee. 2008. Bioaugmented hydrogen production from
microcrystalline cellulose using co-culture *Clostridium acetobutylicum* X9 and
Ethanoigenens harbinense B49. **International Journal of Hydrogen Energy**. 33: 912-
917.

- Alastair J. W., P. J. Hobbs, P. J. Holliman and D. L. Jones. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. **Bioresource Technology**. 99: 7928-7940.
- Bengtsson, S., J. Hallquist, A. Werker and T. Welander. 2008. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. **Biochemical Engineering Journal**. 40: 492-499.
- Bhat, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**. 18: 355-383
- Bommariu, A. S., A. Katona, S. E. Cheben, A. S. Patel, A. J. Ragauskas, K. Knudson and Y. Pu. 2008. Cellulase kinetic saccharification of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**. 10: 370-381.
- Cheong, D. Y. and C. L. Hansen. 2006. Acidogenesis characteristics of natural mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. **Process Biochemistry**. 41: 1736-1745.
- _____, _____. 2006. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. **Applied Microbiology Biotechnology**. 72: 635-643.
- Das, D. and T. N. Veziroglu. 2008. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**. 33: 6046-6057.
- Dienes, D, A. Egyhazi and K. Reczey. 2004. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**. 20: 11-21.
- Evvyerme, D., K. Morimoto and S. Yamzaki. 2000. Hydrogen gas production from N-acetyl-D-glucosamine (GlcNac) by *Clostridium paraputrificum*. **Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resource in Tropics**. 14: 114-119.

- Fan, L. T. and Y. H. Lee. 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose :Derivation of a Mechanistic kinetic model. **Biotechnology Bioengineering**. 25: 2707-2733.
- Fang, H. H. P. and H. Liu. 2006. Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**. 31: 2223-2230.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. 59: 257-268.
- Goering, H. K. and P. J. V. Soest. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagent, Producers and Some Applications). **Agriculture Handbook No.379. United States Department of Agriculture**. Washington, D.C. 20402, U.S.A. 20 p.
- Gomes, I., J. Gomes, W. Steiner and H. Esterbauer. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 36: 701-707.
- Haq, I. U., K. Shahzadi, U. Hameed, M. M. Javed and M. A. Qadeer. 2006. Solid-state fermentation of cellulases by locally isolated *Trichoderma harzianum* for the exploitation of agricultural byproducts. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 9: 1779-1782.
- Hendriks, A .T. W. M. and G. Zeeman. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 100: 10–18.
- Hu, B. and S. L. Chen. 2007. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**. 32: 3266–3273.

- Igarashi, K., M. Samejima, Y. Saburi, N. Habu and K. E. L. Eriksson. 1997. Localization of cellobiose dehydrogenase in cellulose-grown cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**. 21: 214–222.
- Juhász, T., Z. Szengyel, K. Réczey, M. Siika-Aho and L. Viikari. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**. 40: 3519–3525.
- Kang, S. W., Y. S. Park, J. S. Lee, S. I. Hong and S. W. Kim. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 91: 153–156.
- Kansoh, A. L., S. A. Essam and A. N. Zeinat. 1999. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. **Polymer Degradation and Stability**. 63: 273-278.
- Kaparaju, P., M. Serrano, A. B. Thomsen, P. Kongjan and I. Angelidaki. 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**. (Article in press)
- Kaur, P. P., J. S. Arneja and J. Singh. 1998. Enzymic hydrolysis of rice straw by crude cellulase from *Trichoderma reesei*. **Bioresource Technology**. 66: 267-269.
- Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov. 1983. Production of molecular hydrogen in microorganisms. **Advance Biochemistry Engineering Biotechnology**. 28: 139-191.
- Li, D. and H. Chen. 2007. Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**. 32: 1742–1748
- Lin, C. Y. and C. H. Lay. 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative H₂ production by mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**. 29: 41–45.

