



การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและชุมชน



อัญชลีภรณ์ ศรีษะธาดู

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพลังงานทดแทน  
ปีการศึกษา 2565  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและชุมชน



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพลังงานทดแทน  
ปีการศึกษา 2565  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ  
เพื่อใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและชุมชน"  
ของ อัญชลีภรณ์ ศรีษะธาตุ  
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพลังงานทดแทน

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์  
(ดร.นงศ์ ชลคุป)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิสิษฐ์ มณีโชติ)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฤทธิชาติ อากกล้า)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สหัสยา ทองสาร)

**อนุมัติ**

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

<b>ชื่อเรื่อง</b>	การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและชุมชน
<b>ผู้วิจัย</b>	อัญชลีภรณ์ ศรีษะธาตุ
<b>ประธานที่ปรึกษา</b>	รองศาสตราจารย์ ดร.พิสิษฐ มณีโชติ
<b>กรรมการที่ปรึกษา</b>	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฤทธิ์ชาติ อากกล้า
<b>ประเภทสารนิพนธ์</b>	วิทยานิพนธ์ วท.ม. พลังงานทดแทน, มหาวิทยาลัยนครสวรรค์, 2565
<b>คำสำคัญ</b>	การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน, ก๊าซชีวภาพ, ของเหลวในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง, แบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสไลติก, ฟางข้าว

### บทคัดย่อ

ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรพบได้ทั่วทุกภาคในประเทศไทย และสามารถนำมาผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อลดการพึ่งพาทรัพยากรฟอสซิล โดยในงานวิจัยนี้ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของฟางข้าวด้วยกระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน สำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพ และแยกแบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสไลติกที่ชอบอุณหภูมิสูง สำหรับการย่อยสลายทางชีวภาพจากตัวอย่างดินที่เก็บจากป่าสงวนแห่งชาติดงฮั่น และป่ากกสูง บริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด ในประเทศไทย นำมาทดสอบเอนไซม์เซลลูเลส และลิกนินโนโลติกใช้วิธีทางจุลชีววิทยามาตรฐาน จากนั้นใช้ไอโซเลทที่มีกิจกรรมเซลลูโลสไลติกและลิกนินโนโลติกที่สูงในการย่อยสลายฟางข้าวที่อุณหภูมิ  $50 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  เก็บตัวอย่างแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้ทั้งหมด 106 ตัวอย่างจากดิน โดยสามารถแยกไปทดสอบผลของกิจกรรมเซลลูโลสไลติก และลิกนินโนโลติก ไอโซเลท 96 คิดเป็น 90.6 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท 16 คิดเป็น 15.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่พบกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดส ซึ่งแตกต่างจากแลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสโดยพบว่าไอโซเลท RUF60 แสดงกิจกรรมเซลลูโลสไลติกและลิกนินโนโลติกสูง จากนั้นนำน้ำตาลที่ย่อยสลายได้จากฟางข้าวมาผลิตก๊าซชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน เต็มจุลินทรีย์ของเหลวในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องลงในบ่อหมักขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร ที่อุณหภูมิ  $39 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วัน บันทึกผลการทดลองพบว่าที่เวลาในการหมัก 15 วัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า  $p < 0.05$  ผลการทดลองพบว่าในวันที่ 1 สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้สูงที่สุด 4,633.84 มิลลิลิตร/วัน ในการผลิตก๊าซมีเทนวันที่ 20 สามารถผลิตก๊าซมีเทนได้สูงสุด 1,779.30 มิลลิลิตร และวันที่ 15 สามารถผลิตก๊าซมีเทนได้ 1,717.21 มิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า  $p > 0.05$  จึงทำให้ระยะเวลาการผลิตก๊าซชีวภาพ 15 วัน เป็นระยะเวลาการย่อยสลายที่เหมาะสมที่สุดด้วยแบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสไลติกช่วงเทอร์โมฟิลิก โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาของเหลวในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ และลดระยะเวลาการผลิตก๊าซชีวภาพได้

<b>Title</b>	INCREASING THE EFFICIENCY OF BIOGAS PRODUCTION FOR USE IN INDUSTRIAL PLANTS AND COMMUNITIES
<b>Author</b>	Anchaleepon Seesatat
<b>Advisor</b>	Associate Professor Pisit Maneechot, Ph.D.
<b>Co-Advisor</b>	Assistant Professor Ritchard Artkla, Ph.D.
<b>Academic Paper</b>	M.S. Thesis in Renewable Energy, Naresuan University, 2022
<b>Keywords</b>	Anaerobic digestion, biogas, Rumen fluid, lignocellulolytic bacteria, rice straw

### ABSTRACT

Rice straw, a common agricultural residue, is abundant in Thailand and can be converted to biogas to reduce dependence on fossil resources for energy. Biological degradation of rice straw followed by anaerobic digestion for biomethane production was investigated. Thermophilic lignocellulolytic bacteria for biological degradation were isolated from soil samples collected from Dong Han and Kok Soong National Forest around Roi-Et Rajabhat University, Roi-Et Province, Thailand. Cellulase and ligninolytic enzymes were assayed using standard microbiological methods. Isolate(s) with high cellulolytic and ligninolytic activities were then used to degrade rice straw in basal medium at  $50 \pm 2$  °C. A total of 106 thermophilic bacterial isolates were sampled from soil, out of which 96 (90.6%) and 16 (15.1%) isolates tested positive for cellulolytic and ligninolytic activities, respectively. Unlike laccase and manganese peroxidase, lignin peroxidase activity was not detected. Isolate RUF60 showed both high cellulolytic and ligninolytic activities. Total broth was anaerobically digested with rumen microorganisms in 1.2-m<sup>3</sup> digester at  $39 \pm 0.5$  °C for 30 days. Rice straw degraded for 15 days recorded significantly  $p < 0.05$  higher biogas yield of 4,633.84 mL/day on day 1. Maximum methane yield 1,779.30 mL was recorded from 20 days degraded rice straw which was not significantly  $p > 0.05$  different from that 1717.21 mL recorded from 15 days degraded rice straw. Optimal degradation period of 15 days with thermophilic lignocellulolytic bacteria was efficient and economical for from rice straw.

## ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ รศ. ดร.พิสิษฐ มณีโชติ ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุทิศส่ำห้สละเวลาอันมีค่ามาเป็นทีปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ อันประกอบไปด้วย ผศ. ดร.ฤทธิชาติ อาจกล่ำ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

กราบขอบพระคุณ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์มอบทุนการศึกษาผู้ช่วยวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม ระดับปริญญาโท ขอบพระคุณ ผศ. ดร.สุรชัย รัตนสุข อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับการให้ความรู้ด้านการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียจากดิน และอุปกรณ์ เครื่องมือวิจัยในการทำวิจัย เพื่อให้ศึกษา ทดลอง จนสามารถทำให้งงานวิจัยประสบความสำเร็จได้ ขอบพระคุณ ผศ. ดร.คณิน บรรณกิจ อาจารย์ประจำสาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับจุลินทรีย์ในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง และช่วยกำกับดูแลให้การวิจัยเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ขอบพระคุณ บริษัท เซโต ประเทศไทย จำกัด ที่ได้ให้ค่างามอนุเคราะห์ช่วยสนับสนุนป่อหมักขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร ในการทำวิจัยครั้งนี้

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้งกำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแต่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวในระดับชุมชน อุตสาหกรรม และผู้ที่สนใจไม่มากนักน้อย

อัญชลีภรณ์ ศรีษะธาตุ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ง
ประกาศคุณูปการ .....	จ
สารบัญ .....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ .....	ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของปัญหา.....	1
1.2 จุดมุ่งหมายของการศึกษา .....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย .....	3
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
1.5 สมมติฐานของการวิจัย.....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ก๊าซชีวภาพ .....	5
2.2 องค์ประกอบก๊าซชีวภาพ .....	6
2.3 กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ .....	7
2.4 แบบที่เรียในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ.....	8
2.5 ปัจจัยการผลิตก๊าซชีวภาพ.....	9
2.6 ระบบผลิตก๊าซชีวภาพในปัจจุบัน .....	11
2.7 วัตถุดิบฟางข้าว .....	12

2.8 จุลินทรีย์จากดิน.....	17
2.9 ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง .....	28
2.10 การกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายด้วยตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย .....	35
3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินสำหรับใช้ย่อยสลายฟางข้าว.....	35
3.2 การหมักก๊าซชีวภาพ .....	37
3.3 การวิเคราะห์ผล .....	40
บทที่ 4 ผลการวิจัย .....	42
4.1 การแยกตัวของแบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสติกที่ชอบอุณหภูมิสูง.....	42
4.2 การย่อยสลายฟางข้าวด้วยแบคทีเรียไอโซเลท.....	45
4.3 การผลิตก๊าซชีวภาพ.....	48
4.4 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักของฟางข้าว .....	50
บทที่ 5 บทสรุป .....	52
บรรณานุกรม .....	54
ภาคผนวก.....	62
ภาคผนวก ก .....	63
ภาคผนวก ข .....	72
ภาคผนวก ค .....	75
ประวัติผู้วิจัย .....	78



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ.....	6
ตาราง 2 แสดงการย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส (สมรัักษ์ พันธุ์ผล, 2535).....	21
ตาราง 3 แสดงแบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายให้เกิดมีเทนซึ่งใช้สำหรับกระบวนการไฮโดรไลซิสสาร ป้อนอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่.....	30
ตาราง 4 แสดงแบคทีเรียที่ย่อยสลายให้เกิดมีเทนสำหรับสารมัธยันตร์ที่เกิดจาก กระบวนการ อะซิโดเจเนเนซิส และกระบวนการอะซิโตเจเนเนซิส .....	31
ตาราง 5 แสดงการแยกแบททีเรียด้วยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูโลสไลติก และ ลิกนินไ ติก .....	43
ตาราง 5 (ต่อ).....	44
ตาราง 6 แสดงการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสไลติก และลิกนินไติกของแบคทีเรีย ไอโซ เลท.....	44
ตาราง 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักของฟางข้าวในกระบวนการย่อยสลาย ทางชีวภาพ.....	51

## สารบัญภาพ

### หน้า

ภาพ 1 แสดงกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน .....	8
ภาพ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของเซลลูโลสในวัตถุดิบฟางข้าว .....	13
ภาพ 3 แสดงการปรับสภาพโครงสร้างลิกนินออกจากเซลลูโลส .....	15
ภาพ 4 แสดงกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเซลลูโลสไลติกเอนไซม์ (Valdeir Arantes et al., 2010) .....	16
ภาพ 5 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลส .....	19
ภาพ 6 แสดงการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส .....	22
ภาพ 7 แสดงการย่อย และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส .....	23
ภาพ 8 แสดงบ่อหมักก๊าซชีวภาพขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร .....	40
ภาพ 9 แสดงผลที่เกิดขึ้นของความเข้มข้นฟางข้าวต่อกิจกรรมการแยกสาร RUF60 .....	46
ภาพ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า pH ต่อเวลาในการหมักก๊าซชีวภาพ .....	47
ภาพ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า TVFA ต่อเวลาในการหมักก๊าซชีวภาพ .....	47
ภาพ 12 แสดงการผลิตก๊าซชีวภาพจากการย่อยสลายฟางข้าว และกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 30 วัน .....	49
ภาพ 13 แสดงผลผลิตก๊าซมีเทนจากฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพและกลุ่มควบคุม .....	50
ภาพ 14 แสดงการเตรียมตัวอย่างดินเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย .....	64
ภาพ 15 แสดงการการคัดแยกแบคทีเรียจากดิน .....	64
ภาพ 16 แสดงการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง .....	65
ภาพ 17 แสดงการย่อยสลายฟางข้าวจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน .....	65

ภาพ 18	แสดงการเก็บตัวอย่างของเหลวจากการย่อยสลายฟางข้าวเพื่อนำไปวิเคราะห์	66
ภาพ 19	แสดงการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลจากการย่อยสลายฟางข้าวจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน	66
ภาพ 20	แสดงการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลจากการย่อยสลายฟางข้าว	67
ภาพ 21	แสดงการเก็บแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยเลี้ยงในอาหารเหลว LB สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	67
ภาพ 22	แสดงบ่อหมักก๊าซชีวภาพที่ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท เซโต ประเทศไทย จำกัด	68
ภาพ 23	แสดงการลงพื้นที่หมักก๊าซชีวภาพ	68
ภาพ 24	แสดงการย่อยสลายฟางข้าวเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ	69
ภาพ 25	แสดงการเก็บตัวอย่างของเหลวจากการย่อยสลายฟางข้าวในแต่ละวัน	69
ภาพ 26	อาจารย์ลงพื้นที่ดูกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ	70
ภาพ 27	แสดงการวัดปริมาณก๊าซมีเทนที่เก็บจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพ	71
ภาพ 28	อาจารย์ร่วมเสนอแนะแนวทางในการทำการวิจัย	71

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาของปัญหา

ปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย ซึ่งสังเกตได้จากระดับมลพิษในฝุ่นละอองขนาดเล็กมากมีขนาด 2.5 ไมครอน (PM2.5) ซึ่งมีระดับความเข้มข้นเกินค่ามาตรฐานของประเทศไทยที่อนุญาตให้ระดับมลพิษสูงกว่าค่ามาตรฐานขององค์การอนามัยโลกถึง 2 เท่า โดยมีสาเหตุมาจากการเผาไหม้ในที่โล่ง อาทิ หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรชาวนาจะทำการเผาไถนา ทำให้เกิดฝุ่นละออง PM 2.5 สูงถึง 30 - 40 เปอร์เซ็นต์ สำหรับประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการทำการเกษตรจำนวนมาก นั่นคือการทำนาหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตนาข้าวจะเหลือฟางข้าวหรือที่เรียกว่า ชีวมวล (Biomass) ส่วนมากเกษตรกรเลือกใช้วิธีการเผาที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดฝุ่นละออง ส่งผลกระทบต่ออากาศทำให้เกิดมลพิษทางอากาศเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน การแก้ไขปัญหามลพิษจากการเผาฟางข้าว คือสามารถนำฟางข้าวมาใช้เป็นวัตถุดิบชีวมวลสำหรับผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ โดยชีวมวลเหล่านี้มีแหล่งของคาร์บอนเป็นแกนหลักของโมเลกุล เชื่อมต่อกับไฮโดรเจนอะตอมก่อให้เกิดอัลเคนสายสั้นมีคาร์บอนอะตอมไม่เกิน 4 อะตอม หรือ  $C_1 - C_2$  ซึ่งสารประกอบนี้สามารถเผาไหม้ในอากาศได้อย่างสมบูรณ์ให้พลังงานความร้อนเทียบเท่ากับการเผาไหม้พลังงานจากฟอสซิล (Murphy, McKeogh และ Kiely, 2004) และมีศักยภาพนำมาผลิตก๊าซชีวภาพ (Biogas) คือก๊าซที่เกิดจากกระบวนการหมักสารอินทรีย์ ภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic digestion) กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพนั้นเป็นกระบวนการทางธรรมชาติที่อาศัยการทำงานของจุลินทรีย์จำพวกที่ไม่ชอบออกซิเจน (Microorganism) โดยจุลินทรีย์ประเภทสร้างมีเทนนี้จะใช้สารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนเป็นสารอาหาร และให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นก๊าซมีเทน (สูตรโมเลกุล  $CH_4$ ) ประมาณ 60 – 70 เปอร์เซ็นต์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (สูตรโมเลกุล  $CO_2$ ) 28 – 38 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์รองคือ ก๊าซไนโตรเจน ( $N_2$ ) ก๊าซไฮโดรเจน ( $H_2$ ) ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $H_2S$ ) และก๊าซออกซิเจน ( $O_2$ ) ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (อภิชาติ ศรีภัย, 2555)

วัตถุดิบชีวมวลที่สนใจนำมาผลิตก๊าซชีวภาพ คือ ฟางข้าว (Rice straw) เป็นวัตถุดิบที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวของเกษตรกรที่มีอยู่จำนวนมากในปัจจุบัน จึงนับได้ว่าเป็นแหล่งวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ ฟางข้าวมีองค์ประกอบทางเคมีที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นอาหารของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

แบบไม่ใช้ออกซิเจน แต่โดยทั่วไปการนำฟางข้าวมาผลิตก๊าซชีวภาพใช้ระยะเวลาการย่อยสลาย (Hydraulic Retention Time, HRT) นานกว่า 20 วัน และเกิดปฏิกิริยาได้ยากในกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพ เนื่องจากฟางข้าวมีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกจุลินทรีย์จากดิน เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้ในระยะเวลาอันสั้น มีช่วงวงจรชีวิตที่แน่นอน และสามารถควบคุมสภาวะการเจริญเติบโตได้อย่างคงที่ในการนำไปใช้สำหรับย่อยสลายฟางข้าวเป็นน้ำตาล (Cardinale, et al., 2011) ก่อนการนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อลดระยะเวลาการผลิตก๊าซชีวภาพ และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Rumen fluid) สำหรับเร่งปฏิกิริยาในการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว ในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจะเกิดกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile Fatty acids, VFAs) เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดโพรไพโอนิก และกรดฟอร์มิก ซึ่งถ้าหากมีความเข้มข้นเกินกว่า 2,000 mg/L เมทาโนเจนไม่สามารถกำจัดไฮโดรเจนและกรดอินทรีย์ระเหยง่ายได้ จะทำให้ค่า pH ลดต่ำลงจนระบบผลิตก๊าซชีวภาพดำเนินต่อไปไม่ได้ งานวิจัยนี้จึงสนใจเตรียมฟางข้าว โดยวิธีย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินให้ได้ของเหลวที่เป็นน้ำตาลก่อนนำไปผลิตก๊าซชีวภาพในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยสามารถเพิ่มปริมาณก๊าซชีวภาพให้สูงขึ้น ซึ่งในระหว่างการหมักก๊าซชีวภาพจะเกิดสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่ส่งผลให้ค่า pH ของการผลิตก๊าซชีวภาพในบ่อหมักต่ำลง การกำจัดสารอินทรีย์ระเหยง่ายจะใช้ตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ที่จะช่วยปรับสภาพความเป็นกรด-เบสในบ่อหมัก (Artkla, Grisdanurak, Neramittagapong และ Wittayakun, 2008) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ หลังจากทดลองในระดับห้องปฏิบัติการขั้นตอนต่อไปเป็นการนำผลการทดลองที่ได้มาหมักโดยการขยายบ่อหมักก๊าซชีวภาพเป็นขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร ที่ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท เซโต (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งเป็นบริษัทผู้ร่วมให้ทุนในการทดลองงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อทดสอบการผลิตก๊าซชีวภาพสำหรับวิเคราะห์ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ และเพื่อส่งเสริมในการนำไปใช้งานทั้งในระดับชุมชนและอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.2 จุดมุ่งหมายของการศึกษา

- 1) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวที่ย่อยด้วยจุลินทรีย์จากดิน
- 2) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง
- 3) เพื่อเพิ่มควมบริสุทธิ์ของก๊าซชีวภาพโดยการกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายด้วยตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายฟางข้าวด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน โดยตัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินในป่าสงวนดงฮั่น และป่ากกสูง บริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด สำหรับใช้เป็นจุลินทรีย์ย่อยสลายฟางข้าวให้ได้น้ำตาลก่อนนำไปหมักก๊าซชีวภาพ
- 2) ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยผลิตก๊าซชีวภาพน้ำตาลที่ย่อยได้จากฟางข้าวด้วยจุลินทรีย์จากดินในบ่อหมักขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร
- 3) ศึกษากระบวนการกำจัดกรดไขมันระเหยง่าย โดยเพิ่มตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  เพื่อให้กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพสามารถดำเนินต่อไปได้
- 4) ศึกษาวิเคราะห์ก๊าซชีวภาพที่ได้จากกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC, Agilent Technologies 7820A)

## 1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง หมายถึง ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพใช้สำหรับเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพ หมายถึง ก๊าซที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

กรดไขมันระเหยง่าย หมายถึง กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดโพรไพโอนิก เป็นตัวกลางสำคัญในระบบหมักแบบสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน มีความสัมพันธ์กับการใช้ไฮโดรเจนของเมทาโนจีนิคแบคทีเรีย

### 1.5 สมมติฐานของการวิจัย

การผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์แยกได้จากดินให้ได้ของเหลวเป็นน้ำตาลก่อนนำไปหมักก๊าซชีวภาพในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพทำให้ลดระยะเวลาการหมักก๊าซชีวภาพได้ และใช้ตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  สำหรับกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายที่มีผลต่อการยับยั้งกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ

### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์จากดินสำหรับย่อยสลายฟางข้าว เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลก่อนนำไปหมักก๊าซชีวภาพได้
- 2) สามารถนำของเหลวชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพได้
- 3) สามารถใช้ตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ในการกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายได้ เพื่อควบคุมกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ
- 4) ได้ผลงานวิจัยสำหรับตีพิมพ์เผยแพร่ในรูปแบบต่างๆ ทั้งในระดับชาติและนานาชาติ อย่างน้อย 1 เรื่อง

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิธีการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว โดยการย่อยสลายฟางข้าวด้วยจุลินทรีย์จากดินให้ได้ของเหลวเป็นน้ำตาลก่อนนำไปหมักก๊าซชีวภาพ เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง และกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายด้วยตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ผู้ศึกษาได้ค้นคว้าทฤษฎีงานวิจัย และหลักการที่เกี่ยวข้องจากเอกสาร ตำรา หนังสือ บทความทางวิชาการทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งมีแนวคิดที่ช่วยสนับสนุนสำหรับเป็นแนวทางในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ โดยจัดเป็นหัวข้อตามลำดับดังต่อไปนี้

- 2.1 ก๊าซชีวภาพ
- 2.2 องค์ประกอบก๊าซชีวภาพ
- 2.3 กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ
- 2.4 แบบที่เรียในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ
- 2.5 ปัจจัยการผลิตก๊าซชีวภาพ
- 2.6 ระบบผลิตก๊าซชีวภาพในปัจจุบัน
- 2.7 วัตถุดิบฟางข้าว
- 2.8 จุลินทรีย์จากดิน
- 2.9 ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง
- 2.10 การกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายด้วยตัวดูดซับ