- Lin, C. Y., Chang C. C. and C. H. Hung. 2008. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. 33: 2445–2453.
- Liu, J. and W. Xia. 2006. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulose. **Biochemical Engineering Journal**. 30: 82–87.
- Lo, Y. C., M. D. Bai, W. M. Chen and J. S. Chang. 2008. Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy. **Bioresource Technology**. 99 : 8299–8303
- Martins, L. F., D. Kolling, M. Camassola, A. J. P. Dillon and L. P. Ramos. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**. 99: 1417–1424.
- Mohan, S. V., V. L. Babu and P. N. Sarma. 2008. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. **Bioresource Technology**. 99: 59–67.
- Olsson, L., T. M. I. E. Christensen, K. P. Hansen and E. A. Palmqvist. 2003. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**. 33: 612–619.
- Panagiotou, G., D. Kekos, B. J. Macris and P. Christakopoulos. 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**. 18: 37-45.

- Pei-Ying, L., W. Liang-Ming, W. Yi-Ru, R. Wei-Jie, H. Chia-Jung, L. Shiue-Lin and C. Jo-Shu. 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. **International Journal of Hydrogen Energy**. 32: 2223–2230.
- QuiZhang, Z. and C. Weimin, 2008. Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. **Biomass and Bioenergy**. 32: 1130- 1135.
- Ren, N. Q., Y. F. Li, A. J. Wang, J. Z. Li, J. Ding and M. Zadsar. 2006. Hydrogen production by fermentation: Review of a new approach to environmentally safe energy production. **Aquatic Ecosystem Health & Management**. 1: 39-42.
- Ruggeri, B., T. Tommasi and G. Sassi. 2009. Experimental kinetics and dynamics of hydrogen production on glucose by hydrogen forming bacteria (HFB) culture. **International Journal of Hydrogen Energy**. 34: 753-763.
- Shin, H. S., Youn J. H. and Kim S. H. 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. **International Journal of Hydrogen Energy**. 29: 1355–1363.
- Silverstein, R. A., Y. Chen, R. R. S. Sharma-Shivappa, M. D. Boyette and J. Osborn. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**. 98: 3000–3011.
- Skomarovsky, A. A., A. V. Markov, A. V. Gusakov, E. G. Kondrat, O. N. Okunev, A. O. Bekkarevich, V. Y. Matys and A. P. Sinitsyn. 2007. New cellulases efficiently hydrolyzing lignocellulose pulp. **Applied Biochemistry and Microbiology**. 42: 592–597.

- Sukumaran, R. K., R. R. Singhanian, G. M. Mathew and A. Pandey. 2009. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**. 34: 421–424.
- Szabo, I. J., G. Johansson and G. Pettersson. 1996. Optimized cellulase production by *Phanerochaete chrysosporium* :control of catabolite repression by fed-batch cultivation. **Journal of Biotechnology**. 48: 221-230.
- Tokuyasu, K., M. Tabuse, M. Miyamoto, J. Matsuki and K. Yoza. 2008. Pretreatment of microcrystalline cellulose flakes with CaCl₂ increases the surface area, and thus improves enzymatic saccharification. **Carbohydrate Research**. 343: 1232–1236.
- Van-Andel, J. G., G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam and A. M. Breure. 1985. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture solvent formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 23: 21–26.
- Van-Wyk, J. P. H. and M. Mohulatsi. 2003. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride*. **Bioresource Technology**. 86: 21–23.
- Wang, J. L. and W. Wan. 2008. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**. 33: 2934–2941.
- _____, _____. 2009. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**. 34: 235-244.
- Wen-Hing, C., S. Sung and S. Chen. 2009. Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor : pH and cyclic duration effects. **International Journal of Hydrogen Energy**. 34 : 227-234.

- Yu, J., J. Zhang, J. He, Z. Liu and Z. Yu. 2009. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**. 100: 903–908
- Zajic, J. E., N. Kosaric and J. D. Brosseau. 1978. Microbial production of hydrogen. **Advance Biochemistry Engineering**. 9: 57-109.
- Zhao, X., F. Peng, K. Cheng and D. Liu. 2009. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane biogases by alkali–peracetic acid pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology**. 44: 17–23.
- Zhu, H. G. and M. Beland. 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**. 31: 1980–1988.
- Zhu, Y. and S. T. Yang. 2004. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. **Journal of Biotechnology**. 110: 143–57.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ไนโตรเจนรวม (total kjeldahl nitrogen; TKN)

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

1.1 สารเคมี

- สารละลาย NaOH เข้มข้น 40 % เตรียมโดยละลาย NaOH 400 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลิตร

- สารละลาย bromocresol green เตรียมโดยละลาย bromocresol green 0.2 กรัม ใน ethyl alcohol 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย methy red โดยละลาย methy red 0.1 กรัม ใน ethyl alcohol 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย boric acid เข้มข้น 4 % ละลาย boric acid 400 กรัม ในน้ำกลั่น 6 ลิตร แล้วนำไปตั้งบน hot plate จนละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ได้ปริมาตร 9 ลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย bromocresol green และสารละลาย methy red ที่ได้เตรียมไว้ ปริมาตร 100 และ 70 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นและเขย่าให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

- เตรียมสารละลาย HCl 0.02 โมล โดยดูดสารละลาย HCl เข้มข้นปริมาตร 1.64 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 วิธีวิเคราะห์

1.2.1 การย่อยตัวอย่าง : โดยนำตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ใน digestion tube เติม K_2SO_4 2 กรัม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.8 กรัม และ ซัลฟูริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร ย่อยนาน 60 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นประมาณ 15 นาที

1.2.2 การกลั่น : โดยเติมน้ำ 70 มิลลิลิตรใน digestion tube ที่ได้จากการย่อย เติม 40 % NaOH ปริมาตร 60 มิลลิลิตร (จากเครื่อง) และเติม 4 % boric acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพูนขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร (erlenmeyer flask) กลั่นนาน 4 นาที และไตเตรทด้วยสารละลาย HCl 0.02 โมล

การคำนวณ

$$\text{total kjeldahl nitrogen (TKN) (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(T-B) \times 14.007 \times [\text{HCl}] \times 1,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

T = ปริมาตรสารละลายที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรสารละลายที่ใช้ไตเตรทแบลนค์ (มิลลิลิตร)

2. การหาปริมาณไฮโดรเจนซัลไฟด์ อัลฟาเซลลูโลส และลิกนิน

2.1 หาปริมาณสารแทรกที่ละลายในสารละลายผสมเอทิลแอลกอฮอล์ และโทลูอีน โดยนำตัวอย่างแห้ง 2 กรัม ใส่ใน cellulose extraction thimble แล้วนำไปสกัดด้วยสารละลายผสมเอทิลแอลกอฮอล์ 2 ส่วน และโทลูอีน 1 ส่วน เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างหลังจากการสกัดอบที่อุณหภูมิ 103.5 องศาเซลเซียส แล้วหาปริมาณสารที่ถูกสกัดออกมาและเก็บตัวอย่างแห้งที่ถูกสกัดไว้เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

2.2 หาปริมาณสารแทรกที่ละลายในน้ำร้อน โดยนำตัวอย่างแห้ง 2 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปกรองด้วย fritted glass crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 103.5 องศาเซลเซียส แล้วหาปริมาณสารที่ถูกสกัดออกมา

2.3 หาปริมาณสัดส่วนลิกนิน โดยนำตัวอย่างแห้งที่ได้จากข้อ 2.1 1 กรัม ใส่ในบีเกอร์ 150 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 72% ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไป

แช่ในน้ำเดือด 4 ชั่วโมง ตัวอย่างไปกรองและล้างด้วย fritted glass crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 103.5 องศาเซลเซียส แล้วหาปริมาณสารที่เหลืออยู่

2.4 หาปริมาณสัดส่วนไฮโดรเซลลูโลส โดยนำตัวอย่างแห้งที่ได้จากข้อ 2.1 2 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร, กรดอะซิติกเย็น 0.2 มิลลิลิตร และ NaClO_2 1 กรัม แล้วนำไปแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 70- 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง โดยเติม กรดอะซิติกเย็น 0.22 มิลลิลิตร และ NaClO_2 1 กรัม ทุกชั่วโมง นำตัวอย่างไปกรองและล้างด้วย fritted glass crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 103.5 องศาเซลเซียส แล้วหาปริมาณสารที่เหลืออยู่และเก็บตัวอย่างแห้งที่ถูกสกัดไว้เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