#### 2.1 ก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพ คือ ก๊าซที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน โดยทั่วไปจะหมายถึงก๊าซมีเทนที่เกิดจากการหมักของอินทรีย์วัตถุที่เป็นชีวมวล เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย มูลสัตว์ เศษที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตร เศษอาหาร และกากน้ำตาล ก๊าซชีวภาพประกอบด้วยก๊าซหลายชนิดที่เกิดจากกระบวนการหมัก จะมีก๊าซเกิดขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ในสภาวะการหมักก๊าซชีวภาพ ได้แก่ ก๊าซมีเทน (สูตรโมเลกุล CH<sub>4</sub>) ประมาณ 60 -70 เปอร์เซ็นต์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (สูตรโมเลกุล CO<sub>2</sub>) ประมาณ 28 – 38 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซชนิดอื่นๆ เช่น ก๊าซไฮโดรเจน (สูตรโมเลกุล H<sub>2</sub>), ก๊าซออกซิเจน (สูตรโมเลกุล O<sub>2</sub>), ก๊าซไนโตรเจน (สูตรโมเลกุล N<sub>2</sub>) และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์



(สูตรโมเลกุล  $H_2S$ ) ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของก๊าซชีวภาพที่สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ เพื่อลดการใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีอยู่อย่างจำกัดในปัจจุบันเพราะการคาดการณ์ว่าพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลจะหมดลงไปในอนาคตอันใกล้นี้ จึงหันมาใช้พลังงานทดแทนมากยิ่งขึ้นเป็นการช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Babel, Sae-Tang and Pecharaply, 2009) โดยมีคุณสมบัติ ดังนี้ ค่าความร้อนประมาณ 21 เมกกะจูลต่อลูกบาศก์เมตร ความเร็วเปลวไฟ 25 เซนติเมตรต่ออนาที อุณหภูมิเผาไหม้ในอากาศ 650 องศาเซลเซียส อุณหภูมิจุดติดไฟ 600 องศาเซลเซียส ค่าความจุความร้อน 1.6 กิโลจูลต่อลูกบาศก์เมตรต่อองศาเซลเซียส และความหนาแน่น 1.15 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร คุณสมบัติของก๊าซชีวภาพสามารถนำไปใช้งานได้หลายด้าน ได้แก่ ด้านเกษตรกรรม คือผลผลิตต่อไร่ที่สูงขึ้นจากการใช้ปุ๋ยชีวภาพ ด้านพลังงาน คือลดการซื้อก๊าซหุงต้ม ด้านสิ่งแวดล้อม คือลดปริมาณก๊าซเรือนกระจก และลดมลพิษทางอากาศที่เป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน (อภิชาติ ศรีภักย์, 2555)

## 2.2 องค์ประกอบก๊าซชีวภาพ

ก๊าซชีวภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงได้จะต้องมีก๊าซมีเทนเป็นองค์ประกอบไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ก๊าซชีวภาพที่เกิดจากกระบวนการหมักจะมีปริมาณก๊าซชีวภาพที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ และสภาวะของการหมักก๊าซชีวภาพ โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบของก๊าซชีวภาพมีรายละเอียด ดังตาราง 1 (Polprasert, Dan และThayalakumaran, 1996)

ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบของก๊าซชีวภาพ

ชนิด	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
ก๊าซมีเทน ( $CH_4$ )	60 - 70
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ )	28 - 38
ก๊าซไฮโดรเจน ( $H_2$ )	2
ก๊าซออกซิเจน ( $O_2$ )	
ก๊าซไนโตรเจน ( $N_2$ )	
ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $H_2S$ )	

## 2.3 กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ

กระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ มีการย่อยสลายสารอินทรีย์ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน (วิจิตรเสถียร และราโช, 2557) ดังนี้

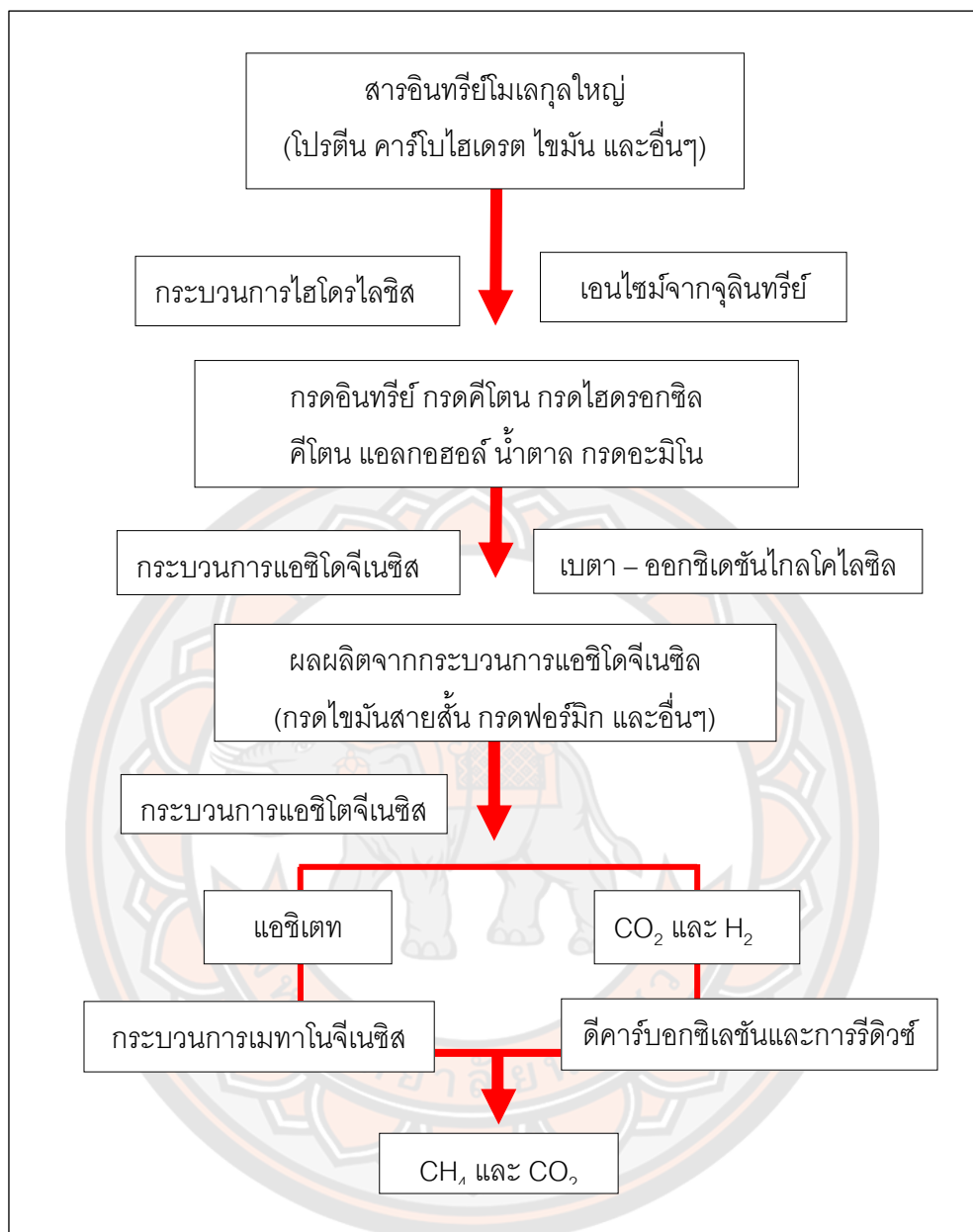
2.3.1 กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดเล็ก โดยกลุ่มแบคทีเรียไฮโดรไลติก (Hydrolytic Bacteria) เช่น คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) โปรตีน (Protein) และไขมัน (Lipid) เป็นต้น ส่งผลให้สารอินทรีย์มีโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาล น้ำตาล (glucose) กรดอะมิโน (Amino acid) และกรดไขมัน (Fatty acid)

2.3.2 กระบวนการอะซิโดเจเนซิส (Acidogenesis) เป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการแรก โดยกลุ่มแบคทีเรียอะซิโดจีนิก (Acidogenic Bacteria) สามารถนำไปใช้ผลิตกรดไขมันระเหยง่าย เช่น กรดอะซิติก (Acetic Acid) กรดโพรพิโอนิก (Propionic Acid) และกรดบิวทริก (Butyric Acid) เป็นต้น ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และมีคาร์บอนอะตอมไม่เกิน 5 ตัว

2.3.3 กระบวนการอะซิโดเจเนซิส (Acetogenesis) เป็นกรดไขมันระเหยง่ายที่ได้จากกระบวนการสร้างกรดจะถูกกลุ่มแบคทีเรียอะซิโตจีนิก (Acetogenic Bacteria) เปลี่ยนให้เป็นกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างก๊าซชีวภาพปฏิกิริยานี้มีความสำคัญ เนื่องจากการลดการสะสมของกรดไขมันระเหยง่าย ซึ่งการสะสมของกรดไขมันระเหยง่ายในปริมาณสูง จะส่งผลให้ค่า pH มีความเป็นกรดมากขึ้น จึงสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างก๊าซชีวภาพได้

2.3.4 กระบวนการเมทาโนเจเนซิส (Methanogenesis) เป็นกรดที่ได้จากกระบวนการสร้างกรดอะซิติกจากกรดไขมันระเหยง่าย โดยเฉพาะกรดอะซิติกจะถูกกลุ่มแบคทีเรียเมทาโนจีนิก (Acetotrophic Bacteria) เปลี่ยนให้เป็นก๊าซมีเทนได้

เนื่องจากแบคทีเรียที่เป็นตัวสร้างก๊าซมีเทนเจริญเติบโตได้ช้า และสภาพแวดล้อมมีผลต่อการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก (JM Gomez et al., 2006) นอกจากนี้อุณหภูมิก็มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตเช่นกัน อีกทั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ต้องการสารอาหารที่โครงสร้างไม่ซับซ้อนในการดำรงชีพ ดังนั้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่มสร้างก๊าซมีเทนจึงขึ้นอยู่กับการทำงานของทุกกลุ่มแบคทีเรียที่สัมพันธ์กันด้วย โดยกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจนสามารถแสดงตาม ภาพ 1



ภาพ 1 แสดงกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

#### 2.4 แบคทีเรียในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ

การย่อยสลายสารอินทรีย์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน เกิดจากการทำงานร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เพื่อเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ให้กลายเป็น ก๊าซชีวภาพ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

2.4.1 เชื้อแบคทีเรียชนิดไม่ผลิตมีเทน (Non-Methanogenic Bacteria) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะแวดล้อมที่มีและไม่มีออกซิเจน อีกทั้งยังเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ซึ่งจะต้องใช้สารอินทรีย์ในการเจริญเติบโต เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นกรดอินทรีย์โมเลกุลเล็ก แอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และแอมโมเนีย เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี และมีอัตราการเจริญเติบโตสูง

2.4.2 เชื้อแบคทีเรียชนิดผลิตมีเทน (Methanogenic Bacteria) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะอาศัยอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น เนื่องจากจะทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้น้อย มีอัตราการเจริญเติบโตช้า และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเป็นกรดที่ค่า pH 7.0-7.8 (นฤมล เชาวะระโทก, 2556)

## 2.5 ปัจจัยการผลิตก๊าซชีวภาพ

เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ สำหรับผลิตก๊าซชีวภาพภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 กลุ่ม ที่เกี่ยวข้องกันคือ กลุ่มที่ 1 เชื้อแบคทีเรียชนิดไม่ผลิตมีเทน และกลุ่มที่ 2 เชื้อแบคทีเรียชนิดผลิตมีเทน (Dobre, Nicolae and Matei, 2014) ดังนั้นสภาวะของระบบการหมักก๊าซชีวภาพจะต้องเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการล้มเหลวของระบบการย่อยสลายสารอินทรีย์สำหรับผลิตก๊าซชีวภาพ จึงมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

2.5.1 อุณหภูมิในการเดินระบบ (Operating temperature) แบ่งเป็น 2 ระดับ ได้แก่ เมโซฟิลิก (Mesophilic) และเทอร์โมฟิลิก (Thermophilic) อุณหภูมิช่วงเมโซฟิลิกทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20 – 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิช่วงเทอร์โมฟิลิกทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 50 – 52 องศาเซลเซียส แต่แบคทีเรียในช่วงเมโซฟิลิกนั้นมีจำนวนสปีชีส์มาก และสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าช่วงเทอร์โมฟิลิก ทำให้การหมักก๊าซชีวภาพที่อยู่ในช่วงเมโซฟิลิกเสถียรกว่าเทอร์โมฟิลิก

2.5.2 ความเป็นกรดต่าง (pH Value) ช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในการผลิตก๊าซชีวภาพ คือ ช่วง 6.5 – 7.5 ถ้าค่า pH ต่ำกว่า 5 มีสภาวะกรดเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียที่สร้างมีเทน จึงได้ผลผลิตมีเทนลดลงแต่ได้กรดอินทรีย์ในปริมาณสูง

2.5.3 ปริมาณสารอินทรีย์เข้าสู่ระบบ (Loadings) คือปริมาณสารอินทรีย์ที่เราเติมใส่ถังหมักในแต่ละวันหากปริมาณสารอินทรีย์ที่เราเติมนั้นมีมากเกินไปจะส่งผลให้ค่า pH ลดลงมากเนื่องจากช่วงแรกของกระบวนการคือ อะซิโดเจเนซิส ซึ่งผลิตกรดขึ้นมาจำนวนมากส่งผลให้ระบบ

ล้มเหลว เนื่องจากแบคทีเรียเมทาโนเจนตาย (Methanogen) หากสิ่งนี้เกิดขึ้นจริงก็จะต้องเริ่มต้นระบบใหม่ทั้งหมด แต่ถ้าหากปริมาณสารอินทรีย์เข้าสู่ระบบน้อยก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้จะลดลงตามไปด้วย

2.5.4 ระยะเวลาการกักเก็บสารอินทรีย์ในถังหมัก (Retention time) สารอินทรีย์ในถังหมักขึ้นอยู่กับปริมาณ และประเภทของสารอินทรีย์ที่เติมเข้าไปมีลักษณะและคุณสมบัติที่แตกต่างกันไป หากระยะเวลาในการกักเก็บสั้นไปก็จะเป็นไม่พอสำหรับแบคทีเรียที่จะผลิตก๊าซชีวภาพ และหากระยะเวลาการกักเก็บนานเกินไปจะทำให้เกิดตะกอนของสารอินทรีย์

2.5.5 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N Ratio) อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้ผลิตก๊าซชีวภาพ คือช่วง 8 - 30 แต่อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพ คือ C/N เท่ากับ 23 ถ้าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงมาก ไนโตรเจนจะถูกแบคทีเรียเมทาโนเจนนำไปใช้ เพื่อเสริมโปรตีนให้ตัวเอง และจะหมดอย่างรวดเร็วส่งผลให้เกิดก๊าซชีวภาพปริมาณน้อยลง แต่ถ้าหากอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ จะส่งผลให้ไนโตรเจนมีปริมาณมากและเกาะกันเป็นแอมโมเนีย ซึ่งแอมโมเนียนี้จะเพิ่มค่า pH หากค่า pH สูงกว่า 8.5 สภาพการหมักจะเริ่มเป็นพิษกับแบคทีเรีย ส่งผลให้จำนวนแบคทีเรียเมทาโนเจนลดลง นอกจากนี้หากอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่นอกเหนือจากช่วง 8 - 30 จะส่งผลให้สัดส่วนปริมาณก๊าซชีวภาพที่ได้เป็นก๊าซชนิดอื่นๆ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้น โดยเฉพาะมูลสัตว์ เช่น วัว และควาย มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่เหมาะสมที่สุดรองลงมา ได้แก่ ดอกจอก ผักตบ และเศษอาหาร ขณะที่ฟางมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ค่อนข้างสูง แต่สามารถนำวัตถุดิบที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงมาผสมกับวัตถุดิบที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำได้ เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต้องการสำหรับผลิตก๊าซชีวภาพ

2.5.6 สารยับยั้งและสารพิษ (Inhibiting and Toxic Materials) การสะสมของสารบางชนิด เช่น กรดอินทรีย์ระเหยง่าย แอมโมเนียซัลไฟด์ และโลหะหนักบางตัว เช่น โพรแตสเซียมไฮเดรียม เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถส่งผลให้การย่อยสลายในกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพหยุดการทำงานลงได้

2.5.7 กรดไขมันระเหยง่าย (Volatile Fatty Acid, VFAs) กรดไขมันระเหยง่ายถูกนำไปใช้โดยแบคทีเรียกลุ่มสร้างก๊าซมีเทนหากย่อยสลายไม่ทันจะเกิดการสะสมของกรด ส่งผลให้ค่า pH ลดลงเกิดอันตรายต่อแบคทีเรียที่สร้างมีเทน โดยทั่วไปปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายในถังหมักควรมีค่าไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่อาจจะทนได้ถึง 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก จากการทดลอง (พลกฤษณ์ คุ่มกล้า, 2557) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว ด้วยวิธีการย่อยสลายภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ในกระบวนการย่อยสลายใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบหลักหมักร่วมกับกากน้ำตาลและปุ๋ยยูเรีย เพื่อปรับค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนการทดลองได้ออกแบบการหมักไว้ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 1 ประกอบด้วยฟางข้าว 3 กิโลกรัม และน้ำ 60 ลิตร ตัวอย่างที่ 2 ประกอบด้วย ฟางข้าว 3 กิโลกรัม น้ำ 60 ลิตร และกากน้ำตาล 2 ลิตร ตัวอย่างที่ 3 ประกอบด้วย ฟางข้าว 3 กิโลกรัม น้ำ 60 ลิตร และปุ๋ยยูเรีย 1 กิโลกรัม ทุกตัวอย่างใช้เวลาในการหมัก 30 วัน ซึ่งใช้ระยะเวลานานในการผลิตก๊าซชีวภาพ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะลดระยะเวลาการหมักก๊าซชีวภาพโดยการนำวัตถุดิบฟางข้าวมาย่อยด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เป็นน้ำตาล ซึ่งสามารถช่วยลดปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสที่มีปริมาณสูงในฟางข้าวได้ (Hendriks and Zeeman, 2009) ในกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวจะใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการผลิตก๊าซชีวภาพช่วยลดระยะเวลาการหมักก๊าซชีวภาพ และกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายด้วยการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ

## 2.6 ระบบผลิตก๊าซชีวภาพในปัจจุบัน

ระบบการย่อยสลายภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน มีการป้อนสารอินทรีย์เข้าสู่ระบบหมักในลักษณะที่แตกต่างกัน สามารถจำแนกตามลักษณะการป้อนได้ 3 วิธี ดังนี้

2.6.1 การทำงานระบบแบบแบทช์ หรือแบบกะ (Batch operation) เป็นลักษณะการป้อนสารอินทรีย์ทั้งหมดเข้าสู่ระบบหมัก ในครั้งแรกเพียงครั้งเดียวให้เต็มระบบในขณะเริ่มต้นระบบ (Start-up) จากนั้นจะถูกปิดเป็นระบบปิด และจะปล่อยให้เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยแบคทีเรียในระบบและจะไม่มีสารอินทรีย์เพิ่มเข้าไปอีก สารอินทรีย์ถูกย่อยสลายจนหมดสังเกตได้จากไม่มีก๊าซเกิดขึ้น จึงถ่ายหรือสูบตะกอนทิ้งไปแล้วเติมสารอินทรีย์เข้าไปใหม่ระบบนี้เหมาะสำหรับวัตถุดิบที่มีปริมาณมากๆ แต่นานๆ จึงจะมีสักครั้ง

2.6.2 การทำงานระบบแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous operation) เป็นลักษณะการป้อนสารอินทรีย์เข้าสู่ระบบหมักในลักษณะเป็นช่วงๆ แต่สม่ำเสมอ โดยจะมีการป้อนเข้าของสารอินทรีย์และถ่ายวัตถุดิบหมักที่ผ่านการกำจัดสารอินทรีย์แล้วออกจากระบบหมัก ระบบนี้เหมาะสำหรับใช้ในกรณีที่มีวัตถุดิบเป็นประจำ จะมีท่อสำหรับป้อนวัตถุดิบลงในระบบและ

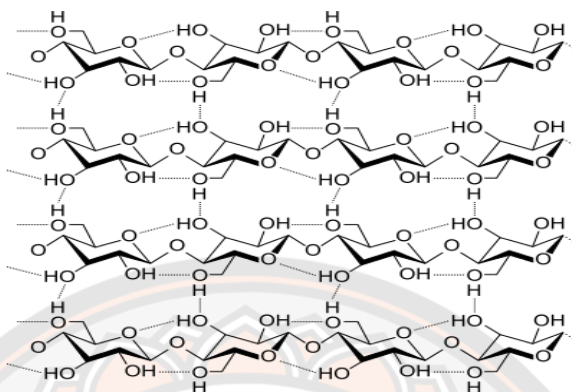
เพื่อสำหรับให้วัตถุดิบเก่าในระบบที่ผ่านการย่อยสลายแล้วไหลออก ปกติจะเติมสารอินทรีย์ใหม่ทุกวันการหมักแบบนี้จะส่งผลดีต่อการทำงานของแบคทีเรีย เนื่องจากช่วยให้เกิดสภาวะคงตัว (Steady-state) ของระบบ

2.6.3 การทำงานแบบต่อเนื่อง (Continuous operation) เป็นลักษณะการป้อนสารอินทรีย์เข้าสู่ระบบหมักอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา วัตถุดิบที่ใช้หมักจะถูกย่อยสลายภายในระบบหมักในช่วงเวลาหนึ่ง และถูกถ่ายเทออกจากระบบหมักอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกัน ประสิทธิภาพของระบบนี้จะสูงที่สุด แต่การเติมวัตถุดิบที่ใช้หมักตลอดเวลาด้วยอัตราคงที่นั้นอาจทำได้ยาก ดังนั้นในทางปฏิบัติระบบนี้อาจจะมีความยุ่งยากเมื่อนำไปใช้ผลิตก๊าซชีวภาพขนาดเล็กในชุมชน