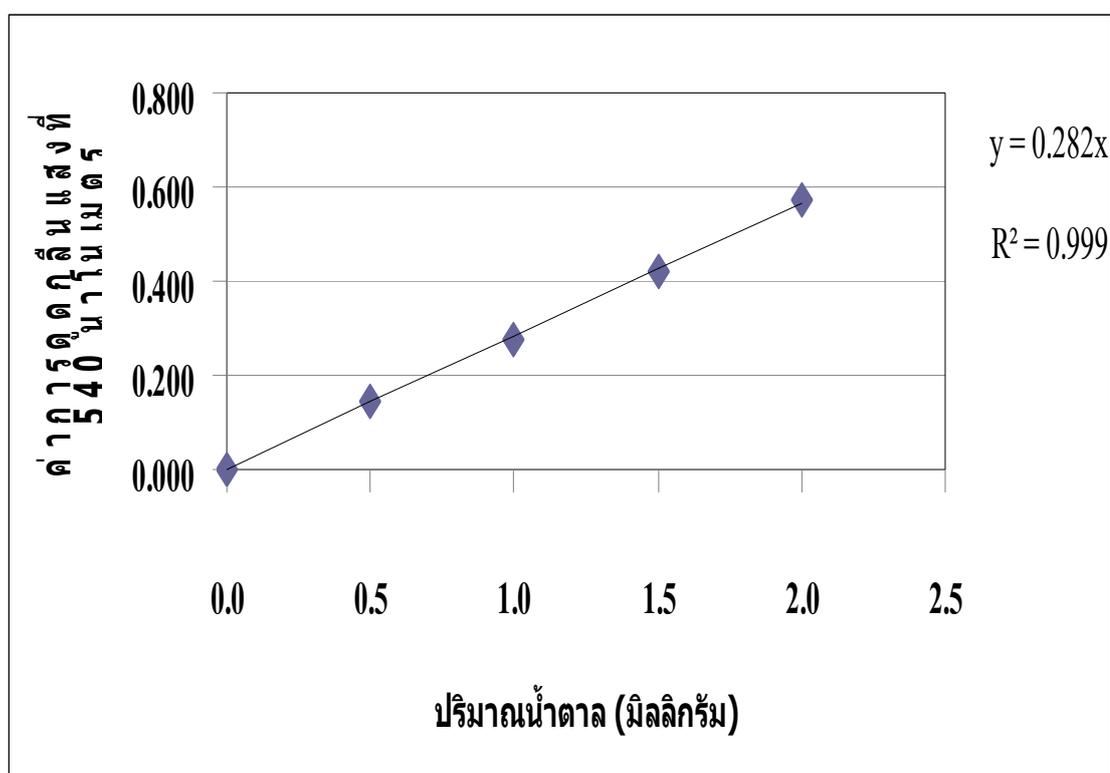
2.5 หาปริมาณสัดส่วนอัลฟาเซลลูโลส โดยนำตัวอย่างแห้งที่ได้จากข้อ 2.4 3 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 17.5% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วคนทันที บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วคนต่อไปอีก 5 นาที นำตัวอย่างไปกรองด้วย fritted glass crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน โดยล้างด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 8.3% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร, กรดอะซิติก เข้มข้น 10% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แล้วอบที่อุณหภูมิ 103.5 องศาเซลเซียส แล้วหาปริมาณสารที่เหลืออยู่

3. การวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

1. นำ crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติม 0.05 sodium citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร. และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0x6.0 ซม. (50 มก.) เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 1 ชั่วโมง
4. เติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้ม ในน้ำเดือด นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. เติมน้ำกลั่นหลอดละ 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 M sodium citrate buffer เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐานเพื่อนำไปใช้คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากสูตรมาตรฐานการคำนวณยูนิตของเอนไซม์เซลลูโลส

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



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร กับปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ (มิลลิกรัม)

ภาคผนวก ข
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักกากตะกอนที่สภาวะสัดส่วนของแข็งที่แตกต่างกันในสภาวะแบบแบบไร้อากาศ พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง

	VFAs (mg/L)									
	hr.	0	24	48	72	96	120	144	168	192
SC 3% (P 0.0%)	AC	2.1	29.2	55.6	65.6	87.4	92.4	90.6	84.8	48.6
	Pr	2.6	0.7	10.0	3.7	10.2	12.7	11.1	14.8	10.9
	Bu	1.1	0.7	6.3	2.2	6.7	8.1	7.5	10.2	7.3
	Va	0.0	0.0	575.7	453.1	291.1	282.6	291.1	388.1	292.9
	AC	1.2	33.1	50.6	72.3	89.1	68.4	98.7	68.8	29.7
SC 3% (P 0.5%)	Pr	1.5	1.2	8.5	7.2	13.1	11.2	13.9	12.2	5.8
	Bu	0.5	0.5	2.3	4.8	11.1	9.5	11.8	9.8	5.3
	Va	0.0	0.0	144.4	976.2	316.7	165.1	313.6	322.6	109.8
	AC	1.6	24.2	54.5	67.5	81.9	97.3	71.5	69.3	43.7
SC 3% (P 1.0%)	Pr	1.4	0.5	9.8	5.3	10.7	11.4	6.7	12.5	12.3
	Bu	0.6	0.6	4.5	4.7	12.8	11.9	8.9	16.3	18.1
	Va	0.0	0.0	419.4	989.9	272.8	136.4	97.7	349.4	414.4
	AC	1.6	24.2	54.5	67.5	81.9	97.3	71.5	69.3	43.7

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักกากตะกอนที่สภาวะสัดส่วนของแข็งที่แตกต่างกันด้วยสภาวะแบบไร้อากาศ พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง

	hr.	VFAs (mg/L)								
		0	24	48	72	96	120	144	168	192
SC 4% (P 0.0%)	AC	1.4	15.1	54.9	83.9	89.8	82.9	57.5	50.9	43.3
	Pr	0.8	0.5	11.5	10.9	12.8	11.7	10.2	10.4	12.1
	Bu	0.5	0.5	4.0	6.2	9.9	9.4	8.4	7.7	9.2
	Va	0.0	0.0	511.3	330.8	445.8	298.4	293.8	2093.5	442.3
SC 4% (P 0.5%)	AC	1.6	33.3	83.0	69.8	75.5	78.3	64.9	63.3	32.8
	Pr	1.2	0.8	5.6	6.0	8.4	12.4	10.6	12.1	9.3
	Bu	0.4	0.4	2.1	3.7	9.4	13.9	12.8	15.2	13.7
	Va	0.0	0.0	0.0	308.5	11.6	302.9	253.8	329.0	305.1
SC 4% (P 1.0%)	AC	1.2	29.9	83.3	75.2	83.8	61.9	53.0	44.0	25.6
	Pr	0.9	1.0	3.4	8.2	11.4	10.1	9.0	7.7	7.4
	Bu	0.3	0.3	0.7	7.9	15.1	13.3	12.5	12.5	14.3
	Va	0.0	0.0	0.0	253.2	431.3	326.1	278.3	285.7	352.4
SC 4% (P 1.5%)	AC	1.6	31.0	67.2	75.0	79.6	55.8	44.8	44.8	42.9
	Pr	1.4	0.7	17.1	7.9	9.7	0.9	8.6	9.9	11.5
	Bu	0.5	0.5	4.5	8.6	14.0	15.9	13.8	16.0	19.6
	Va	0.0	0.0	329.5	1774.0	420.2	420.2	339.5	423.8	573.5

ตารางผนวกที่ ข3 ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักแบบไร้อากาศที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 20 และ 40 พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง

		VFAs (mg/L)								
hr.		0	24	48	72	96	120	144	168	192
CN 10	AC	1.3	19.1	13.3	12.6	24.4	50.2	46.0	60.6	60.6
	Pr	0.8	0.7	1.0	0.7	0.7	0.7	0.6	14.7	6.1
	Bu	0.4	0.5	1.3	0.8	0.8	0.7	0.7	6.3	7.2
	Va	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	779.4	1226.5
CN 20	AC	2.1	10.2	13.2	13.1	34.0	44.3	46.7	56.4	60.0
	Pr	0.6	0.5	8.3	0.7	0.7	0.7	0.6	10.7	12.9
	Bu	0.4	0.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	5.0	6.8
	Va	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	168.9	261.1
CN 40	AC	2.9	10.5	14.0	17.9	72.7	77.5	68.9	67.3	64.3
	Pr	0.7	0.6	3.2	0.6	0.6	0.6	0.6	5.2	14.6
	Bu	0.4	0.3	2.8	0.5	0.5	0.5	0.6	3.4	5.7
	Va	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	109.8	345.0

ตารางผนวกที่ ข4 ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 และ ระยะเวลา 192 ชั่วโมง

		VFAs (mg/L)								
hr.		0	24	48	72	96	120	144	168	192
pH 4	AC	2.33	11.57	17.19	21.43	20.44	32.58	27.17	31.55	51.06
	Pr	0.53	0.69	1.31	0.89	0.82	0.91	0.97	4.06	5.62
	Bu	0.41	0.38	0.92	0.49	0.54	0.48	0.83	3.56	3.73
	Va	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	159.62	221.03
pH 5	AC	2.94	11.36	20.47	18.36	39.45	46.15	61.26	72.39	69.73
	Pr	0.44	0.79	1.21	0.54	0.56	0.65	0.61	3.08	7.59
	Bu	0.32	0.37	1.07	0.42	0.41	0.46	0.60	2.34	6.05
	Va	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	78.10	325.75
pH 6	AC	2.47	40.95	57.68	80.24	72.22	75.03	69.34	58.23	51.23
	Pr	0.56	0.75	0.45	0.63	0.66	0.79	0.72	4.29	4.46
	Bu	0.38	0.40	2.28	14.35	15.88	11.11	8.85	10.64	14.68
	Va	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	105.59	307.75

ตารางผนวกที่ ข5 ปริมาณกรดไขมันระเหยในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆระยะเวลา 192
ชั่วโมง

		VFAs (mg/L)									
		hr.	0	24	48	72	96	120	144	168	192
Yeast Extract	AC	2.7	78.1	116.2	100.9	70.5	84.1	90.0	66.0	56.5	
	Pr	2.8	1.1	3.9	5.4	6.2	9.1	10.9	3.5	9.1	
	Bu	2.0	0.4	1.2	13.7	12.4	22.5	26.6	4.5	21.2	
	Va	0.0	0.0	0.0	380.9	398.7	956.9	1133.4	119.1	3082.6	
NH ₄ Cl	AC	1.6	34.7	39.3	50.5	50.6	50.6	57.2	58.0	46.3	
	Pr	1.7	0.5	3.1	6.1	4.9	8.7	10.9	12.3	5.9	
	Bu	1.1	0.4	0.7	3.5	8.3	8.0	9.4	7.8	5.0	
	Va	0.0	0.0	0.0	0.0	150.0	175.5	234.3	187.3	98.3	
Urea	AC	1.8	33.4	34.0	36.3	41.1	42.1	40.2	47.1	27.5	
	Pr	2.4	0.5	4.3	7.0	4.8	7.2	8.3	9.6	3.2	
	Bu	1.8	0.3	0.9	2.9	5.7	5.4	5.5	3.5	2.2	
	Va	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	86.1	91.3	102.0	286.5	
NH ₄ CO ₃	AC	0.4	28.4	30.8	32.3	29.5	28.5	29.7	30.9	23.8	
	Pr	1.8	1.0	5.5	8.0	6.5	4.1	5.3	3.6	4.0	
	Bu	1.3	0.9	1.8	2.9	5.5	3.2	2.5	1.4	2.2	
	Va	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.4	68.6	97.8	206.2	

ตารางผนวกที่ ข6 ปริมาณกรดไขมันระเหยจากการหมักกากตะกอนที่ปรับสภาพ ไฮโดรไลซิสด้วย เอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมในสภาวะแบบไร้อากาศ ที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 192 ชั่วโมง