## 2.7 วัตถุดิบฟางข้าว

ฟางข้าวเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งมีอยู่จำนวนมากหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสจำนวนมาก (Chaikumpollert, Methacanon and Suchiva, 2004) ซึ่งโครงสร้างของเซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ D – anhydroglucopyranose ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4glycosidic โดยเรียงกันเป็นสายตรงเกิดเป็นโพลีเมอร์สายยาวที่ไม่มีกิ่งก้านสาขา (unbranched polymer) โดยจำนวนของหน่วยย่อยที่มาต่อกันจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชตั้งแต่ 200 ถึง 15,000 หน่วย ถ้าพิจารณาภาพเป็นรูปสามมิติของสาย  $\beta$  - 1,4 linked glucopyranose พบว่ากลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl group) กลุ่มไฮดรอกซีเมทิล ( $\text{CH}_2\text{OH}$  group) และพันธะไกลโคซิดิก จะอยู่ในแนวระนาบเดียวกัน โดยหน่วยย่อย D-anhydroglucopyranose นี้ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นแบบเก้าอี้ (Chair form) พบประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเนื่องจากสายของกลูแคนที่ได้มีผิวหน้าเป็นไฮโดรเจนอะตอม ฉะนั้นโมเลกุลของสายกลูแคน จึงมีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกที่ไม่ชอบน้ำ ด้วยการต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$  - 1,4 จึงเกิดแรงที่ทำให้สายกลูแคนหมุนบิดตัว (Rotate) ได้ 180 องศา รอบแกนจึงทำให้แต่ละสายมีรูปร่างลักษณะที่เปรียบเสมือนแผ่นริบบิ้น (Flat ribbon) สายกลูแคนแต่ละสายถูกเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริล (Microfibril) ซึ่งพบพันธะไฮโดรเจนเกิดระหว่างกลุ่มไฮดรอกซิลของคาร์บอน ตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนในวงแหวนของโมเลกุลหน่วยย่อยในสายถัดไป นอกจากนี้พบพันธะไฮโดรเจนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของหน่วยย่อยในสายหนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของหน่วยย่อยในอีกสายหนึ่งด้วยสายของ  $\beta$  - 1,4 linked glucan ที่ขนานกัน และยึดกันอยู่ด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้

โครงสร้างของเซลลูโลสมีความซับซ้อนแข็งแรง และยากต่อการย่อยสลายมากยิ่งขึ้น (Hendriks and Zeeman, 2009) แสดงตามภาพ 2 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลสในวัตถุบิฟางข้าว



ภาพ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของเซลลูโลสในวัตถุบิฟางข้าว

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่ การนำเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมทำเยื่อกระดาษและกระดาษ อุตสาหกรรมทอผ้าและใช้เซลลูโลสในการผลิตก๊าซชีวภาพ เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นจะต้องย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กกลง หรือในบางครั้งจำเป็นต้องย่อยสลายให้ได้น้ำตาลก่อนการนำไปใช้งาน การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้หลายวิธีเช่น การย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมี การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และการย่อยสลายด้วยวิธีทางกายภาพ (คัทลียา เงินจัน, 2555)

#### การย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลด้วยกระบวนการทางเคมี

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรด (Acid hydrolysis) ให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาล แต่จากการย่อยเซลลูโลสด้วยกรดจะได้สารประกอบเฟอร์ฟูรัล (furfural) และอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรัลที่ไม่พึงประสงค์เกิดขึ้น วิธีการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนการใส่กรดเข้าไปทำลายโครงสร้างของเซลลูโลส โดยกรดจะทำให้เซลลูโลสพองตัว ขั้นที่สองเป็นการเติมน้ำเพื่อลดความเป็นกรด จากนั้นให้ความร้อนซึ่งมีผลทำให้เซลลูโลสถูกตัดเป็นโมเลกุลเล็กกลง ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายเพื่อให้โครงสร้างประเภทผลึกทนต่อการย่อยด้วยกรดเกิดจากการแตกตัวให้หมดด้วยกรด และกรดที่นิยมใช้ เช่น กรดซัลฟูริกเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์, กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 41 เปอร์เซ็นต์ หรือกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ (คัทลียา เงินจัน, 2555)



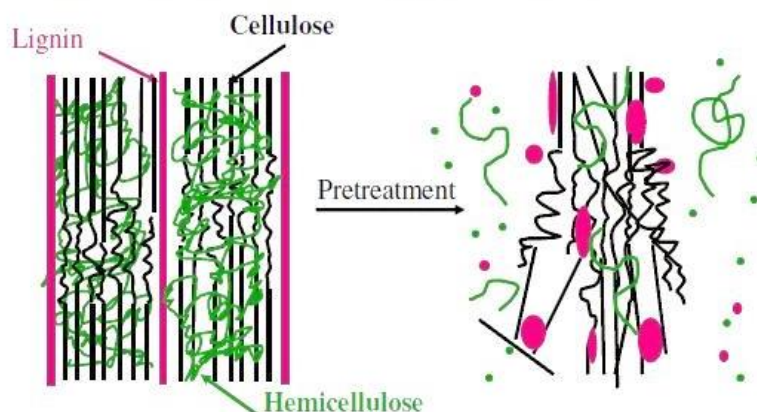
การย่อยสลายโดยใช้กรดไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยกรด ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นบางครั้งก่อให้เกิดปฏิกิริยาอื่นๆ เช่น ปฏิกิริยาการดึงน้ำ และปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลที่เป็นผลิตภัณฑ์ เป็นต้น นอกจากนี้กรดที่ใช้อาจมีผลเกิดการกัดกร่อนอุปกรณ์ต่างๆ อีกด้วย การอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีในการทำลายโครงสร้างของวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เป็นกระบวนการทำงานร่วมกันระหว่างการใช้สารเคมี และกระบวนการปรับสภาพอื่น ๆ ร่วมด้วย

### **การย่อยด้วยกรดเจือจาง**

การใช้กรดเจือจางในการย่อยเซลลูโลส เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้ปรับสภาพวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปการใช้กรดเจือจางในการย่อยมี 2 ชนิด คือการใช้อุณหภูมิสูงและอัตราการเติมตัวอย่างชนิดที่มีปริมาณของแข็งต่ำ ในกระบวนการต่อเนื่อง อุณหภูมิสูงกว่า 160 องศาเซลเซียส และความเข้มข้น 5 - 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีกวิธีการหนึ่ง คือ การใช้อุณหภูมิต่ำในกระบวนการแบบกลุ่ม สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณของแข็งสูง ใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 160 องศาเซลเซียส และความเข้มข้น 10 - 40 เปอร์เซ็นต์ กรดเจือจางส่วนใหญ่เป็นกรดซัลฟิวริก เมื่อเกิดกระบวนการย่อยเฮมิเซลลูโลสจะเกิดการปลดปล่อยน้ำตาลโมโนเมอร์ (Monomeric sugars) และโอลิโกเมอร์ที่ละลายน้ำ (Soluble oligomers) จากผนังเซลล์เข้าสู่สารละลาย การนำ เฮมิเซลลูโลสออก จึงเป็นการเพิ่มรพูนแก้ววัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร และยังช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น (Ming Chen et al., 2007) การย่อยด้วยกรดเจือจาง จึงเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำตาล เฮมิเซลลูโลส แต่ข้อด้อยคือ น้ำตาลเฮมิเซลลูโลสอาจถูกย่อยให้เปลี่ยนเป็นสารประกอบเฟอร์ฟูรัล และอนุพันธ์เฟอร์ฟูรัล ซึ่งจัดเป็นตัวยับยั้งการหมักของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการใช้กรดเจือจางในการย่อยเหมาะสำหรับวัตถุดิบที่มีปริมาณลิกนินต่ำ หรือมีการนำลิกนินออกจากวัตถุดิบแล้ว (คัทลียา เงินจั่น, 2555)

### **การย่อยด้วยกรดเข้มข้น**

การใช้กรดเข้มข้น เช่น กรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริก เป็นวิธีที่ยอมรับใช้ในการย่อยวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี (Ye Sun and Jiayang Cheng, 2002) การย่อยด้วยกรดเข้มข้นจะได้ปริมาณผลิตภัณฑ์มากแต่จะ ไม่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น



ภาพ 3 แสดงการปรับสภาพโครงสร้างลิกนินออกจากเซลลูโลส

### การย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์

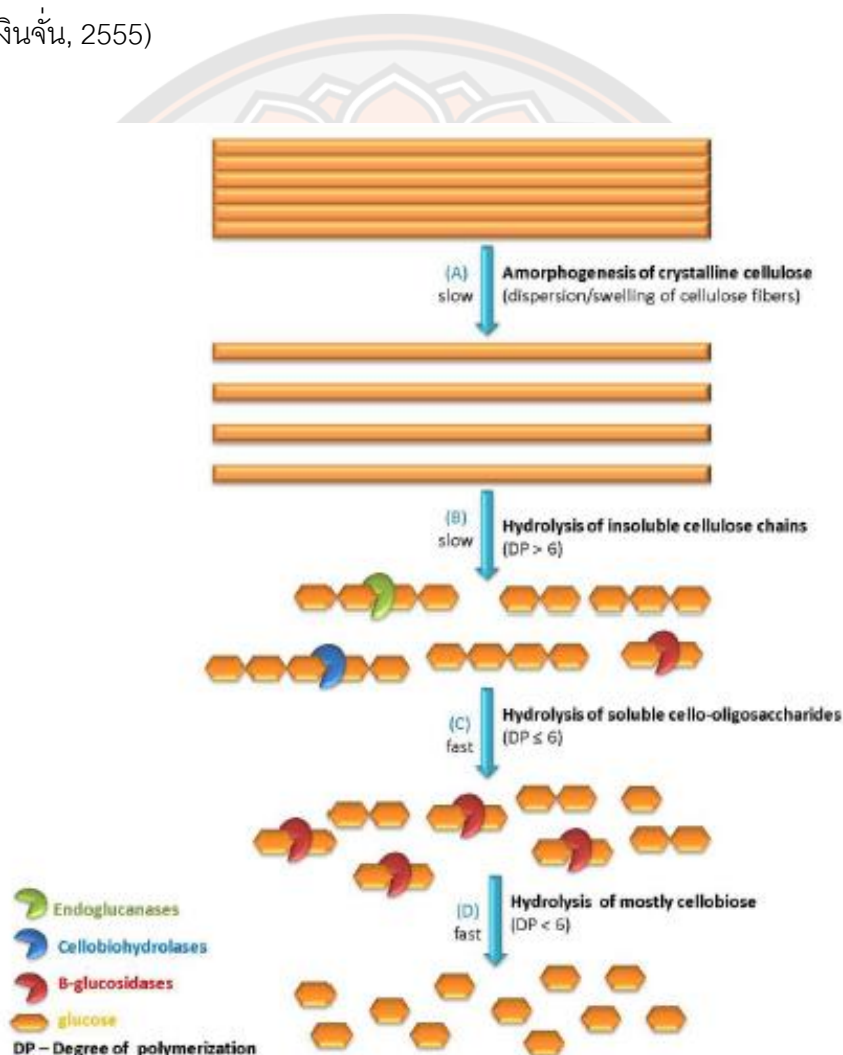
เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาล ซึ่งสามารถผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น ข้าวมอลต์ ข้าวบาร์เลย์ ไบยาซูบ ไล้เดอนดิน ปลวก หอยทาก แบคทีเรีย และรา เป็นต้น (A. Klyosov., 1990) ปฏิบัติการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และเป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะสูง เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงเกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกทำปฏิกิริยาต่อไป โดยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน (คัทลียา เงินจัน, 2555)

Endoglucanase (endo- $\beta$ -1,4-glucanase) (E.C.3.2.1.4) (พิจิตรา ตั้งเชื่อนพันธ์, 2548) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูเลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ กรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) และ เซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยย่อยที่ตำแหน่งพันธะ  $\beta$ -1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (random) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือเซลโลโอลิโก-แซคคาไรด์ (cellooligosaccharides) เซลโลเพนตาออส (cellopentaose) เซลโลไตรออส (cellotriose) เซลโลไบออส (cellobiose) และน้ำตาล โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักชนิดใดขึ้นอยู่กับสมบัติของแต่ละเอนไซม์

Exoglucosidase (exo- $\beta$ -1,4-glucanase) หรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซ $\beta$ -1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91) พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนส ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสโดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มี

น้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลสผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ เซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบได้ (microcrystalline cellulose) โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส

$\beta$  - glucosidase (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ละลายน้ำได้ให้เป็นน้ำตาล แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อน ขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง กลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็น ระเบียบ และไม่เป็นระเบียบให้เป็นน้ำตาล โดยการทำงานเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด แสดงดังภาพ 4 (คัทลียา เงินจัน, 2555)



ภาพ 4 แสดงกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเซลลูโลไลติกเอนไซม์

(Valdeir Arantes et al., 2010)

ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (ศศิธร ไกรฤทธิชัย, 2552)

1. เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ จึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อน ทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต
2. ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาถึงภาวะสมดุลได้เร็ว
3. เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มาก
4. ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น
5. เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามที่ต้องการ
6. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น และสามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยเซลลูโลสได้
7. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน

**การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกระบวนการทางกายภาพ (รัชพล พะวงศรีรัตน์, 2558)**

1. การใช้แรงทางกล (Mechanical comminution) วิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ หรือการเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้ผลึกกลดลง (Cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาได้มากขึ้น ความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัตถุดิบ และคุณสมบัติของวัตถุดิบนั้น
2. การไพโรไลซิส (Pyrolysis) วิธีการอบที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ให้วัตถุดิบกลายเป็นแก๊ส หรือของแข็ง กระบวนการจะทำได้ช้า และการระเหยจะต่ำถ้าใช้อุณหภูมิต่ำจากการวิจัยพบว่าการใช้อุณหภูมิมักไป หรือน้อยไปจะไม่เป็นผลดีต่อวัตถุดิบ
3. การใช้ความร้อน (Thermal heat treatment) เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลลูโลส ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะใช้อุณหภูมิมากกว่า 150 - 180 องศาเซลเซียส แต่ต้องทำให้วัตถุดิบมีขนาดที่เล็กลงก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยวัตถุดิบทางความร้อน

## 2.8 จุลินทรีย์จากดิน

การศึกษาจุลินทรีย์ในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส (Gupta, L., Kumar, R.A., Ghanshyam, T. et al., 2012) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของวัตถุดิบฟางข้าว (Howard, et al., 2003; Gupta, 2012; Jinzhou Wang, et al., 2015) โดยจุลินทรีย์ในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. Heterotrophic aerobic และ Facultative anaerobe แบคทีเรียที่เป็น Heterotroph เจริญเติบโตได้ในที่ที่มีออกซิเจนและประเภทที่เจริญเติบโตได้ในที่ไม่มีออกซิเจน *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.*

2. Heterotrophic, aerobic, non-symbiotic nitrogen-fixing แบคทีเรีย Heterotroph ที่เจริญเติบโตได้เฉพาะในที่ที่มีออกซิเจนสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้เมื่อดำรงชีวิตโดยอิสระในดิน เช่น *Rhizobium sp.*, *Azotobacter sp.*

3. Autotrophic, aerobic เป็น Autotroph ที่เจริญเติบโตได้เฉพาะในที่ที่มีออกซิเจน (Wang, et al., 2017)

3.1 Oxidizing inorganic nitrogen compounds ได้พลังงานจากการออกซิไดซ์สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น *Nitrosococcus sp.*, *Nitrobacter sp.*

3.2 Oxidizing inorganic sulphur compounds ได้พลังงานจากการออกซิไดซ์สารประกอบอนินทรีย์ของ Sulphur เช่น *Thiobacillus sp.*, *Sulfolobus sp.*

กลไกการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของจุลินทรีย์เกิดขึ้นผ่านการผลิตเอนไซม์เพื่อปล่อยออกสู่ภายนอก เช่น เอนไซม์เซลลูเลส สามารถย่อยสลายส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งของสารอาหารในการผลิตพลังงานภายในเซลล์ (Mustafa Balat., 2011) เชื้อจุลินทรีย์จากดินสามารถอยู่ร่วมกันได้ดี และมีการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นวัตถุดิบฟางข้าวที่นำมาใช้ในการหมักก๊าซชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับเอนไซม์ที่มีผลต่อการย่อยสลายโครงสร้างของวัตถุดิบฟางข้าวมีการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ เซลลูเลส พบว่าเซลลูเลสเป็นไกลโคโปรตีนประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 : 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 - 60,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ โคแฟกเตอร์ หรือโลหะอื่นๆ ในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ ทนต่อความเป็นกรด - ด่าง ในช่วง pH 4.8 - 8.0 และสามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 - 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลายาวนานปี หรือเก็บโดยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยอะซิโตน หรือเอทานอล โดยจะไม่สูญเสียคุณสมบัติข้างต้นไป อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันย่อมมีคุณสมบัติแตกต่างกัน (พรเทพ ถนนแก้ว, 2538)



ภาพ 5 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ  $\beta$  - 1,4 glycosidic ของโครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลสแล้วได้ผลผลิตสุดท้าย คือน้ำตาล โดยจำเป็นต้องอาศัยระบบเอนไซม์เซลลูเลสที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน (Elwyn T. Reese et al., 1950) ได้เสนอไว้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสนั้นจะประกอบด้วยองค์ประกอบที่มีหน้าที่แตกต่างกัน 2 องค์ประกอบ คือ  $C_1$ -component เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสที่มีอยู่ในธรรมชาติให้เกิดเป็นโครงสร้างที่ง่ายต่อการย่อยสลาย และ  $C_x$ -component คือส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแล้วได้ผลผลิตสุดท้าย คือสารประกอบเซลโลไบโอส ซึ่งละลายน้ำได้และจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จากนั้น (Reese and Levinson., 1952) ได้เสนอลักษณะการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มเติม โดยได้เสนอไว้ว่าองค์ประกอบของเอนไซม์ส่วนที่สาม  $\beta$ -glucosidase ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาล

#### องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan et al., 1987)

เอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzyme) ที่ทำงานร่วมกัน  
ดังนี้

1. เอนไซม์  $C_1$  หรือ hydrogen bondase ทำหน้าที่กระตุ้น หรือสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง เพื่อเป็นสารตั้งต้นของเซลลูเลส

2. เอนไซม์  $C_x$  หรือ  $\beta$ -1, 4 glucanase เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ กลุ่มนี้มี 3 ชนิด คือ

2.1 ( $\beta$  - D-glucan glucanohydrolase, EC.3.2.1.4) จะทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ  $\beta$  - 1, 4-glycosidic linkage แบบสุ่ม ผลจากการย่อยสลายทำให้สายโมเลกุลของเซลลูโลสสั้นลง ขณะที่หมู่รีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ แล้วได้น้ำตาล และเซลโลไตรออสเพิ่มขึ้นเอนไซม์นี้จะไม่ย่อยเซลโลไบโอส แต่สามารถย่อยเซลลูเดกซ์ทรินที่เกิดการขยายตัว Carboxy Methyl Cellulose (CMC) และ Hydroxyl-Ethyl Cellulose (HEC) ได้ และปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อสายโมเลกุลเซลลูโลสสั้นลง

2.2 Exo-  $\beta$  -glucanase (1, 4-  $\beta$  -D-glucan cellobiohydrolase EC.3.2.3.91) หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้านปลายที่ไม่รีดิวซ์ (non-reducing end) เอนไซม์นี้ จะสามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึก (crystalline cellulose) หรือเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble cellulose) ได้ เซลโลเดกซ์ทริน และเซลโลไบโอสจะสามารถตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยการใช้อvicel และ amorphous cellulose เป็นสารตั้งต้น แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพลดลงเมื่อขนาดของสารตั้งต้นมีโมเลกุลสั้นลง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสในรูปผลึกได้ และจะเกิดปฏิกิริยาต้านการทำงานเมื่อมีเอนโดกลูคาเนส(endoglucanase) ผสมอยู่

2.3  $\beta$  - glucosidase ( $\beta$ -D-glucohydrolase EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลส หรือเซลโลเดกซ์ทรินได้ การทดสอบเอนไซม์นี้โดยใช้ cellobiose, *p*-nitrophenyl- $\beta$ -d-glucoside หรือ ซาลิซิน (salicin) เป็นสารตั้งต้น สามารถแสดงการย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลสได้ดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดงการย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส (สมรักษ์ พันธุ์ผล, 2535)

ชนิดของเอนไซม์	ชนิดของสารตั้งต้น				
	Crystalline cellulose	CMC	Amorphous cellulose	Cellotetraose	Cellobiose
Endo- $\beta$ -glucanase	-	+	+	+	-
Exo- $\beta$ -glucanase	+	-	+	+	-
$\beta$ -glucosidase	-	-	-	+	+

### การสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

ในปี 1977 Lehninger ได้ศึกษากลไกการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเกิดบนไรโบโซมในไซโตพลาสซึม โดยมี mRNA ต้นแบบที่จำเพาะเจาะจงทำหน้าที่ถอดรหัสจากยีนเซลลูเลสแต่ละยีน จากนั้นจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มาเกาะที่ผนังเซลล์ หรือปล่อยออกสู่ภายนอกทันที เอนไซม์เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ที่ปรับตัวได้ หรือเอนไซม์ที่ไม่สามารถผลิตได้ ซึ่งจะมีการสังเคราะห์เมื่อใช้เซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอนแต่จะสังเคราะห์ได้น้อย (M Mandels and ET Reese, 1957) และ Cyclic adenosine 3',5' monophosphate (cAMP) มีความสำคัญต่อกระบวนการกดต้นแคแทบอลิต์ (catabolite repression) เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องมีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานทำให้ cAMP ภายในเซลล์มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้แหล่งพลังงานอื่นจะถูกยับยั้งโดยโปรตีนจำเพาะ กลไกการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสจึงอาจจะเกิดจากน้ำตาล ในปี 1978 Eriksson ได้ศึกษาการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส *Sporotrichum pulverulentum* พบว่าน้ำตาลที่ความเข้มข้น 0.25 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดกระบวนการกดต้นแคแทบอลิต์ ของเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) และเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase)

ในปี 1980 Goksoyr and Eriksen พบว่าการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การควบคุมทางชีวเคมี และการควบคุมทางพันธุกรรม โดยควบคุมการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องด้วยกระบวนการเพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ กระบวนการลดการสังเคราะห์เอนไซม์ และกระบวนการกดต้นแคแทบอลิต์ ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสที่เป็น

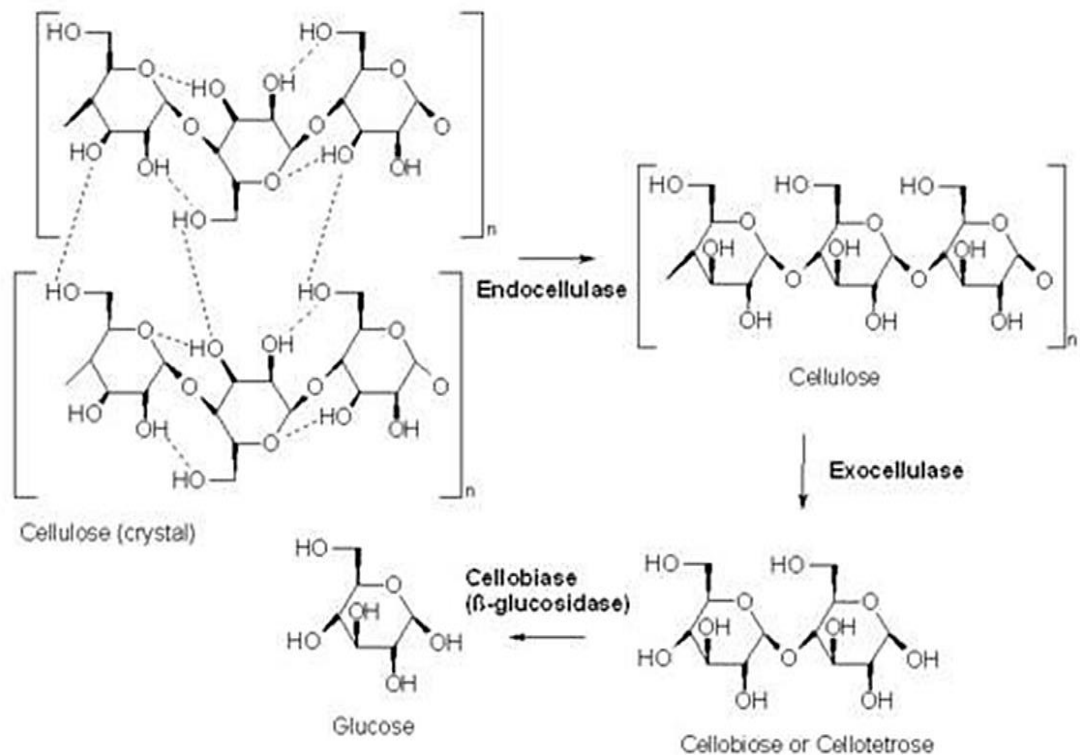


ตัวเหนี่ยวนำที่ดี เช่น เซลลูโลส, เซลโลไบโอส, ไบโอเซลลูโลส และไซไฟโรส สารเคมี เช่น กรดปาลมิติก และเอพริลอะซีเตทของไดแซ็กคาไรด์ เป็นต้น

### การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan et al., 1987)

กลไกการสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็น prohydrolytic step คือสายโซ่ anhydroglucose ถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นตอนที่สองเกิด hydrolytic cleavage ของสายโซ่โพลีเมอร์

กลไกการทำงานเริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดขยายตัวพร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนสจะย่อยสลายเซลลูโลสได้ ปลายอิสระ ส่วนเอกโซกลูคาเนส จะดึงโมเลกุลของเซลลูไบโอสออกจากปลาย ซึ่งถูกย่อยสลายต่อไปโดย  $\beta$ -glucosidase จนได้น้ำตาลน้ำตาลอิสระดังแสดงในภาพ 6

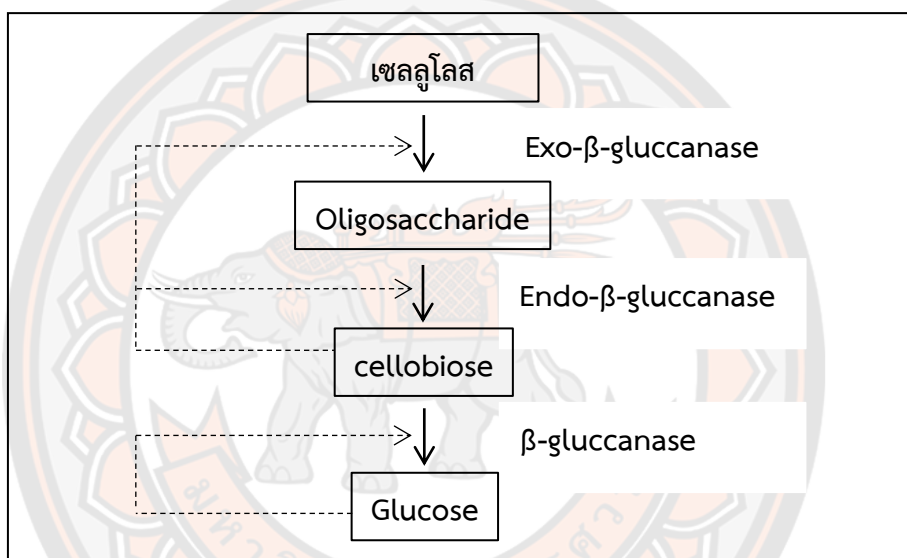


ภาพ 6 แสดงการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

### การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan et al., 1987)

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสมี ดังนี้

1.  $\beta$  - glucosidase จะถูกยับยั้งเมื่อปริมาณน้ำตาลสูงขึ้นทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอส ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ต้องทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดี แต่เมื่อแยกชนิดใดชนิดหนึ่งออกไปจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง ดังแสดงในภาพ 7 (Selby and Maitland., 1967)



ภาพ 7 แสดงการย่อย และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

2. สารที่มีองค์ประกอบคล้ายกับสารตั้งต้นจะยับยั้งการรวมตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้ เช่น เมทิลเซลลูโลส และกลูโคโนแลคโตส โดยจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

3. สารพวกโพลีออล และอิริทริทอลจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคซิเดสและกาแลคโตซิเดส โดยอิริทริทอลจะรวมตัวกับเอนไซม์ตรงจุด C3-C6 ของ D-glucose

4. โปรตีนของเอนไซม์ ถูกทำให้เสียสภาพโดยสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับ SH-group เช่น ไฮดรอกซิดรอกซิด แต่อาจแก้ไขโดยใช้ซีสเทอีน และคลอไรด์ไฮดรอกซิด

5. เอนไซม์เอนโดเพทีเดส สามารถลดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่เอนไซม์เอกโซเพทีเดส ไม่สามารถย่อยเอนไซม์เอกโซเซลลูเลสที่อยู่ในสภาพปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลลูเลสสามารถคงทนต่อสภาพความเป็นกรด – ด่าง และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงได้
6. การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์ ซึ่งแล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์
7. เอนไซม์เซลลูเลสอาจถูกยับยั้งโดยเมลานิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด และอาจถูกยับยั้งโดยสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน หรือคอลลอยด์ในดิน
8. แร่ธาตุดินอาจเป็นอุปสรรคต่อการย่อยสลายเซลลูโลสในดินได้ เพราะสามารถดูดซับเซลลูโลส และสารผลิตภัณฑ์บางชนิดได้ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### **การวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส**

ในปี ค.ศ. 1980 Goksoyr และ Eriksen ได้แบ่งการทำงานของเอนไซม์เป็น 2 วิธีตามความซับซ้อนของลักษณะเอนไซม์ ดังนี้

1. Physical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เชิงประกอบ (complex enzyme) ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ประกอบด้วย 2 วิธี คือ

- 1.1 การสลายให้ได้น้ำตาล (saccharolytic method) เป็นการวัดปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเพาะเลี้ยง (Mary Mandels et al., 1981) รวบรวมวิธีการวัดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้ dinitro salicylic acid reagent (DNS reagent) เป็นสารทดสอบซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของสารตั้งต้น ดังนี้

- 1.1.1 Filter paper assay เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากกระดาศกรองสามารถเตรียมได้ง่ายวิธีการ คือ ใช้กระดาศกรองขนาด 1×6 เซนติเมตร ปริมาณ 50 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ และบัฟเฟอร์ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เพื่อทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

- 1.1.2 Cotton assay คล้ายกับ filter paper assay แต่ใช้เส้นใยฝ้าย 50 มิลลิกรัมเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ และบัฟเฟอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม DNS reagent และหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์

1.1.3 CMC assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดการทำงานของเซลลูเลส เนื่องจาก CMC เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ดี จึงสะดวกต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ โดยจะบ่ม 1% CMC ใน 0.05 โมลาร์ ซิเตรท บัฟเฟอร์ค่า pH 4.8 กับเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม DNS reagent เพื่อหาปริมาณของ น้ำตาลรีดิวซ์

1.1.4 Amorphous cellulose assay วิธีนี้จะวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โดยบ่ม 1% walseth cellulose ใน 0.05 โมลาร์ ซิเตรท บัฟเฟอร์ ค่า pH 4.8 กับเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อนำส่วนใส (supernatant) ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการทำปฏิกิริยากับ DNS reagent

1.2 การตรวจสอบโครงสร้างของเซลลูโลสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง หลังเกิดการย่อยสลาย ในกรณีที่มีการย่อยสลายเซลลูโลสไม่สมบูรณ์ หรือไม่เกิดน้ำตาลขึ้นจะตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลสวิธีการที่ใช้ คือ การวัดความเหนียวของเส้นใยฝ้ายก่อน และหลังทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในเวลาที่กำหนด ซึ่งต้องใช้เครื่องมือและความละเอียดสูงนอกจากนี้ยังอาจตรวจสอบเส้นใยอิสระที่เกิดจากการย่อยสลายกระดาษกรอง และการหาน้ำหนักของสารตั้งต้นที่หายไป

2. Biochemical assay เป็นการวัดความสามารถในการทำงานของสารประกอบเชิงซ้อนเซลลูเลสแบบเฉพาะแต่ละองค์ประกอบซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

2.1 Endoglucanase นิยมใช้ CMC และ hydroxyethyl cellulose เป็นสารตั้งต้นโดยจะวัดจากค่าความหนืดที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีค่าลดลงเมื่อเวลาของปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นวิธีที่ยุ่งยาก จึงใช้วิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการทำปฏิกิริยากับ DNS reagent ที่เกิดขึ้นแทน

2.2 Exoglucanase วิธีนี้ยังไม่มีสารตั้งต้นที่จำเพาะต่อเอกโซกลูคาเนส ดังนั้นการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์นี้จึงจำเป็นต้องสกัดให้ได้เอกโซกลูคาเนส ที่บริสุทธิ์ก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น ซึ่งจะใช้เซลลูโลสที่มีอัตราพอลิเมอร์ไรเซชันต่ำ เช่น avicel หรือเซลลูโลสที่ผ่านการแช่ด้วยกรดฟอสฟอริก

2.3  $\beta$  - glucosidase นิยมใช้เซลโลโบไอส และ *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (*p*NPG) เป็นสารตั้งต้น โดยหากใช้เซลโลโบไอสเป็นสารตั้งต้น นิยมวัดปริมาณของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลาย แต่หากใช้ *p*NPG จะมีการเติมไฮเดียมคาร์บอเนต หลังจากการบ่มกับเอนไซม์ จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้

### ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความสามารถในการผลิตเซลลูเลสของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน มีรายงานว่าแบคทีเรียไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบครบทั้งสามส่วน คือ endoglucanase, exoglucanase และ  $\beta$ -glucosidase ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่ง และปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการใช้ในกระบวนการสร้างพลังงานอีกด้วย

2. แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตเซลลูเลสอย่างมาก (Ikram-ul-Haq et al., 2006) ได้นำ *Trichoderma harzianum* มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติที่แตกต่างกัน คือ wheat bran, wheat straw, rice bran, rice husk และ soybean meal ผลการศึกษาพบว่าเชื้อสามารถผลิตเซลลูเลสได้มากที่สุด ในอาหาร ที่มี wheat bran เป็นแหล่งคาร์บอนได้ทำการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูเลสจากกระเพาะหมักของโคพื้นเมือง พบว่า *Ruminococcus albus* 21Aa สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ Whatman No.1 filter paper pulp อีกทั้ง (You-Jung Lee et al., 2008) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากธรรมชาติโดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 พบว่ามีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ rice hull และ rice bran โดยวัดกิจกรรม CMCase ได้เท่ากับ 153.0 และ 112 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้เลี้ยง *Clostridium thermocellum* พบว่าเชื้อสามารถผลิตเซลลูเลส และน้ำตาลรีดิวิซจากเปลือกข้าวโพด ชานอ้อย ชังข้าวโพด และแกลบได้ดี

3. แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (นฤมล ทองไว, 2544) ได้ทำการศึกษา *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเซลลูโลส ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ tryptone, ammonium nitrate, soytone, ammonium sulphate และ peptone ผลการศึกษาพบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 สามารถใช้ tryptone และ *Bacillus coagulans* TI-5 สามารถใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด จากการศึกษาของ (B. H. Lee and T. H. Blackburn, 1975) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก thermophilic *Clostridium* sp. โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์แตกต่างกัน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ได้เท่ากับ 124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ได้ทดลองเพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 โดยใช้

polypeptone, peptone และ tryptone พบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดสามารถกระตุ้นการผลิตเซลลูเลสได้

4. ความเป็นกรด-ด่าง แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญในสภาพที่เป็นกลาง แต่ก็มีหลายชนิดที่มีการเจริญ และผลิตเซลลูเลสได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดหรือต่างแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย (นฤมล ทองไว, 2544) ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 ใน cellulose ผลการศึกษาพบว่า pH 5.5 มีความเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ (Tadao Oikawa et al., 1994) ที่เพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 ในอาหารเหลว cellulose และพบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ pH 5.5 เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาของ (Vinay K. Singh and Anil Kumar., 1998) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus brevis* VS-1 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ pH 5.5 แต่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Scytalidium lignicola* CD-48 ใน pH 6 เชื้อสามารถผลิตเซลลูเลสได้มากที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ (Ikram-ul-Haq et al., 2005) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma harzianum* UM-11 และพบว่าที่ pH 6 เชื้อสามารถผลิตเซลลูเลสได้มากที่สุดอีกทั้ง (You-Jung Lee et al., 2008) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 พบว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสได้ดีในอาหารที่มี pH 7 โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดส่วนในปี (ระพีพรรณ, 2536) ใช้อาหารเหลว cellulose ที่ pH ต่างกันในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ruminococcus albus* 21Aa ผลการศึกษาพบว่า pH 6.8 เหมาะสมต่อการผลิต เซลลูเลสมากที่สุด และ (ภัทรา และคณะ, 2551) พบว่า *Clostridium thermocellum* สามารถเจริญและผลิตเซลลูเลสได้ดีที่สุดที่ pH 7

5. อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง และผลิตเซลลูเลส จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียบางสายพันธุ์อาจสามารถผลิตเซลลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิสูง แต่บางสายพันธุ์สามารถผลิตเซลลูเลสได้ที่อุณหภูมิต่ำ (ภัทรา และคณะ, 2551) พบว่า *Clostridium thermocellum* สามารถผลิตเซลลูเลสได้ดี เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว cellulose บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (Ikram-ul-Haq et al., 2005) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Trichoderma harzianum* UM-11 ในอาหารเหลว CMC ที่อุณหภูมิ 20 - 40 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ 28 องศาเซลเซียส (นฤมล ทองไว, 2544) พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* TI-5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญแตกต่างกัน คือ 45 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ (Vinay K. Singh and Anil Kumar., 1998) ซึ่งทำการ

เพาะเลี้ยง *Bacillus brevis* VS-1 และพบว่าที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตเซลล์ได้สูงที่สุด แต่จากการศึกษาของ (Fred J. Stutzenberger., 1971) ทำการเพาะเลี้ยง *Thermomonospora curvata* พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีในอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ (Ray A.K. et al., 2007) ทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CY5 และ *Bacillus circulans* TP3 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับพบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตเซลล์ได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และผลิตเซลล์ ได้ต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

### ประโยชน์ของเซลล์

ปัจจุบันมีการใช้เซลล์ในอุตสาหกรรม และเกษตรกรรมมากมาย เช่น ใช้ในการย่อยสลายพืชผัก กากเหลือจากเกษตรกรรม และย่อยขยะเป็นปุ๋ยหมัก ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จากเซลล์ คือการใช้เซลล์ในอุตสาหกรรมกระดาษ พบว่าเซลล์บางชนิดมีส่วนช่วยลดเวลาในการตี (beating time) และช่วยต้านไข (grease resistance) ทำให้กระดาษมีคุณภาพดีมีการใช้เซลล์เป็นส่วนประกอบในส้วมถังเกรอะ (septic tank) การนำเซลล์จาก *Trichoderma reesei* เพื่อสลายผนังเซลล์พืช ทำให้มีการเชื่อมโปรโตพลาสต์ (protoplast) ของเซลล์พืชสองชนิด ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์ที่มีค่าต่อวงการเกษตร และมีการใช้เซลล์ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เซลล์จะถูกนำมาใช้ในการสกัดน้ำผลไม้เปรี้ยว และทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น อีกทั้งยังทำให้น้ำผลไม้ที่ได้เป็นเนื้อเดียวกัน เซลล์ใช้ในการเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากเมล็ดธัญพืช และอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยหมัก นอกจากนี้มีการนำเซลล์มาผลิตเป็นยา โดยใช้เซลล์ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น เพื่อช่วยเป็นยาขับลมในกระเพาะ ช่วยลดอาการแน่นท้อง เนื่องจากเซลล์สามารถย่อยเส้นใยได้ (พิจิตรา ตั้งเชื่อนจันทร์, 2548)

## 2.9 ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีสมคุณนิเวศวิทยาภายในกระเพาะหมักเป็นสภาวะที่มีลักษณะเฉพาะหลายอย่าง เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยการรักษาระดับอุณหภูมิ ซึ่งกระบวนการหมักได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ง่ายระดับความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.5 - 7.0 และมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 39 – 42 องศาเซลเซียส (Van Soest, 1984) จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักมีทั้งจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถอยู่ได้ใน

สภาวะที่มีออกซิเจน (Obligate Anaerobes) และจุลินทรีย์ที่อยู่ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) แต่การมีระดับของออกซิเจนมากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ (วรรณพัฒน์, 2533) จุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะหมักมีหลากหลายชนิด แต่จุลินทรีย์เหล่านี้ มีคุณสมบัติ คือต้องดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน และมีการสร้างผลผลิตสุดท้ายได้ ก๊าซชีวภาพ

การทำงานของตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในการหมักน้ำตาลและเปปไทด์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ แบ่งได้ 3 กรณี คือ

1. น้ำตาลน้ำตาลและเปปไทด์ ได้รับพลังงานทำให้ไนโตรเจน สำหรับการสร้างโปรตีน และการหมักน้ำตาลน้ำตาลจะได้กรดไขมันที่ระเหยง่าย เพื่อเป็นพลังงานสำหรับการแบ่งตัวการเจริญเติบโตของเซลล์ รวมทั้งแอมโมเนียที่เกิดจากการย่อยโปรตีนก็จะหมุนเวียนมาใช้ในการสร้างโปรตีนของเซลล์ต่อไป

2. กรณีน้ำตาลน้ำตาลมากเกินไปเปปไทด์ จะมีพลังงานสำหรับการอยู่รอดของเซลล์มาก แต่ขาดไนโตรเจนสำหรับสังเคราะห์โปรตีน และการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง ในกรณีนี้พลังงานที่มากเกินไปจะทำให้เกิดการหมักของน้ำตาลน้ำตาลสูงเกิดกรดไขมันที่ระเหยง่ายสูง แต่แอมโมเนียลดลง

3. กรณีเปปไทด์มากเกินไปน้ำตาลน้ำตาล จะมีไนโตรเจนจำนวนมากสำหรับการสร้างโปรตีน แต่น้ำตาลน้ำตาลต่ำทำให้การสร้างกรดไขมันที่ระเหยง่ายไม่พอ จึงขาดพลังงานสำหรับการแบ่งตัวของเซลล์และการสร้างโปรตีน จึงจำเป็นต้องนำเปปไทด์มาใช้ในการสร้างพลังงานแทนที่จะนำไปสร้างโปรตีน

จุลินทรีย์ Microorganism 2 ชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียที่ไม่ย่อยให้เกิดมีเทน (non-methanogenic bacteria) และแบคทีเรียที่ย่อยให้เกิดมีเทน (methanogenic bacteria) (Tippayawong, Promwungkwa และ Rerkkriangkrai, 2007) แบคทีเรียชนิดแรกเป็นจุลินทรีย์ ซึ่งย่อยสลายโมเลกุลสารประกอบอินทรีย์ขนาดใหญ่เป็นสารมัธยันต์ก่อนเข้าสู่กระบวนการแอซิโดจีเนซิส แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารมัธยันต์ของกรดคาร์บอกซิล กรดคีโตน กรดไฮดรอกซิล กรดอะมิโน คีโตน แอลกอฮอล์ และน้ำตาล เพื่อเกิด  $\text{CH}_4$  และ  $\text{CO}_2$  ตาราง 3 แสดงแบคทีเรียหลายชนิดที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายโมเลกุลสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ที่ใช้เป็นสารป้อนสำหรับผลิตก๊าซชีวภาพ