	hr.	VFAs (mg/L)								
		0	24	48	72	96	120	144	168	192
Enz+pre+p	AC	2.7	78.1	116.2	100.9	70.5	84.1	90.0	66.0	56.5
	Pr	2.8	1.1	3.9	5.4	6.2	9.1	10.9	3.5	9.1
	Bu	2.0	0.4	1.2	13.7	12.4	22.5	26.6	4.5	21.2
	Va	0.0	0.0	0.0	380.9	398.7	956.9	1133.4	119.1	3082.6
Enz+pre	AC	3.6	56.2	64.8	53.8	46.4	48.7	75.5	77.6	44.7
	Pr	3.7	1.4	3.2	6.6	6.0	5.9	10.3	10.5	6.2
	Bu	3.9	1.4	2.5	16.2	12.7	12.5	23.2	19.3	13.5
	Va	0.0	0.0	0.0	456.9	475.7	490.8	936.2	1081.6	2382.9
Pre	AC	2.9	74.0	71.2	46.9	37.7	51.8	69.9	78.0	53.1
	Pr	3.9	0.9	6.7	7.3	4.5	6.1	8.6	9.4	6.8
	Bu	3.2	0.7	3.0	15.6	10.8	15.1	20.8	22.3	17.9
	Va	0.0	0.0	0.0	456.8	349.8	513.1	734.7	783.7	1990.9
Control	AC	2.2	60.8	75.1	56.5	40.6	37.6	62.5	64.7	44.5
	Pr	3.1	1.1	4.2	11.2	4.3	5.3	10.6	10.6	8.1
	Bu	2.7	0.9	3.6	11.0	15.8	8.4	13.1	13.9	9.8
	Va	0.0	0.0	0.0	365.3	281.6	316.1	515.7	566.4	431.6

ตารางผนวกที่ ข7 พีเอชในการหมักกากตะกอนที่สถานะสัดส่วนของแข็งที่แตกต่างกันด้วยสภาวะ
แบบไร้อากาศ พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง

เวลา (hr)	พีเอช						
	SC 3% (P	SC 3% (P	SC 3% (P	SC 4% (P	SC 4% (P	SC 4% (P	SC 4% (P
	0.0%)	0.5%)	1.0%)	0.0%)	0.5%)	1.0%)	1.5%)
0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
24	5.1	5.1	5.1	5.1	5.0	5.0	5.2
48	6.0	5.6	5.5	6.2	5.2	5.0	5.3
72	7.5	6.8	6.4	7.1	5.8	5.9	7.0
96	6.3	6.4	6.1	7.1	7.1	7.1	7.0
120	6.2	6.1	6.0	6.9	7.1	7.0	6.9
144	6.0	5.7	5.8	7.0	7.0	7.0	6.8
168	5.9	5.5	5.5	6.9	6.7	6.8	6.3
192	5.9	5.5	5.5	7.0	6.4	6.6	6.1
216	6.0	5.6	5.6	7.2	5.9	6.1	5.5
240	6.0	5.6	5.6	7.2	5.9	6.1	5.5

ตารางผนวกที่ ข8 พีเอชในการหมักแบบไร้อากาศที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 20 และ 40 พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง

เวลา (hr)	พีเอช		
	C:N ratio 10	C:N ratio 20	C:N ratio 40
0	5.0	5.0	5.0
24	5.2	5.0	5.0
48	5.2	5.2	5.1
72	4.9	5.0	5.0
96	6.0	6.2	7.1
120	6.3	6.5	7.1
144	6.8	6.3	6.9
168	7.2	6.9	7.0
192	7.1	7.0	7.1
216	7.2	6.9	7.0
240	7.2	6.9	7.0

ตารางผนวกที่ ข9 พีเอชในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4 5 และ 6 ระยะเวลา 240 ชั่วโมง

เวลา (hr)	พีเอช		
	pH 4	pH 5	pH 6
0	4.0	5.0	6.0
24	3.9	4.9	6.1
48	3.8	4.9	6.5
72	4.6	5.0	7.6
96	4.7	6.7	7.4
120	5.5	7.3	7.5
144	5.7	7.5	7.3
168	6.0	7.4	7.4
192	6.9	7.3	7.4
216	7.0	7.1	7.2
240	7.0	7.1	7.2

ตารางผนวกที่ ข10 พีเอชในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆระยะเวลา 240 ชั่วโมง

เวลา (hr)	พีเอช			
	Yeast Extract	NH ₄ Cl	Urea	NH ₄ CO ₃
0	6.0	6.0	6.0	6.0
24	7.6	7.5	7.7	7.5
48	7.3	7.8	7.8	7.7
72	7.0	7.2	7.3	7.2
96	7.4	7.4	7.6	7.7
120	7.2	7.2	7.5	7.1
144	7.3	7.1	7.3	7.2
168	6.9	6.9	7.1	7.1
192	7.3	7.6	7.6	7.5
216	7.4	7.5	7.7	7.0
240	7.4	7.5	7.7	7.0

ตารางผนวกที่ ข11 พิเษจากการหมักกากตะกอนที่ปรับสภาพ ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมในสภาวะแบบไร้อากาศ ที่พิเษ 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง

เวลา (hr)	พิเษ			
	pre+enz+p	pre+enz	pre	control
0	6.0	6.0	6.0	6.0
24	7.6	7.7	7.5	7.2
48	7.3	7.2	7.5	7.3
72	7.0	7.1	7.2	7.1
96	7.4	7.5	7.5	7.4
120	7.2	7.1	7.4	7.1
144	7.3	7.1	7.4	7.3
168	6.9	7.0	7.1	7.0
192	7.3	7.5	7.2	7.3
216	7.4	7.3	7.0	7.0
240	7.4	7.3	7.0	7.0

ตารางผนวกที่ ข13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในการหมักแบบไร้อากาศที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 10 20 และ 40 พีเอช 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง

เวลา (hr)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/L)		
	C:N ratio 10	C:N ratio 20	C:N ratio 40
0	1235.495	1276.451	1303.754
24	163.823	109.215	150.171
48	6.826	13.652	6.826
72	6.826	6.826	6.826
96	6.826	6.826	6.826
120	6.826	6.826	6.826
144	6.826	6.826	6.826
168	6.826	6.826	6.826
192	6.826	6.826	6.826
216	6.826	6.826	6.826
240	6.826	6.826	6.826

ตารางผนวกที่ ข14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่
อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4 5 และ 6 ระยะเวลา 240 ชั่วโมง

เวลา (hr)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/L)		
	pH 4	pH 5	pH 6
0	1331.058	1255.973	1262.799
24	136.519	116.041	61.433
48	13.652	13.652	13.652
72	6.826	6.826	6.826
96	6.826	6.826	6.826
120	6.826	6.826	6.826
144	6.826	6.826	6.826
168	6.826	6.826	6.826
192	6.826	6.826	6.826
216	6.826	6.826	6.826
240	6.826	6.826	6.826

ตารางผนวกที่ ข15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในการหมักแบบไร้อากาศจากการหมักกากตะกอนที่
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆระยะเวลา 240
ชั่วโมง

เวลา (hr)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/L)			
	Yeast Extract	NH ₄ Cl	Urea	NH ₄ CO ₃
0	1194.539	1235.495	1310.580	1249.147
24	143.345	122.867	129.693	170.648
48	13.652	6.826	6.826	13.652
72	6.826	6.826	6.826	6.826
96	6.826	6.826	6.826	6.826
120	6.826	6.826	6.826	6.826
144	6.826	6.826	6.826	6.826
168	6.826	6.826	6.826	6.826
192	6.826	6.826	6.826	6.826
216	6.826	6.826	6.826	6.826
240	6.826	6.826	6.826	6.826

ตารางผนวกที่ ข16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักกากตะกอนที่ปรับสภาพ ไฮโดรไลซิสด้วย เอนไซม์และการใช้กระดาษร่วมในสภาวะแบบไร้อากาศ ที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 240 ชั่วโมง

เวลา (hr)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/L)			
	pre+enz+p	pre+enz	pre	control
0	1194.539	696.246	27.304	13.652
24	143.345	61.433	6.826	6.826
48	13.652	6.826	6.826	6.826
72	6.826	6.826	6.826	6.826
96	6.826	6.826	6.826	6.826
120	6.826	6.826	6.826	6.826
144	6.826	6.826	6.826	6.826
168	6.826	6.826	6.826	6.826
192	6.826	6.826	6.826	6.826
216	6.826	6.826	6.826	6.826
240	6.826	6.826	6.826	6.826

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายศุภ โโชค ตาปนานนท์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	16 มกราคม 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ส.บ. (อาชีวอนามัยและความปลอดภัย) มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการสมาคม วิศวกรรมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 10 ณ มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ วิจัย ครั้งที่ 2 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-