ตาราง 3 แสดงแบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายให้เกิดมีเทนซึ่งใช้สำหรับกระบวนการไฮโดรไลซิสสาร  
ป้อนอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่

แบคทีเรีย	โมเลกุลอินทรีย์				
	เซลลูโลส	แป้ง	เปปโติน	เคซีน	ไลปิด
<i>Alcaigenesbookerii</i>	x	x	x	x	✓
<i>A. faecalis</i>	✓	x	x	x	x
<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	x	✓	x	✓	x
<i>B. cereus</i>	✓	✓	✓	✓	x
<i>B. circulans</i>	x	x	✓	x	x
<i>B. megaterium</i>	✓	✓	x	✓	✓
<i>B. pumilis</i>	x	x	✓	✓	x
<i>B.sphericus</i>	x	x	✓	✓	✓
<i>B.subtilis</i>	x	x	✓	✓	✓
<i>Clostridiumcarnofetidum</i>	✓	x	x	x	x
<i>Escherichia coli</i>	x	x	✓	✓	x
<i>Micrococcusandidus</i>	x	✓	x	x	x
<i>M. luteus</i>	x	x	x	x	✓
<i>M. varians</i>	x	✓	✓	✓	x
<i>M. Urae</i>	x	✓	x	x	x
<i>Paraclobacteriumintermedium</i>	x	x	✓	x	x
<i>P. coliforme</i>	x	x	✓	x	x
<i>Proteus vulgaris</i>	✓	x	x	x	x
<i>Pseudomonusaeruginosa</i>	✓	x	x	x	x
<i>P. oleovorans</i>	x	x	x	x	✓
<i>P. perolens</i>	x	x	x	x	✓
<i>P. reptivora</i>	✓	x	x	x	x
<i>P. riboflavina</i>	✓	x	x	x	✓
<i>P. spp.</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Streptomyces bikiniensis</i>	x	x	x	x	✓

จุลินทรีย์ชนิดที่ 2 คือ แบคทีเรียที่ย่อยให้แก๊สมีเทน (Methanogenic bacteria) สามารถย่อยสลายสารมัธยันตร์จากกระบวนการอะซิโตเจนเนซิส และอะซิโตเจนเนซิส เพื่อเกิดก๊าซมีเทนหรือสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกลง ดังแสดงในตาราง 4 เพื่อให้ได้ก๊าซชีวภาพที่มีพลังงานเพียงพอที่จะทำให้เกิดเป็นพลังงาน โดยอาศัยการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทำให้เกิดปฏิกิริยาทางกระบวนการย่อยสลาย และทำให้เกิดก๊าซชีวภาพ กล่าวคือเป็นกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยใช้แบคทีเรียภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน

ตาราง 4 แสดงแบคทีเรียที่ย่อยสลายให้แก๊สมีเทนสำหรับสารมัธยันตร์ที่เกิดจากกระบวนการ อะซิโตเจนเนซิส และกระบวนการอะซิโตเจนเนซิส

แบคทีเรีย	สารป้อน	ผลผลิต
Methanobacteriumformicum	CO H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> Formate	CH <sub>4</sub>
M. mobilis	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> Formate	CH <sub>4</sub>
M. propionicum	Propionate	CO <sub>2</sub> + Acetate
M. ruminantium	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> Formate	CH <sub>4</sub>
M. sohngenil	Acetate Butyrate	CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>
Methanococcusmazei	Acetate Butyrate	CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>
M. suboxydans	Caproate Butyrate	Propionate Acetate
M. vanniellii	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> Formate	CH <sub>4</sub>
Methanosarcinabarkeri	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> Methanol Acetate	CH <sub>4</sub> CH <sub>4</sub> CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>
M. methanica	Acetate Butyrate	CH <sub>4</sub>

กระบวนการทำงานของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญเติบโต 6 ช่วง ได้แก่ ช่วงปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อม (lag phase) ช่วงการเพิ่มจำนวนประชากรอย่างช้าๆ (Positive acceleration phase) ช่วงการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในสภาวะที่พร้อมไปด้วยอาหาร และไม่มีคู่แข่ง (exponential phase) ช่วงการลดลงของจำนวนประชากร เนื่องจากมีการต่อต้านจากสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้น (Negative declining growth phase) และช่วงที่ประชากรแบคทีเรียคงที่ เนื่องจากอัตราการเกิดและตายเท่ากัน (stationary and negative growth phase) ช่วงเวลาการคงอยู่ของกระบวนการทำงานของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้าสู่กระบวนการหมักก๊าซชีวภาพ อัตราส่วนโดยมวลของของเหลวต่อของแข็งควรมีค่าเกินกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ (Sreerishnan, Kohli และ Rana, 2004; Yadvika, Santosh, Sreerishnan, Kohli และ Rana, 2004) การย่อยสลายเชิงชีวภาพ หรือที่เรียกว่า Biological degradation ควรได้รับการเพิ่มประสิทธิภาพด้วยการลดขนาดสารป้อนป้อนเป็นองค์ประกอบในสารป้อน (Yadvika, Santosh, Sreerishnan, Kohli และ Rana, 2004) ความปนเปื้อนของสารประกอบที่เป็นพิษของสารป้อน เช่น กรดไขมันระเหยง่าย แอมโมเนีย ไอออน อัลคาไล อัลคาไลน์เอิร์ท ไอออนของซัลเฟต และโลหะหนัก เป็นต้น มีอิทธิพลต่อช่วงเวลาการคงอยู่ของแบคทีเรีย คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพยังจะมีความแตกต่างกันแม้ว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ของสารป้อนดังกล่าวจะเป็นสารประกอบอินทรีย์ และสามารถย่อยสลายเป็นก๊าซชีวภาพได้ แต่องค์ประกอบบางส่วนอาจมีสารเคมีที่มีความเป็นพิษซึ่งอาจลดประสิทธิภาพการทำงานหรือสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ดังนั้นสมบัติทางเคมีของสารป้อนควรคล้ายคลึงกัน หากจะกล่าวถึงสารป้อนที่มีปริมาณมากพอสำหรับสังคมไทย ฟางข้าวควรได้รับการพิจารณา เนื่องจากเราสามารถผลิตข้าวเพียงพอต่อการบริโภคและสามารถส่งออก มีข้อมูลรายงานว่าประเทศไทยสามารถผลิตข้าวได้ถึง 21 – 26 ล้านตัน (Ueda, Kunimitsu และ Shinogi, 2007) และส่วนที่เหลือจากการแปรรูปข้าว เช่น ฟางข้าว (Rice straw) แกลบข้าว (Rice husk) เป็นต้น เหลือทิ้งจำนวนมากและไม่ถูกใช้ประโยชน์ให้คุ้มค่าเท่าที่ควร ในงานวิจัยนี้จึงมองถึงการนำใช้ประโยชน์ของฟางข้าวสำหรับการหมักก๊าซชีวภาพโดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง เพื่อลดระยะเวลาการหมักก๊าซชีวภาพ

กระบวนการทำงานของจุลินทรีย์จากกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 แบคทีเรียจากกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเกิดสารมัธยันตร์ C<sub>2</sub> - C<sub>5</sub> ของกรดไขมันระเหยง่าย ขั้นตอนที่ 2 ของเหลวจากขั้นตอนที่ 1 เกิดการย่อยสลายอย่างต่อเนื่องสู่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซมีเทน (Barnes และ Keller, 2003) แบคทีเรียที่มี

ส่วนร่วมในกระบวนการทั้ง 2 มีความจำเพาะต่อสารป้อน (สามารถจำแนกได้ตามตาราง 3.2 – 3.3) (Hu and Yu, 2005) การทดลองหมักสารป้อนลิกโนเซลลูโลสจากแก่นข้าวโพดแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 25 – 40 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราส่วนสารป้อนระหว่างของแข็งต่อของเหลว 5 - 15 กรัม ของแข็งระเหย/ลิตร (g.VS/L) และใช้จุลินทรีย์ที่สกัดจากของเหลวในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องเร่งปฏิกิริยา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดลองเกิดขึ้น เมื่ออัตราส่วนสารป้อน 10 g.VS/L อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาหมัก 96 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามสัดส่วนของก๊าซมีเทน ในผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักมีค่าต่ำกว่า 19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคาดการณ์ได้ว่าผลผลิตที่เหลือทั้งหมด คือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรดไขมันระเหยง่าย มีปริมาณสูงกว่า 81 เปอร์เซ็นต์ ผลิตผลก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้นปริมาณนี้ถือว่าให้ผลผลิตต่ำไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง เนื่องจากไม่สามารถจุดติดไฟ (ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และ กรดไขมันระเหยง่าย เป็นสารหน่วงไม่ให้จุดติดไฟ) เป็นที่น่าสังเกตว่าแม้ปริมาณก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น มีปริมาณต่ำ แต่ปฏิกิริยาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเวลาสำหรับการย่อยสลายสารป้อนลิกโนเซลลูโลสลดลง 5 - 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพแบบดั้งเดิม

การทดลองหมักก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพที่ไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง ใช้เวลาในการหมัก 20 วัน ใช้ระยะเวลายาวนานในการผลิตก๊าซชีวภาพ สำหรับงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะลดระยะเวลาการหมักก๊าซชีวภาพ ให้ใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดในกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพ การหมักก๊าซชีวภาพ จำเป็นจะต้องรู้เกี่ยวกับปฏิกิริยาและกลไกการผลิตก๊าซชีวภาพ สำหรับการศึกษาศักยภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ งานวิจัยนี้จึงสนใจใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว

## 2.10 การกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายด้วยตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต

สภาพความเป็นกรด ต่าง เป็นปัจจัยสำคัญต่อการทำงานของแบคทีเรียในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งต้องอาศัยแบคทีเรียสองจำพวกทำงานร่วมกันอย่างต่อเนื่อง ถ้าระบบมีปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย 8000 – 10000 มิลลิกรัม/ลิตร ในรูปของกรดอะซิติกจะเป็นพิษต่อระบบบ่อหมักโดยตรง ดังนั้นในการรักษาสมดุลปริมาณการสร้างกรดจะต้องเท่ากันกับอัตราการนำไปเพื่อสร้างก๊าซมีเทน แต่ถ้ามีการสร้างกรดไขมันระเหยง่ายมากเกินไป จะส่งผลให้ค่า pH ของระบบต่างๆ เกิดการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทน ดังนั้นปัญหาที่มักเกิดขึ้นในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน คือการสะสมของกรดไขมันระเหยง่าย ซึ่งจะทำให้ค่า pH

ลดลง ถ้าระบบไม่มีสภาพบัพเพอร์เพียงพอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ใช้ตัวดูดซับที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่ค่อนข้างเสถียรที่อุณหภูมิปกติ และไม่ทำปฏิกิริยาต่อสารเคมีหลายชนิด แต่สามารถเปลี่ยนรูปแบบได้ โดยตัวดูดซับชนิดอสังฐานจะไวต่อปฏิกิริยา เพราะตัวดูดซับอสังฐานมีพื้นผิวมาก สามารถดูดความชื้นหรือสารที่มีขี้ได้ ส่วนสารละลายกรดจะไม่มีผลต่อตัวดูดซับ ยกเว้นกรดไฮโดรฟลูออริก สำหรับตัวดูดซับที่มีความหนาแน่นสูงจะเกิดปฏิกิริยาได้น้อยกว่าตัวดูดซับที่มีความหนาแน่นต่ำ (แก้วบุดดี, 2557)

การศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้ฟางข้าวที่ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน ให้ได้น้ำตาลก่อนการนำไปหมักก๊าซชีวภาพ โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นการเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพ ในกระบวนการเกิดก๊าซชีวภาพจะมีการเกิดสารพิษ และสารยับยั้งปฏิกิริยาหรือที่เรียกว่า กรดไขมันระเหยง่าย (VFAs) ซึ่งทำให้อะหว่างกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพมีความเป็นกรด ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีเติมตัวดูดซับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) เพื่อดูดซับและปรับสภาวะความเป็นกรดในกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม โดยจะช่วยให้กระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพดำเนินต่อไปได้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพในงานวิจัย

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว โดยการย่อยสลายฟางข้าวด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินให้ได้น้ำตาลก่อนการนำไปหมัก ก๊าซชีวภาพ ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในการผลิตก๊าซชีวภาพให้เกิดเร็วขึ้น ช่วยลดระยะเวลาการผลิตก๊าซชีวภาพ และใช้ตัวดูดซับปุ๋ย แอมโมเนียมซัลเฟต  $[(NH_4)_2SO_4]$  ในการกำจัดกรดไขมันระเหยง่ายช่วยปรับอัตราส่วนค่าคาร์บอน ต่อไนโตรเจนให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซชีวภาพ ในการดำเนินการวิจัยเริ่มจาก ทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ แล้วจึงขยายผลไปหมักในบ่อหมักขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร ที่ได้รับการสนับสนุนจาก บริษัท เซโต (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งเป็นผู้ร่วมทุน โครงการพัฒนานักวิจัย และ งานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) มีรายละเอียดวิธีดำเนินงานวิจัยดังนี้

### 3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินสำหรับใช้ย่อยสลายฟางข้าว

#### 3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

การสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ในป่าดงฮันและป่าสงวนแห่งชาติกกสูง บริเวณ โดยรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด สุ่มเก็บตัวอย่างดินโดยใช้พลั่วขุดหลุมเป็น รูปตัว V ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร แล้วชะเอาดินด้านหนึ่งเป็นแผ่นหนาประมาณ 2 – 3 เซนติเมตร จากปากหลุมถึงก้นหลุมเก็บตัวอย่างดินใส่ในขวดปลอดเชื้อ ปิดฉีกฝาขวด ตัด ฉลากบอกวัน เดือน ปี และสถานที่เก็บตัวอย่างไว้ให้ชัดเจน จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่ ห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นตอน ต่อไป

#### 3.1.2 การแยกแบคทีเรียที่ชอบความร้อน

นำตัวอย่างดินที่เก็บมาชั่งน้ำหนัก 1 กรัม เติมลงในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (*Butterfield's phosphate-buffered*) 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปล่อยให้ดินตกตะกอน จากนั้นนำส่วนของสารละลายตัวอย่างดินที่เตรียมไว้มา 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบลำดับ ส่วน ด้วยวิธี Serial tenfold dilution ที่  $10^{-1}$  จนถึง  $10^{-6}$  ตามลำดับ จากนั้นนำไปเพาะเชื้อบนวุ้นเลี้ยง เชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บแบคทีเรียที่ทำให้บริสุทธิ์ เพาะลงในจานวุ้นเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.1.3 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับตรวจกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสไลติกและลิกนินไลติก

การเตรียมหัวเชื้อสำหรับตรวจกิจกรรมในการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสไลติกและลิกนินไลติก โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์ ในข้อ 3.1.2 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactose Broth (LB) ซึ่งประกอบด้วย เปปทอน 3.0 กรัม เพปโทน 5.0 กรัม และแลคโตส 5.0 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะได้หัวเชื้อที่ต้องการ

### 3.1.4 การคัดเลือกและแยกกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสไลติก

เตรียมหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.1.3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงบนวุ้นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (CMC) ที่ประกอบด้วยเพปโทน 0.2 กรัม/ลิตร, โซเดียมไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ ) 2.0 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 1.0 กรัมต่อลิตร, ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 1.0 กรัมต่อลิตร, โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.5 กรัมต่อลิตร, คาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลส 2.0 กรัมต่อลิตร และวุ้น 1.7 กรัมต่อลิตร ให้ค่า pH เท่ากับ 7.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเตรียมวุ้นอาหารเพาะเชื้อ CMC เรียบร้อยแล้ว ให้เติมสารละลายไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็นเวลา 15 นาที ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีวุ้นอาหารเพาะเชื้อ CMC จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) 1 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที และตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสไลติก ด้วยโคโลนีของแบคทีเรียโดยใช้วิธีทดสอบค่า Hydrolysis capacity (HC) ดังสมการที่ 1

$$HC = \frac{\text{Diameter of Clearing (cm)}}{\text{Diameter of Colony (cm)}} \quad (1)$$

### 3.1.5 การคัดเลือกและแยกกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลิกนินไลติก

เตรียมหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.1.3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ azure-B ที่ประกอบด้วยลิกนิน 10.0 กรัม, แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 4.3 กรัม, แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.3 กรัม, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 4.3 กรัม, แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) 0.3 กรัม, อาหารเลี้ยงเชื้อ azure B 0.1 กรัม และวุ้น 20.0 กรัมต่อลิตร ค่า pH เท่ากับ 7.0 การสลายตัวของลิกนินสามารถตรวจสอบได้จากการสังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย บันทึกผลโดยใช้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เพื่อกำหนดความสามารถในการย่อยสลาย (DC) ของ

แบคทีเรียที่แยกได้ ดังนั้นแบคทีเรียที่แยกได้จากการคัดเลือกและแยกกิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์เซลลูโลสไลติก และลิกนินไลติกที่มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจะถูกวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป

### 3.1.6 การสกัดเอนไซม์อย่างหยาบ

การสกัดเอนไซม์อย่างหยาบ หรือ Crude enzyme extraction เป็นการคัดแยกแบคทีเรีย โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani) 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเชื้อพร้อมเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารแขวนลอย จากนั้นนำส่วนของเหลวเหนือตะกอนที่ปราศจากเซลล์ไปใช้สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์ต่อไป

### 3.1.7 การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส

การวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส ทำได้โดยนำส่วนของเหลวเหนือตะกอนที่ปราศจากเซลล์ในข้อ (3.1.6) บีบมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และอุ่นอาหารเพาะเชื้อ 1 % CMC 0.5 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ซีเตรต 0.05 โมลาร์ ที่ค่า pH เท่ากับ 4.8 ถูกบ่มที่อุณหภูมิ  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมตัวทำปฏิกิริยาไดนิโตรซาลิไซลิก (DNS) 2 มิลลิลิตร และต้มเป็นเวลา 5 นาที พักไว้ให้ปฏิกิริยาเย็นลง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 540 นาโนเมตร และคำนวณกราฟมาตรฐานน้ำตาล โดยที่กิจกรรมการทำงานของเซลลูเลสหนึ่งหน่วยถูกกำหนดให้มีปริมาณเอนไซม์ที่ปล่อยน้ำตาลเท่ากับ 1 ไมโครโมลของน้ำตาลต่อนาที

### 3.1.8 การวิเคราะห์เอนไซม์ลิกนินไลติก

การวิเคราะห์เอนไซม์ลิกนินไลติก ทำได้โดยนำส่วนของเหลวเหนือตะกอนที่ปราศจากเซลล์มาวิเคราะห์ผลกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) ใช้วิธีการออกซิเดชันของเวราทริลแอลกอฮอล์ (veratryl alcohol) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) วิเคราะห์โดยใช้วิธีการออกซิเดชัน 2, 6 ไดเมทอกซีฟีนิล (2, 6-DMP) และกิจกรรมของแลคเคสวิเคราะห์โดยใช้วิธีการออกซิเดชัน 2, 6-DMP เช่นเดียวกัน ตัวอย่างของเอนไซม์อย่างหยาบที่ยังไม่ผ่านกระบวนการใดๆ นำไปหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนและใช้เป็นตัวอย่างควบคุมในการวิเคราะห์ต่อไป

## 3.2 การหมักก๊าซชีวภาพ

### 3.2.1 การย่อยสลายฟางข้าวด้วยแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน

หลังจากเตรียมหัวเชื้อสำหรับการย่อยสลายฟางข้าวจากแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส เขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



การเตรียมตัวอย่างฟางข้าวนำฟางข้าวไปอบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่น และร่อนด้วยตะแกรงเบอร์ 60 จากนั้นเตรียมตัวอย่างฟางข้าวที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 3.5% w/v ตามลำดับ เติมสารเพิ่มการปลดปล่อยที่เตรียมได้จากแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5 กรัมต่อลิตร, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 10 กรัมต่อลิตร, ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 5.0 กรัมต่อลิตร, แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>) 0.1 กรัมต่อลิตร, โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.2 กรัมต่อลิตร และยีสต์ 10.0 กรัมต่อลิตร ค่า pH 7.0 เติมสารเพิ่มการปลดปล่อย 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ที่มีตัวอย่างฟางข้าวที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 3.5% w/v ตามลำดับ เติมหัวเชื้อตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง 5% (v/v) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า 160 รอบต่อนาที จากนั้นจึงนำส่วนเหนือตะกอนไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล โดยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar as glucose, DNS-method) และนำไปเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่างกับสารละลายน้ำตาลน้ำตาลมาตรฐาน

ตัวอย่างฟางข้าวที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 3.5% w/v ที่เตรียมไว้ข้างต้นเติมสารเพิ่มการปลดปล่อย 100 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพชนิดเมือกในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง 5% v/v และบ่มในตู้เพาะเชื้อพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 50±2 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5, 10, 15 และ 20 วัน ตามลำดับ และมีตัวอย่างฟางข้าวที่ไม่ผ่านกระบวนการข้างต้น เป็นตัวควบคุม หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพทำการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด โดยวิธีการไทเทรต และวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัดค่า pH แบบดิจิตอล

### 3.2.2 การพัฒนาหัวเชื้อสำหรับย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน

การเก็บตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง ต้องเตรียมสารละลายที่ใช้ผสมกับของเหลวในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง เพื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในการนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับผลิตก๊าซชีวภาพ โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารละลาย ดังนี้

#### 1. สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer solution)

เตรียมจาก

- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO<sub>3</sub>) 35.0 กรัม
- แอมโมเนียไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 4.0 กรัม
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

## 2. สารละลายแร่ธาตุอาหารหลัก (Macro mineral solution)

เตรียมจาก

- โบตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 6.2 กรัม
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 5.7 กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) 2.22 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.6 กรัม
- ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

## 3. สารละลายแร่ธาตุอาหารรอง (Micro mineral solution)

เตรียมจาก

- แมงกานีสไดคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 10.0 กรัม
- แคลเซียมไดคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 13.2 กรัม
- โคบอลต์ไดคลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 1.0 กรัม
- เฟอร์รัสไตรคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 8.0 กรัม
- ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

หลังจากการเตรียมสารละลายนำสารละลายบัฟเฟอร์ และแร่ธาตุอาหารมาผสม เติมลงในขวดรูปชมพู่ 560 มิลลิลิตร ที่ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านสารละลาย (Flushing) เพื่อไล่ออกซิเจนตลอดเวลา พร้อมทั้งรักษาอุณหภูมิที่  $39 \pm 0.5$  องศาเซลเซียส ทำการเก็บของเหลวจากกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยถ่ายเทของเหลวที่ได้ลงในกระดิกน้ำร้อน เพื่อรักษาอุณหภูมินำของเหลวที่ได้ไปยังห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ดทันที กรองของเหลวในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องผ่านผ้าตาข่าย เทลงในขวดรูปชมพู่ที่เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์และแร่ธาตุอาหารไว้ล่วงหน้าแล้ว 440 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง สำหรับใช้ย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนในการผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป

### 3.2.3 การผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว

การผลิตก๊าซชีวภาพ โดยใช้ฟางข้าวที่ย่อยสลายให้เป็นของเหลวแล้วจะได้สารตั้งต้นในการหมักก๊าซชีวภาพ ซึ่งทำการหมักก๊าซชีวภาพในบ่อหมักขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร ดังแสดงในภาพ 8 ขั้นตอนแรกเติมสารตั้งต้นของเหลวฟางข้าว 50 ลิตร เติมตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง 15 ลิตร และปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  100 กรัม เป็นการควบคุมค่า pH และกรดไขมันระเหยง่ายให้เหมาะสมต่อการหมักก๊าซชีวภาพ ตีกวนผสมให้เข้ากัน

ทำการไล่ก๊าซออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจน หมักก๊าซชีวภาพที่อุณหภูมิ  $39 \pm 0.5$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และสำหรับตัวอย่างฟางข้าวที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยสลายจะเป็นตัวควบคุม ทำการเก็บตัวอย่างก๊าซชีวภาพทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (GC, Agilent Technologies 7820A) ที่ติดตั้งคอลัมน์ Porapak Q ตะแกรงโมเลกุลเป็นสารประเภทซีโอไลต์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยใช้การตรวจจับเปลวไฟไฮโดรเจน (FID) และการตรวจจับการนำความร้อน (TCD) ใช้ก๊าซมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณ และใช้ฮีเลียมเป็นก๊าซพาหะ นำตัวอย่างก๊าซชีวภาพ 10 ไมโครลิตร ฉีดวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีที่ 270 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตรวจจับที่ 300 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของฮีเลียมที่ใช้เป็นก๊าซพาหะอยู่ที่ 26 มิลลิลิตรต่อนาที ค่า psi เท่ากับ 80 ก๊าซไฮโดรเจนมีอัตราการไหลอยู่ที่ 30 มิลลิลิตรต่อนาที ค่า psi เท่ากับ 40 และอัตราการไหลของก๊าซออกซิเจนอยู่ที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ค่า psi เท่ากับ 60



ภาพ 8 แสดงบ่อหมักก๊าซชีวภาพขนาด 1.2 ลูกบาศก์เมตร

### 3.3 การวิเคราะห์ผล

#### 3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินของฟางข้าว สามารถวิเคราะห์โดยใช้ขั้นตอนมาตรฐาน

### 3.3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมซอฟต์แวร์ทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) สำหรับวิเคราะห์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความแตกต่างทางสถิติใช้การทดสอบของ Tukey Test ในการเปรียบเทียบวิธีการที่ระดับนัยสำคัญ 95%



## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 การแยกตัวของแบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสไลติกที่ชอบอุณหภูมิสูง

การย่อยสลายฟางข้าวเป็นการย่อยสลายชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส ให้ได้น้ำตาลสำหรับเป็นสารตั้งต้นผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลาย ซึ่งได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากมีราคาที่ไม่แพง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และใช้พลังงานในการผลิตน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกระบวนการอื่นๆ (Forson Akua Obeng, et al., 2018) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยสลายชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ (Warish Ahmed, et al., 2018)

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการแยกแบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสไลติกที่ชอบอุณหภูมิสูงจากตัวอย่างดิน และศึกษาศักยภาพในการย่อยสลายฟางข้าว เพื่อผลิตน้ำตาลที่จะนำไปใช้สำหรับเป็นสารตั้งต้นผลิตก๊าซชีวภาพ โดยเก็บตัวอย่างแบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสไลติกที่ชอบอุณหภูมิสูงทั้งหมด 106 ตัวอย่าง จากดินในป่าสงวนแห่งชาติดงฮั่นและกกสูง บริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด จังหวัดร้อยเอ็ด ไอโซเลทที่ 96 คิดเป็น 90 % และ ไอโซเลทที่ 16 คิดเป็น 15.1 % ได้รับการทดสอบในเชิงบวกสำหรับกิจกรรมเซลลูโลสไลติกและลิกโนไลติก ตามลำดับ อย่างไรก็ตามมีเพียง 9 ไอโซเลท เท่านั้น ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสชัดเจนมากกว่า 10 มิลลิเมตร ด้วยความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสสูง (HC) ดังแสดงในตาราง 5 ในขณะที่อีก 4 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ลิกโนไลติกได้มากกว่าหนึ่งตัว ดังแสดงในตาราง 6 และความสามารถในการย่อยสลายลิกนินสูง (DC) ในตาราง 4 พบว่าความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสุด มีค่า เท่ากับ 6.8 และ ความสามารถในการย่อยสลายลิกนินสูงสุด มีค่า เท่ากับ 4.0 โดยไอโซเลทที่แยกได้คือ RUF60 และ RUF49 ตามลำดับ และไอโซเลท RUF60 สามารถสร้างกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  มีค่า เท่ากับ  $1.1 \pm 0.05^a$  U/mL และเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทตัวอื่นๆ ดังแสดงในตาราง 6 จะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ค่า  $p > 0.05$  ในการผลิตแลคเคสในกลุ่มไอโซเลท และไอโซเลท RUF60 เป็นหนึ่งในไอโซเลทที่ดีที่สุดในการผลิตแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) และไม่พบกิจกรรมของลิกนินเปอร์ออกซิเดส (LiP) ในไอโซเลทใดๆ ดังแสดงในตาราง 6 ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าของ (Phakamas Rachamontree, et al., 2017) ซึ่งรายงานว่าได้แยก RMU30\_2 จากนาข้าวในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งอยู่ติดกับจังหวัดร้อยเอ็ดได้บันทึกค่าการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสุดไว้ มีค่า เท่ากับ 6.6 ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการรวมตัวของแบคทีเรียเซลลูโลสไลติกจำนวนมาก

ในพื้นที่นี้ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบเซลล์โลสที่มีค่าการย่อยสลายสูงกว่า เมื่อเทียบกับผลการรายงานของนักวิจัยคนอื่นๆ (Lugani Y, et al., 2015) (Mohammed Rawway, et al., 2018) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์โลสที่พบในพื้นที่ที่ทำการศึกษามีค่าการย่อยสลายเซลล์สูง แม้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้บางตัวในการศึกษาครั้งนี้จะมีกิจกรรมในการผลิตแอมโมนีแอสเปอรอกซิเดสที่สูงกว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกัน แต่ถึงอย่างไรไอโซเลท RUFR60 ที่แยกได้ก็ถูกเลือกนำไปใช้ในการย่อยสลายฟางข้าว เพราะมีทั้งกิจกรรมของเซลล์โลส และลิกนินไลติกที่อุณหภูมิสูง  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นความสามารถของไอโซเลท RUFR60 ในการผลิตเอนไซม์เหล่านี้

ความสามารถของในการแยกไอโซเลท RUFR60 ในการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิเทอร์โมฟิลิก มีความสำคัญมากสำหรับการใช้งานในการย่อยสลายทางชีวภาพของฟางข้าว (Arash Hemati, et al., 2018) โดยนักวิจัย (Luaine Bandounas, et al., 2011) ทำการวิจัยและรายงานว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียดีกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อราในเรื่องการทนต่ออุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการวิเคราะห์โดยใช้ของเหลวที่ลอยอยู่เหนือตะกอน ซึ่งปราศจากสิ่งเจือปน และนอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้บางชนิดเหมาะสำหรับการย่อยสลายชีวมวลของลิกนินเซลล์โลสอีกด้วย (Shiqi Ji, et al., 2012) (Gyeongtaek Gong, et al., 2017)

#### ตาราง 5 แสดงการแยกแบคทีเรียด้วยกิจกรรมของเอนไซม์เซลล์โลสไลติก และลิกนินไลติก

ไอโซเลท	พื้นที่ไฮ (มม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)	ค่า HC	พื้นที่ไฮ (มม.)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)	ค่า DC
RUFR31	28.3	9.0	3.1	Nil	5.9	Nil
RUFR45	88.1	18.0	4.9	48.1	14.2	3.4
RUFR49	54.4	15.3	3.5	49.4	12.4	4.0
RUFR50	54.3	11.0	4.9	14.3	7.3	2.0
RUFR60	102.2	15.0	6.8	48.2	13.2	3.7
RUFR66	52.0	12.0	4.4	21.0	8.6	2.5
RUFR77	51.4	10.3	5.0	Nil	6.5	Nil

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	พื้นที่ไต (มม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)	ค่า HC	พื้นที่ไต (มม.)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)	ค่า DC
RUFR81	49.2	10.0	4.9	29.2	8.9	3.3
RUFR93	30.1	16.3	1.9	19.1	8.2	2.3

หมายเหตุ : Nil หมายถึง ไม่มีอยู่จริง

ตาราง 7 แสดงการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสไลติก และลิกนินไลติกของแบคทีเรีย  
ไอโซเลท

ไอโซเลท	การทำงานของเอนไซม์ (U/mL)			
	เซลลูโลส	LiP	MnP	แลคเคส
RUFR31	0.6 ± 0.05 <sup>c</sup>	ND	ND	ND
RUFR45	0.9 ± 0.06 <sup>b</sup>	ND	1.3734 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.0497 ± 0.01 <sup>a</sup>
RUFR49	0.6 ± 0.04 <sup>c</sup>	ND	1.3734 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.0635 ± 0.01 <sup>a</sup>
RUFR50	0.6 ± 0.04 <sup>c</sup>	ND	ND	0.0598 ± 0.01 <sup>a</sup>
RUFR60	1.1 ± 0.05 <sup>a</sup>	ND	1.4624 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.0674 ± 0.01 <sup>a</sup>
RUFR66	0.6 ± 0.04 <sup>c</sup>	ND	1.6389 ± 0.11 <sup>a</sup>	ND
RUFR77	0.9 ± 0.06 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
RUFR81	0.6 ± 0.05 <sup>c</sup>	ND	1.4536 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.0573 ± 0.01 <sup>a</sup>
RUFR93	0.4 ± 0.04 <sup>d</sup>	ND	1.5253 ± 0.06 <sup>a</sup>	ND

#### หมายเหตุ

ข้อมูล ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n มีค่าเท่ากับ 3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรยกกำลัง (a,b,c,d) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

LiP หมายถึง แทนลิกนินเปอร์ออกซิเดส

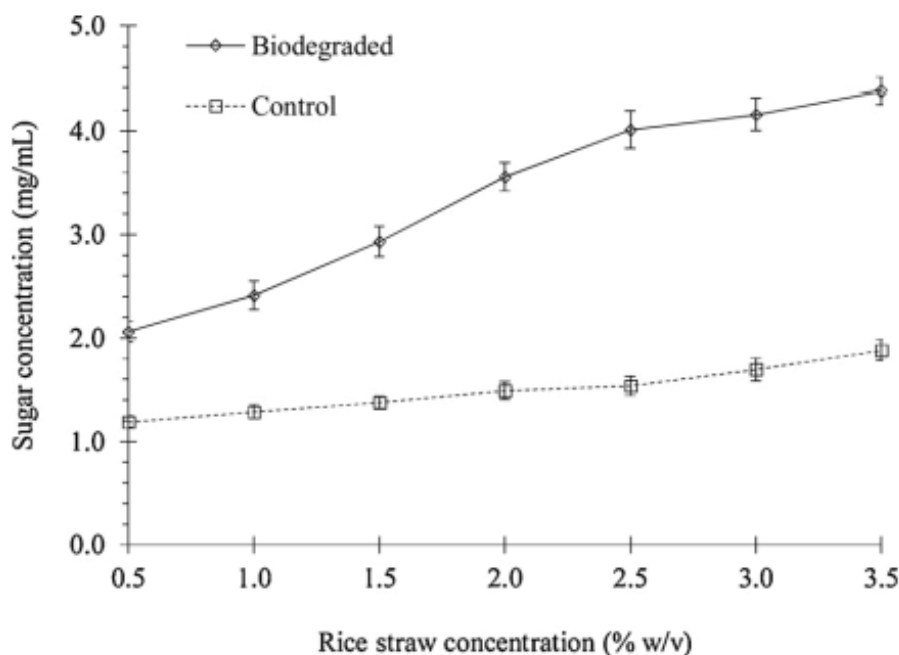
MnP หมายถึง แทนแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ND หมายถึง แทนการตรวจไม่พบ

#### 4.2 การย่อยสลายฟางข้าวด้วยแบคทีเรียไอโซเลท

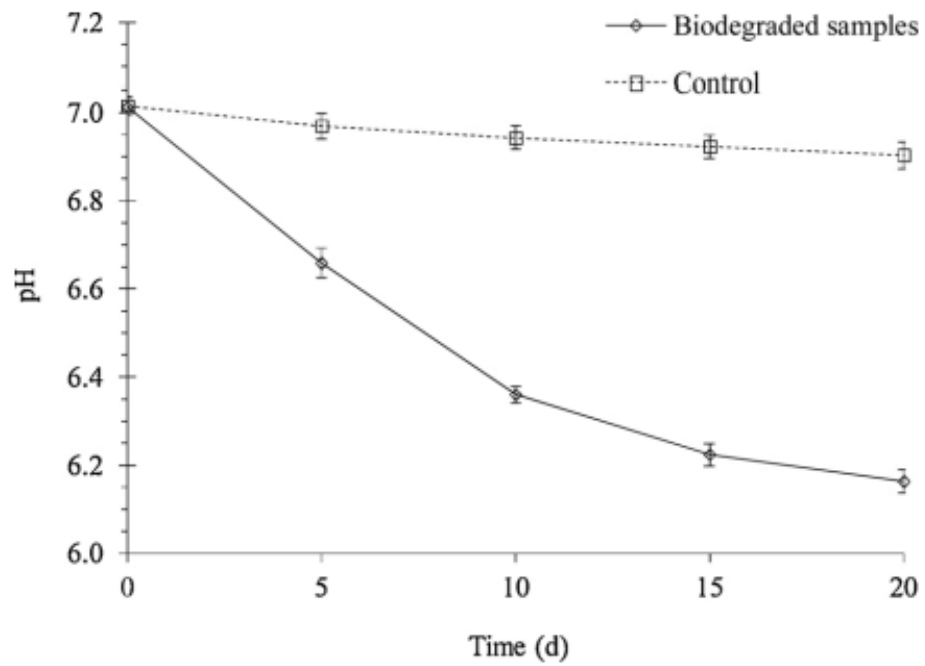
การทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสไลติกและลิกนินโนไลติก สำหรับกิจกรรมของไอโซเลท RUF60 ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล หลังจากนำไปย่อยสลายฟางข้าวที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 %w/v ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 9 พบว่าปริมาณน้ำตาลที่วัดได้จากการย่อยสลายฟางข้าวทางชีวภาพ มีปริมาณน้ำตาลสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างควบคุม โดยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ค่า  $p < 0.05$  ที่ความเข้มข้น 3.5 %w/v มีปริมาณน้ำตาลสูงสุด เท่ากับ  $4.38 \pm 0.13$  mg/mL และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า  $p > 0.05$  จากปริมาณน้ำตาลที่วัดได้เท่ากับ  $4.16 \pm 0.15$  และ  $4.01 \pm 0.18$  mg/mL ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของฟางข้าว 3.0 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ การย่อยสลายลิกนิน และการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสมีความสำคัญมากกับการผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อให้ได้ปริมาณก๊าซชีวภาพที่สูงขึ้นในงานวิจัย (Jin. W., et al., 2014) แนะนำให้เติมแบคทีเรียในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ เพื่อเพิ่มการย่อยสลายของชีวมวลลิกนินเซลลูโลส ในการผลิตน้ำตาลให้ได้ปริมาณที่สูงขึ้น (Weizhang Zhong, et al., 2011) อย่างไรก็ตามในการแยกกิจกรรมของแบคทีเรีย RUF60 สำหรับการศึกษานี้สามารถทำให้เกิดเอนไซม์เซลลูโลสไลติกและลิกนินโนไลติก สำหรับการย่อยสลายฟางข้าวโดยแบคทีเรียนี้มีผลต่อการย่อยสลายของชีวมวลลิกนินเซลลูโลส ทำให้ปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลที่ความเข้มข้นของฟางข้าว เท่ากับ 2.5 %w/v ในการศึกษาและผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป สำหรับการเลือกใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายฟางข้าว มีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมพลังงานชีวภาพ และสามารถลดระยะเวลาในการย่อยสลายฟางข้าวได้ ซึ่งเป็นการลดระยะเวลาการผลิตก๊าซชีวภาพ และเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพอีกด้วย



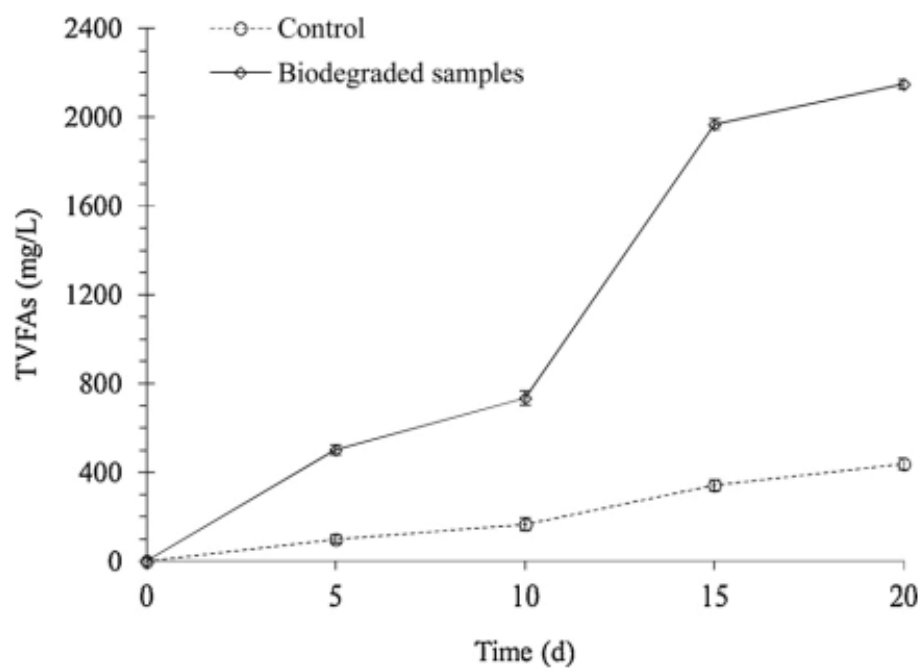


ภาพ 9 แสดงผลที่เกิดขึ้นของความเข้มข้นฟางข้าวต่อกิจกรรมการแยกสาร RUF60

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด เบส และกรดไขมันระเหยง่ายจากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยแบคทีเรีย พบว่าค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วจากค่าเริ่มต้นที่ 7.0 เป็น 6.36 ในวันที่ 10 หลังจากนั้นค่า pH ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 20 ค่า pH เท่ากับ 6.16 ดังแสดงในภาพ 10 ซึ่งแตกต่างจากค่า TVFA ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 15 ค่า TVFA เท่ากับ 1968.06 mg/L หลังจากนั้นค่า TVFA เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 20 ค่า TVFA เท่ากับ 2148.34 mg/L ดังแสดงในภาพ 11 อย่างไรก็ตามจากการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของค่า pH และค่า TVFA ดังแสดงในภาพ 10 และ 11 สามารถสังเกตได้จากกราฟแสดงผลการทดลอง โดยที่ค่า TVFA มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และค่า pH มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ข้อสังเกตนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ (Weizhang Zhong, et al., 2011) และงานวิจัยของ (Irene Siegert and Charles Banks, 2005) พบว่าค่า TVFA ที่สูงกว่า 2000 mg/L ยับยั้งการทำงานของเซลล์จุลินทรีย์และด้วยเหตุนี้ระยะเวลาการย่อยสลายที่เหมาะสมที่สุดคือไม่เกิน 15 วัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากจะช่วยลดระยะเวลาการหมักก๊าซชีวภาพ ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพอีกด้วย



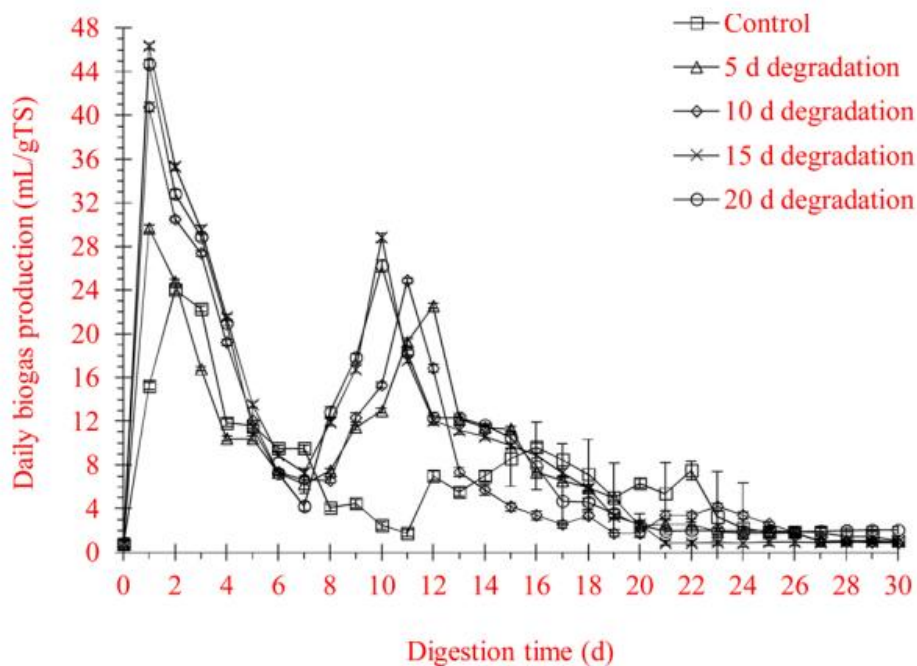
ภาพ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า pH ต่อเวลาในการหมักก๊าซชีวภาพ



ภาพ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า TVFA ต่อเวลาในการหมักก๊าซชีวภาพ

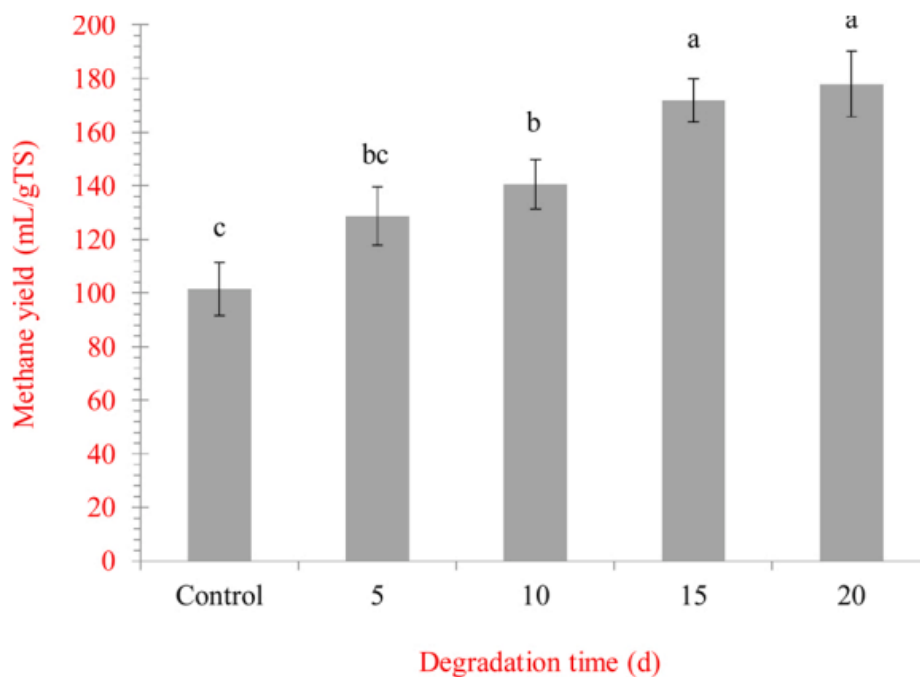
### 4.3 การผลิตก๊าซชีวภาพ

จากการทดลองปริมาณของก๊าซชีวภาพ และปริมาตรของก๊าซมีเทน ดังแสดงในภาพ 12 การหมักก๊าซชีวภาพจากการย่อยสลายฟางข้าวเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยมีการเปรียบเทียบผลที่ได้กับกลุ่มควบคุม โดยกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจากการย่อยสลายฟางข้าวทางชีวภาพสามารถผลิตก๊าซชีวภาพเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งบ่งชี้ถึงผลกระทบที่สำคัญของการใช้แบคทีเรียในการย่อยสลายฟางข้าวก่อนการหมักก๊าซชีวภาพ เป็นการเสื่อมสภาพของโครงสร้างคอมโพสิตของคาร์โบไฮเดรตที่มีความสำคัญมากในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพ (Weizhang Zhong, et al., 2011) ซึ่งในการหมักก๊าซชีวภาพครั้งนี้ได้ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากสัตว์เคี้ยวเอื้องอีกด้วย จากกราฟดังแสดงใน ภาพ 12 พบว่าในวันที่ 1 และวันที่ 10 – 12 สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ในปริมาณที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และฟางข้าวที่นำมาย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพแล้วนำไปหมักก๊าซชีวภาพสามารถลดระยะเวลาการผลิตก๊าซชีวภาพได้ใน 15 วัน อย่างมีนัยสำคัญ  $p$  เท่ากับ 0.05 โดยปริมาตรก๊าซชีวภาพสูงสุดวันที่ 1 มีค่าเท่ากับ 4,633.84 mL/วัน และในวันที่ 2 กลุ่มควบคุมสามารถผลิตก๊าซได้ในปริมาณ 2,404.13 mL/วัน ซึ่งเมื่อเทียบกันแล้วมีปริมาตรสูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 48 % ตามที่ได้รายงานผลไปก่อนหน้านี้การย่อยสลายทางชีวภาพเป็นเวลานานกว่า 15 วัน ทำให้เกิดค่า TVFA สูง ซึ่งอาจมีผลยับยั้งกิจกรรมของเซลล์โลไลติกที่อาจมีส่วนทำให้ค่า  $p < 0.05$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวเป็นเวลา 20 วัน เมื่อเทียบกับเวลา 15 วัน จึงเป็นระยะเวลาที่สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้อย่างรวดเร็ว และลดระยะเวลาการผลิตก๊าซชีวภาพ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพอีกด้วย



ภาพ 12 แสดงการผลิตก๊าซชีวภาพจากการย่อยสลายฟางข้าว และกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 30 วัน

การผลิตก๊าซมีเทนของฟางข้าวที่ย่อยสลายทางชีวภาพ และกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพ 13 ตัวอย่างฟางข้าวที่ผ่านการย่อยสลายทางชีวภาพแล้ว มีปริมาตรก๊าซมีเทนในช่วง 1,286.13 – 1,779.30 mL ซึ่งสูงกว่าปริมาตรก๊าซชีวภาพของกลุ่มควบคุม 21.10 – 42.97 % มีปริมาตร 1,014.72 mL การทดลองมีปริมาตรก๊าซมีเทนสูงสุดที่ 1,779.30 mL ใช้เวลาในการหมักก๊าซชีวภาพ 20 วัน อย่างไรก็ตามค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ค่า  $p > 0.05$  จากการบันทึกผล 15 วัน ที่ปริมาตรก๊าซมีเทน 1,717.21 mL ดังนั้นช่วงเวลา 15 วัน จึงเป็นช่วงการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว (Jin. W., et al., 2014) ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายฟางข้าวด้วยแบคทีเรียที่ชอบความร้อนยังสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟางข้าวให้น้ำตาลน้ำตาลในการนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ และการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาของเหลวในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องยังสามารถช่วยเพิ่มปริมาตรก๊าซชีวภาพได้ (Weizhang Zhong, et al., 2011) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตก๊าซมีเทนได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวที่ย่อยสลายทางชีวภาพ และช่วยลดระยะเวลาในการผลิตก๊าซชีวภาพจากปกติใช้เวลานานถึง 30 วัน ลดเหลือ 15 วัน ซึ่งเป็นประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจอีกด้วย



ภาพ 13 แสดงผลผลิตก๊าซมีเทนจากฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ และกลุ่มควบคุม

#### 4.4 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักของฟางข้าว

การย่อยสลายฟางข้าวทางชีวภาพก่อนนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ องค์ประกอบหลักของฟางข้าวมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากกระบวนการย่อยสลายฟางข้าวทางชีวภาพ พบว่าองค์ประกอบทางเคมีหลักของสารที่ตกค้างจากการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจน ในกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวที่ย่อยสลายด้วยชีวภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญ  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตาราง 7 การเปลี่ยนแปลงเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสติกที่มีอุณหภูมิสูง และจุลินทรีย์ในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความซับซ้อนในระหว่างกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ และกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจนตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพและการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว (Regina J. Patinvoh, et al., 2016)

การผลิตก๊าซชีวภาพจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลสจำเป็นต้องมีกระบวนการปรับสภาพก่อนเพื่อสลายโครงสร้างที่ซับซ้อน อย่างไรก็ตามเทคนิคการปรับสภาพชีวมวลในปริมาณที่เยอะมาก ๆ เพื่อให้ได้พลังงานที่สูง ลดต้นทุนการผลิต สามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้นั้น (Chen

Sun, et al., 2016) การใช้แบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสติก ที่อุณหภูมิเทอร์โมฟิลิกในการย่อยสลายชีวมวลของลิกโนเซลลูโลสนี้ใช้พลังงานน้อย ทำให้เกิดเป็นเทคนิคทางเลือกสำหรับกระบวนการปรับสภาพชีวมวลก่อนการนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ การศึกษาในครั้งนี้จึงนำเสนอข้อมูลที่สำคัญสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ในการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวโดยใช้แบคทีเรียลิกโนเซลลูโลสติก และจุลินทรีย์ในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องสำหรับย่อยสลาย และหมักก๊าซชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจน ตามลำดับ นอกจากนี้การผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าวที่ย่อยสลายทางชีวภาพยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบการย่อยสลายทางชีวภาพ และกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพอีกด้วย

**ตาราง 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหลักของฟางข้าวในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ**

องค์ประกอบ (% dw)	ของแข็งทั้งหมด (%)	ลิกนิน (%)	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)
ชีวมวล	100.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	16.89 ± 0.18 <sup>a</sup>	37.88 ± 0.32 <sup>a</sup>	11.03 ± 0.38 <sup>f</sup>
กลุ่มควบคุม	87.55 ± 0.44 <sup>b</sup>	15.15 ± 0.09 <sup>b</sup>	32.20 ± 0.27 <sup>b</sup>	18.40 ± 0.26 <sup>b</sup>
5 วัน	75.55 ± 0.59 <sup>c</sup>	13.12 ± 0.10 <sup>c</sup>	26.30 ± 0.43 <sup>c</sup>	16.80 ± 0.32 <sup>c</sup>
10 วัน	65.36 ± 0.67 <sup>d</sup>	10.58 ± 0.13 <sup>d</sup>	20.29 ± 0.24 <sup>d</sup>	13.21 ± 0.24 <sup>d</sup>
15 วัน	49.05 ± 1.03 <sup>e</sup>	9.17 ± 0.11 <sup>e</sup>	12.06 ± 0.41 <sup>e</sup>	11.19 ± 0.31 <sup>e</sup>
20 วัน	47.47 ± 0.50 <sup>e</sup>	8.79 ± 0.11 <sup>f</sup>	11.03 ± 0.38 <sup>f</sup>	10.12 ± 0.45 <sup>f</sup>

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวยกกำลัง (<sup>a,b,c,d,e,f</sup>) ในคอลัมน์เดียวกันไม่มีนัยสำคัญ ต่างกันที่ระดับความมั่นใจ 95%; dw แทนน้ำหนักแห้ง

## บทที่ 5

### บทสรุป

ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและชุมชน โดยใช้ชีวมวลฟางข้าวในการนำมาผลิตก๊าซชีวภาพเป็นการลดการเผาฟางข้าว อันเป็นสาเหตุหลักในการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นสู่ชั้นบรรยากาศ ทำให้เกิดฝุ่น pm 2.5 ที่ส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจทำให้สุขภาพอ่อนแอ เจ็บป่วย และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เกิดภาวะโลกร้อน ในงานวิจัยนี้ได้นำฟางข้าวมาผลิตก๊าซชีวภาพ โดยเริ่มจากการคัดแยกจุลินทรีย์จากดินทำได้โดยการเก็บตัวอย่างดิน บริเวณป่าดงฮัน และป่าสงวนแห่งชาติกกสูง มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด คัดแยกแบคทีเรียที่ชอบความร้อน และทดสอบการทำงานของเอนไซม์เซลลูโลสไลติก จากนั้นนำมาสกัดอย่างหยาบวิเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ลิกนินไนด์ติก จากการทดลองพบว่าการคัดแยกแบคทีเรียทำให้ได้ไอโซเลท RUFR 60 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายฟางข้าว เป็นการย่อยสลายเซลลูโลสให้น้ำตาลในปริมาณที่สูง มีค่าเท่ากับ 6.8 และ ความสามารถในการย่อยสลายลิกนินสูงสุด มีค่าเท่ากับ 4.0 สามารถสร้างกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  มีค่าเท่ากับ  $1.1 \pm 0.05^a$  U/mL เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทตัวอื่นๆ ที่ความเข้มข้นฟางข้าว 3.5 %w/v มีปริมาณน้ำตาลสูงสุด เท่ากับ  $4.38 \pm 0.13$  mg/mL และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า  $p > 0.05$  จากปริมาณน้ำตาลที่วัดได้เท่ากับ  $4.16 \pm 0.15$  และ  $4.01 \pm 0.18$  mg/mL ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของฟางข้าว 3.0 และ 2.5 %w/v ตามลำดับ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกความเข้มข้นของฟางข้าว เท่ากับ 2.5 %w/v ในการศึกษาและผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป โดยกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพใช้ระยะเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าในวันที่ 1 และวันที่ 10 - 12 สามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ในปริมาณที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และฟางข้าวที่นำมาย่อยสลายให้น้ำตาลก่อนการนำไปหมักก๊าซชีวภาพพบว่าสามารถลดระยะเวลาการผลิตก๊าซชีวภาพได้ใน 15 วัน อย่างมีนัยสำคัญ  $p$  เท่ากับ 0.05 โดยปริมาตรก๊าซชีวภาพสูงสุดวันที่ 1 มีค่าเท่ากับ 4,633.84 mL/วัน และในวันที่ 2 กลุ่มควบคุมสามารถผลิตก๊าซชีวภาพได้ในปริมาตร 2,404.13 mL/วัน ซึ่งเมื่อเทียบกันแล้วมีปริมาตรสูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 48 % และการทดลองมีปริมาตรก๊าซมีเทนสูงสุดที่ 1,779.30 mL ใช้เวลาในการหมักก๊าซชีวภาพ 20 วัน อย่างไรก็ตาม ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ค่า  $p > 0.05$  จากการบันทึกผล 15 วัน ที่ปริมาตรก๊าซมีเทน 1,717.21 mL ดังนั้นช่วงเวลา 15 วัน จึงเป็นช่วงการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการย่อยสลายฟาง

ข้าวด้วยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินให้ได้น้ำตาลก่อนนำไปผลิตก๊าซชีวภาพ และการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาของเหลวในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องยังสามารถช่วยเพิ่มปริมาณก๊าซชีวภาพได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตก๊าซมีเทนได้อย่างมีนัยสำคัญ และช่วยลดระยะเวลาในการผลิตก๊าซชีวภาพจากปกติใช้เวลานานถึง 30 วัน ลดเหลือ 15 วัน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อชุมชน และอุตสาหกรรมต่อไป





## บรรณานุกรม

- คัทลียา เงินจั่น. (2555). การดูดซับฟอรั่มมัลดีไฮต์ในน้ำเสียจากโรงงานผลิตกระดาษ จังหวัดสมุทรสาคร ด้วยซังข้าวโพดและถ่านซังข้าวโพด. กรุงเทพมหานคร.
- ฉัตรกมล แก้วบุตดี. (2557). การเพิ่มอายุของเหล็กประจุศูนย์ขนาดนาโนเมตรด้วยวัสดุมีโซพอร์สที่ผลิตได้จาก ซิลิกา ที่สกัดจากเกลบต่อการรีดักชันไนเตรท. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นฤมล เชาวกระโทก. (2556). การผลิตก๊าซชีวภาพจากกากตะกอนดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบร่วมกับน้ำ เสียจากโรงงานแปรรูปอาหารแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นฤมล ทองไว. (2544). การแยกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถใช้แป้งหรือไคตินเพื่อการผลิตกรดแลคติก: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- บุญชัย วิจิตรเสถียร และพัชรินทร์ ราชโซ. (2557). การพัฒนากระบวนการย่อยแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพื่อบำบัดตะกอนส่วนเกินจากระบบบำบัดน้ำเสีย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- พรเทพ ถนนวนแก้ว. (2538). ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณ ป่าภูพานศรีนคราญณ์ *Agave sisalana* Perrine. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พลกฤษณ์ คุ่มกล้า. (2557). การผลิตก๊าซชีวภาพจากฟางข้าว. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.
- พิจิตรา ตั้งเขื่อนขันธุ์, รสรินทร์ รุจนานนท์ และอัญชลี อานาตสมบุญ. (2548). การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิต เอนไซม์ เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- ภัทรา และคณะ. (2551). การคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร. กรุงเทพมหานคร: คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าธนบุรี.
- เมธา วรณพัฒน์. (2533). โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัย

ขอนแก่น, ขอนแก่น.

- ระพีพรรณ. (2536). **แบคทีเรียในกระเพาะหมักของโคพื้นเมืองและการผลิตเอโนไซม์เซลลูเลส**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- รัชพล พะวงศรีรัตน์. (2558). กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. *Veridian E-Journal Science and Technology Silpakorn University*, 2, 1.
- ศศิธร ไกรฤทธิชัย. (2552). **การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอโนไซม์เซลลูเลส เพื่อการย่อยสลายใบไม้**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สมรักษ์ พันธุ์ผล. (2535). **การย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส**: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อภิชาติ ศรีภักย์. (2555). **การใช้ประโยชน์จากเปลือกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพื่อเป็นอาหารหยาบสำหรับโคชาวลำพูน**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, คณะเกษตรศาสตร์.
- Ahmed, Warish, A.Hamilton, Kerry, Lobos, Aldo, Hughes, Bridie, Staley, Christopher, Sadowsky, Michael J. et al. (2018). Quantitative microbial risk assessment of microbial source tracking markers in recreational water contaminated with fresh untreated and secondary treated sewage. *Environment International*, 117, 243-249.
- Arantes, Valdeir and Saddler, Jack N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 3, 4.
- Artkla, Surachai, Grisdanurak, Nurak, Neramittagapong, Suthasinee and Wittayakun, Jatuporn. (2008a). Characterization and catalytic performance on transesterification of palm olein of potassium oxide supported on RH-MCM-41 from rice husk silica. *Suranaree J. Sci. Technol*, 15(2), 133-138.
- Artkla, Surachai, Grisdanurak, Nurak, Neramittagapong, Suthasinee and Wittayakun, Jatuporn. (2008b). CHARACTERIZATION AND CATALYTIC PERFORMANCE ON TRANSESTERIFICATION OF PALM OLEIN OF POTASSIUM OXIDE SUPPORTED ON RH-MCM-41 FROM RICE HUSK SILICA. *Suranaree J. Sci. Technol*, 15(2), 133-138.

- Babel, Sandhya, Sae-Tang, Jenjira and Pecharaply, Athapol. (2009). Anaerobic co-digestion of sewage and brewery sludge for biogas production and land application. **International Journal of Environmental Science & Technology**, 6(1), 131-140.
- Balat, Mustafa. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, 858-875.
- Bandounas, Luaine, Wierckx, Nick JP, Winde, Johannes H de and Ruijssenaars, Harald J. (2011). Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. **BMC Biotechnology**, 11(94).
- Barnes, S. P. and Keller, J. (2003) Cellulosic waste degradation by rumen-enhanced anaerobic digestion. Vol. 48 (pp. 155-162).
- Cardinale, B. J. (2011). Biodiversity improves water quality through niche partitioning. **Nature**, 472, 86–89.
- Chaikumpollert, Oraphin, Methacanon, Pawadee and Suchiva, Krisda. (2004). Structural elucidation of hemicelluloses from Vetiver grass. **Carbohydrate Polymers**, 57(2), 191-196.
- Chen, Ming, Xia, Liming and Xue, Peijian. (2007). Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 85-89.
- Dobre, Paul, Nicolae, Farcaş and Matei, Florentina. (2014). Main factors affecting biogas production-an overview. **Romanian Biotechnological Letters**, 19(3), 9283-9296.
- Elwyn, T. Reese, Ralphs, G. H. Siu and Hillel, S. Levinson. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis.
- Fan, L T, Gharpuray, M M and Lee, Y H. (1987). Cellulose Hydrolysis. Berlin, Germany. **Springer-Verlag**, 3: 1-68.
- Gomez, J M, Delgado, J A, Uguina, M A, Sotelo, J L and Ruiz, B. (2006). Fixed-bed adsorption of carbon dioxide/methane mixtures on silicalite pellets. **Springer**, 12,

5–18.

- Gong, Gyeongtaek, SeilKim, Sun-MiLee, MinWoo, Han, HyunPark, Tai and Um, Youngsoon. (2017). Complete genome sequence of *Bacillus* sp. 275, producing extracellular cellulolytic, xylanolytic and ligninolytic enzymes. **Journal of Biotechnology**, 254, 59-62.
- Gupta, L., Kumar, R.A., Ghanshyam, T. et al. (2012). Effect of feeding different proportions of groundnut haulms (*Arachis hypogaea*) and cluster bean straw (*Cyamopsis tetragonoloba*) on nutrient utilisation and serum biochemical parameters in dromedary camels. **Trop Anim Health Prod**, 44, 1689–1695.
- Hemati, Arash, Aliasgharzad, Nasser and RezaKhakvar. (2018). In vitro evaluation of lignocellulolytic activity of thermophilic bacteria isolated from different composts and soils of Iran. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 14, 424-430.
- Hendriks, ATWM and Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, 100(1), 10-18.
- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L. and Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, 2(12), 602-619.
- Hu, Zhen-Hu and Yu, Han-Qing. (2005). Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. **Process Biochemistry**, 40(7), 2371-2377. doi: 10.1016/j.procbio.2004.09.021
- Ikram-ul-Haq, Javed, Muhammad Mohsin, Khan, Tehmina Saleem and Siddiq, Zafar. (2005). Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 1(3), 241-245.
- Ikram-ul-Haq, Muhammad Mohsin Javed and Tehmina, Saleem Khan. (2006). An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. **African Journal of Biotechnology**, 5(8), 609-614.
- Ji, Shiqi, Wang, Shian, Tan, Yang, Chen, Xiaohua, Schwarz, Wolfgang and Li, Fuli. (2012).

- An untapped bacterial cellulolytic community enriched from coastal marine sediment under anaerobic and thermophilic conditions. **JOURNAL ARTICLE, FEMS Microbiology Letters**, 335(1), 39–46.
- Jin, W., Xu, X., Gao, Y., Yang, F. and Wang, G. (2014). Anaerobic fermentation of biogas liquid pretreated maize straw by rumen microorganisms in vitro. **Bioresource technology**, 153, 8-14.
- Klyosov, A. (1990). Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Biochemistry**, 29(47), 10577–10585.
- Lee, B. H. and Blackburn, T. H. (1975). Cellulase Production by a Thermophilic Clostridium Species. **ASM Journals Applied Microbiology**, 30, 3.
- Lee, You-Jung et al., (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource technology**, 378-386.
- Mandels, M and Reese, E T. (1957). INDUCTION OF CELLULASE IN TRICHODERMA VIRIDE AS INFLUENCED BY CARBON SOURCES AND METALS. **Biology Branch, Pioneering Research Division**. Natick, Massachusetts: Ur. S. Army Quartermaster Research and Development Center.
- Mary, Mandels, John, E. Medeiros, Raymond, E. Andreotti and Frank, H. Bissett. (1981). Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulase culture filtrates under use conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, 2009-2026.
- Murphy, JD, McKeogh, E and Kiely, G. (2004). Technical/economic/environmental analysis of biogas utilisation. **Applied Energy**, 77(4), 407-427.
- Obeng, Forson Akua, Gyasi, Pokuaa Belinda, Olu-Taiwo, Michael and Ayeh-kumi, F. Patrick. (2018). Microbial Assessment of Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) Sold at Some Central Markets in Ghana. **BioMed Research International, Food Microbiology(Special Issue)**.
- Oikawa, Tadao, Takagi, Miho and Ameyama, Minoru. (1994). Detection of Carboxymethyl Cellulase Activity in *Acetobacter xylinum* KU-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 58(11), 2102–2103.

- Patinvoh, Regina J., Feuk-Lagerstedt, Elisabeth, Lundin, Magnus, Horváth, Ilona Sárvári and Taherzadeh, Mohammad J. (2016). Biological Pretreatment of Chicken Feather and Biogas Production from Total Broth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 180, 1401 – 1415.
- Polprasert, C, Dan, NP and Thayalakumaran, N. (1996). Application of constructed wetlands to treat some toxic wastewaters under tropical conditions. **Water Science and Technology**, 34(11), 165-171.
- Rachamontree, Phakamas, Douzou, Tom, Cheenkachorn, Kraipat, Sriariyanun, Malinee and Rattanaporn, Kittipong. (2017). Furfural: A Sustainable Platform Chemical and Fuel. 13(1.).
- Rawway, Mohammed, Ali, Salah G. and Badawy, Ahmed S. (2018). Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Different Sources at Assiut Governorate (Upper Egypt). **Journal of Ecology of Health & Environment, An International Journal**, 6(1), 15-24.
- Ray, A.K., Bairagi, A., Sarkar, Ghosh K. and Sen, S.K. (2007). Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. **Acta Ichthyol. Piscat**, 37(1), 47–53.
- Reese, E. T. and Levinson, H. S. (1952). A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. **Physiol. Plantarum**, 5, 345-366.
- Selby and Maitland. (1967). The cellulase of *Trichoderma viride* Separation of the components involved in the solubilization of cotton. **Biochemical Journal**, 104(3), 716–724.
- Siegert, Irene and Banks, Charles. (2005). The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. **Process Biochemistry**, 40(11), 3412-3418.
- Sreekrishnan, T., Kohli, S. and Rana, V. (2004). Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques a review. **Bioresource technology**, 95(1), 1-10.
- Sreekrishnan, TR, Kohli, Sangeeta and Rana, Vineet. (2004). Enhancement of biogas

- production from solid substrates using different techniques—a review. **Bioresource technology**, 95(1), 1-10.
- Stutzenberger, Fred J. (1971). Cellulase Production by *Thermomonospora curvata* Isolated from Municipal Solid Waste Compost. **ASM Journals. Applied and Environmental Microbiology**, 22, 2.
- Sun, Chen, Cao, Weixing, Banks, Charles J., Heaven, Sonia and Liu, Ronghou. (2016). Biogas production from undiluted chicken manure and maize silage: A study of ammonia inhibition in high solids anaerobic digestion. **Bioresource technology**, 218, 1215-1223.
- Sun, Ye and Cheng, Jiayang. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, 1-11.
- Tippayawong, N., Promwungkwa, A. and Rerkkriangkrai, P. (2007). Long-term operation of a small biogas/diesel dual-fuel engine for on-farm electricity generation. **Biosystems Engineering**, 98(1), 26-32. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2007.06. 013
- Ueda, T., Kunimitsu, Y. and Shinogi, Y. (2007). Potential conflicts for the reuse of rice husk in Thailand. **Paddy and Water Environment**, 5(2), 123-129. doi: 10.1007/s10333-007-0069-7
- Van Soest, P. J. (1984). Some physical characteristics of dietary fibres and their influence on the microbial ecology of the human colon. **Proceedings of the Nutrition Society**, 43(1), 25-33.
- Van Soest, Peter J. (1984). Some physical characteristics of dietary fibres and their influence on the microbial ecology of the human colon. **Proceedings of the Nutrition Society**, 43(1), 25-33.
- Vinay, K. Singh and Anil, Kumar. (1998). Production and purification of an extracellular cellulase from *Bacillus brevis* vs-1. **IUBMB Journals**, 45(3), 443-452.
- Wang, Jinzhou, Wang, Xiujun, Xu, Minggang, Feng, Gu, Zhang, Wenju and Lu, Chang'ai. (2015). Crop yield and soil organic matter after long-term straw return to soil in China. **Springer**, 102, 371–381.
- Wang, Junfeng et al. (2017). High efficiency of inorganic nitrogen removal by integrating

biofilm-electrode with constructed wetland: Autotrophic denitrifying bacteria analysis. **Bioresource technology**, 7-14.

Y, Lugani, R, Singla and S, Sooch B. (2015). Optimization of cellulase from newly isolated *Bacillus* sp. Y3. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, 5(11), 1-6.

Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T. R., Kohli, S. and Rana, V. (2004). Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - a review. **Bioresource technology**, 95(1), 1-10. doi: 10.1016/j.biortech.2004.02.010

Zhong, Weizhang, Zhang, Zhongzhi, Luo, Yijing, Sun, Shanshan, Qiao, Wei and MengXiao. (2011). Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. **Bioresource technology**, 102(24), 11177-11182.







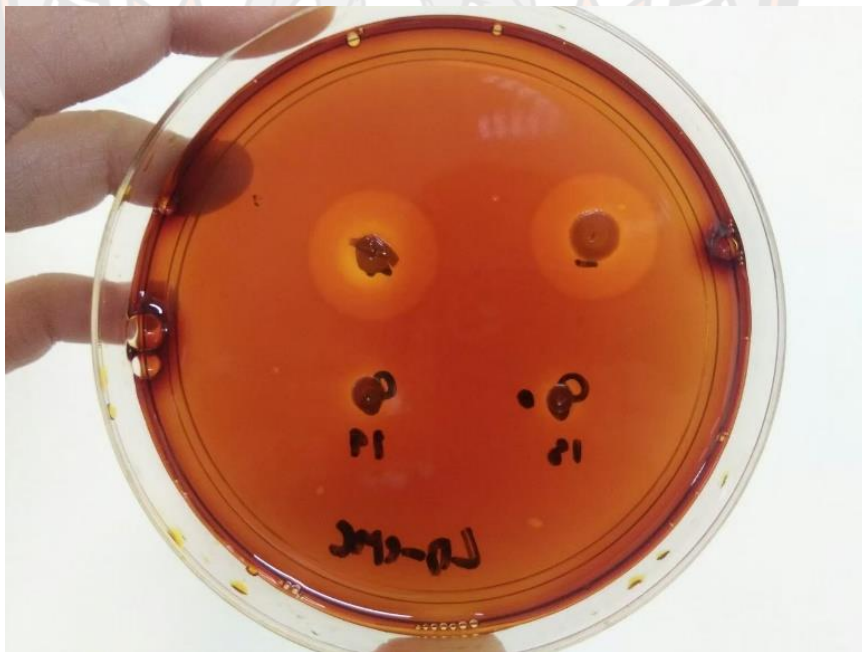


ภาคผนวก ก

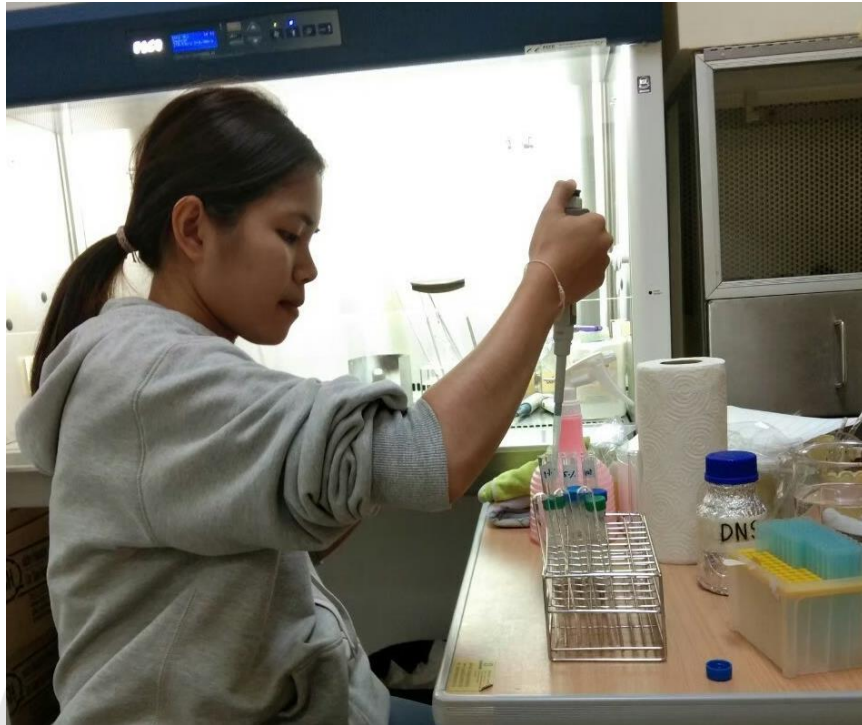
การคัดแยกจุลินทรีย์จากดินสำหรับใช้ย่อยสลายฟางข้าว



ภาพ 14 แสดงการเตรียมตัวอย่างดินเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย



ภาพ 15 แสดงผลการคัดแยกแบคทีเรียจากดิน



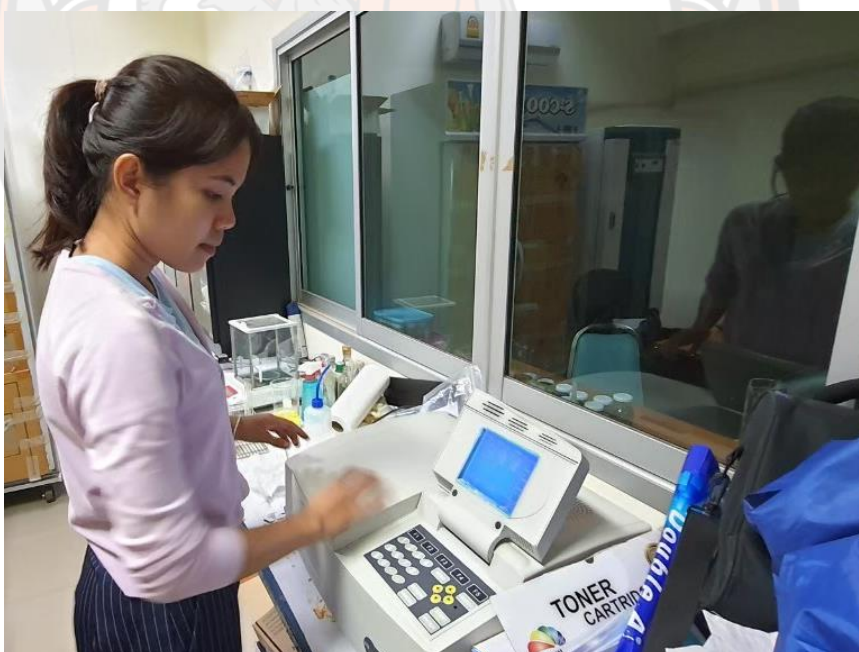
ภาพ 16 แสดงการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง



ภาพ 17 แสดงการย่อยสลายฟางข้าวจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน



ภาพ 18 แสดงการเก็บตัวอย่างของเหลวจากการย่อยสลายฟางข้าวเพื่อนำไปวิเคราะห์



ภาพ 19 แสดงการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลจากการย่อยสลายฟางข้าวจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน



ภาพ 20 แสดงการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลน้ำตาลจากการย่อยสลาย  
ฟางข้าว



ภาพ 21 แสดงการเก็บแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยเลี้ยงในอาหารเหลว LB  
สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

### การหมักก๊าซชีวภาพ



ภาพ 22 แสดงบ่อหมักก๊าซชีวภาพที่ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท เซโต ประเทศไทย จำกัด



ภาพ 23 แสดงการลงพื้นที่หมักก๊าซชีวภาพ



ภาพ 24 แสดงการย่อยสลายฟางข้าวเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ

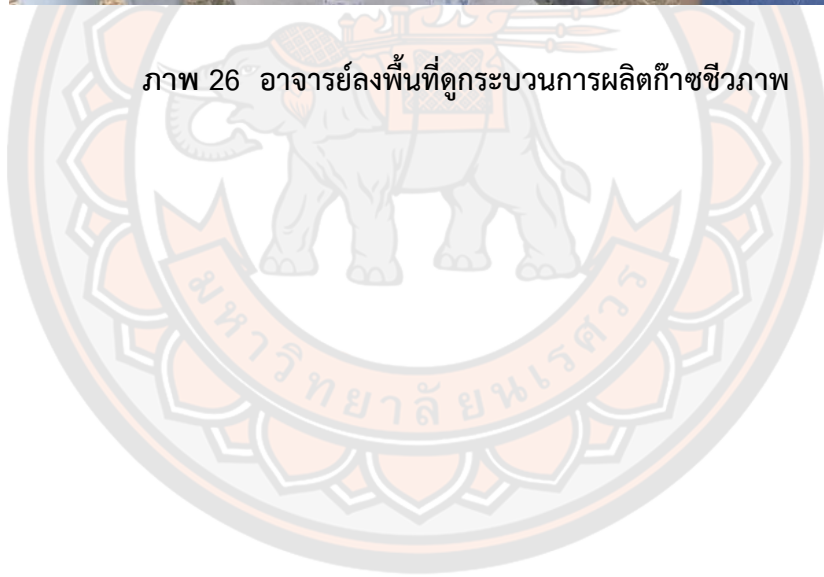


ภาพ 25 แสดงการเก็บตัวอย่างของเหลวจากการย่อยสลายฟางข้าวในแต่ละวัน

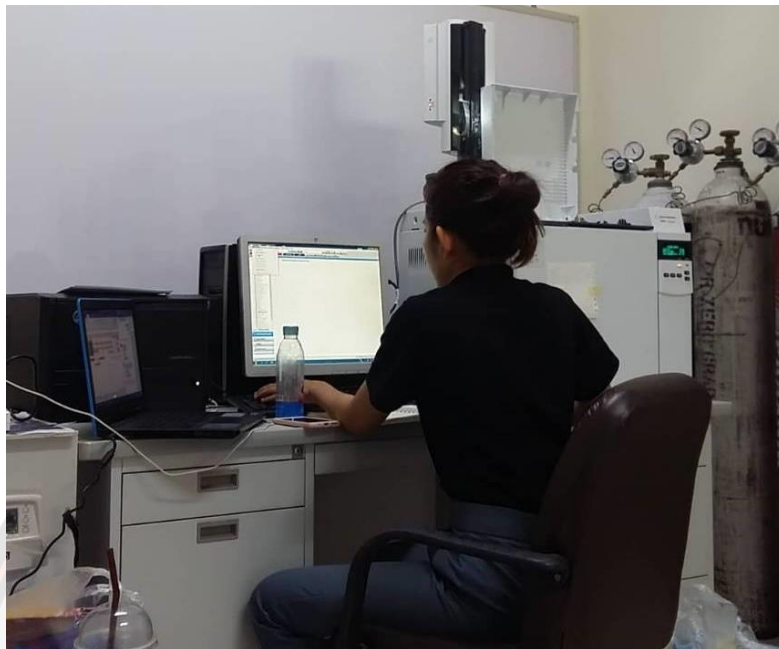




ภาพ 26 อาจารย์ลงพื้นที่ดูกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพ



## การวิเคราะห์ผล



ภาพ 27 แสดงการวัดปริมาณก๊าซมีเทนที่เก็บจากบ่อหมักก๊าซชีวภาพ

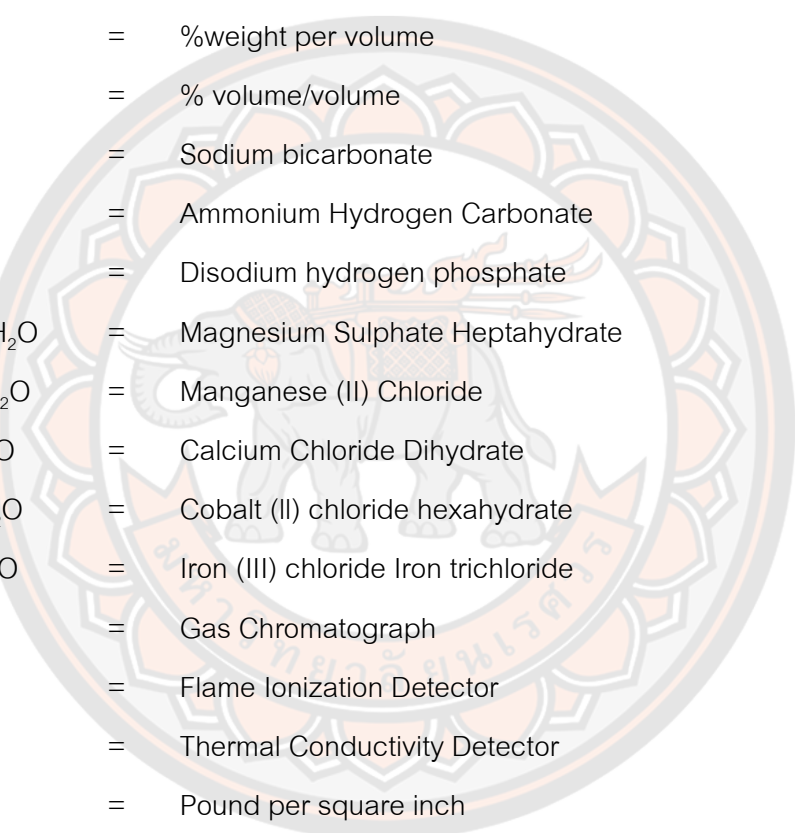


ภาพ 28 อาจารย์ร่วมเสนอแนะแนวทางในการทำการวิจัย



## อักษรย่อ

PM 2.5	=	Particulate matter with diameter of less than 2.5 micron
CH <sub>4</sub>	=	Methane
CO <sub>2</sub>	=	Carbon dioxide
N <sub>2</sub>	=	Nitrogen
H <sub>2</sub>	=	Hydrogen
H <sub>2</sub> S	=	Hydrogen sulfide
O <sub>2</sub>	=	Oxygen
HRT	=	Hydraulic Retention Time
VFAs	=	Volatile Fatty acids
mg/L	=	Milligram per liter
pH	=	Positive potential of the Hydrogen ions
C/N	=	Carbon/Nitrogen Ratio
CH <sub>2</sub> OH	=	Methanol
CMC	=	Carboxy Methyl Cellulose
HEC	=	Hydroxyl-Ethyl Cellulose
mRNA	=	messenger Ribonucleic Acid
cAMP	=	Cyclic adenosine 3',5' monophosphate
DNS	=	dinitro salicylic acid reagent
pNPG	=	p-nitrophenyl-β-D-glucoside
LB	=	Lactose Broth
NaNO <sub>3</sub>	=	Nitrate
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	=	Magnesium Sulphate Heptahydrate
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	=	Dipotassium phosphate
KCl	=	Potassium chloride
NaCl	=	Sodium chloridr
HC	=	Hydrolysis capacity
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	=	Ammonium Sulfate



$\text{KH}_2\text{PO}_4$	=	Potassium dihydrogen phosphate
$\text{CaCl}_2$	=	Calcium chloride
DC	=	Degradation capacity
OD	=	Optical density
LiP	=	Lignin peroxidases
MnP	=	Manganese peroxidase
2, 6-DMP	=	Dimethoxyphenol
%w/v	=	%weight per volume
%v/v	=	% volume/volume
$\text{NaHCO}_2$	=	Sodium bicarbonate
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	=	Ammonium Hydrogen Carbonate
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	=	Disodium hydrogen phosphate
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	=	Magnesium Sulphate Heptahydrate
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	=	Manganese (II) Chloride
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	=	Calcium Chloride Dihydrate
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	=	Cobalt (II) chloride hexahydrate
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	=	Iron (III) chloride Iron trichloride
GC	=	Gas Chromatograph
FID	=	Flame Ionization Detector
TCD	=	Thermal Conductivity Detector
Psi	=	Pound per square inch
HC	=	Hydrocarbon
MnP	=	Manganese peroxidase
TVFA	=	Total Volatile Fatty Acid
mg/L	=	Milligram per liter
mL	=	Milliliter
% dw	=	Dry weight



ภาคผนวก ค

## อภิธานศัพท์

### อภิธานศัพท์

จุลินทรีย์	: สิ่งที่มีชีวิตขนาดเล็กมาก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นเครื่องมือช่วยในการมองเห็น เช่น ยีสต์ โปรโตซัว แบคทีเรีย ไวรัส รา เป็นต้น
แบคทีเรีย	สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเซลล์เดียว ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ขนาดเล็กมาก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีรูปร่างกลม เป็นแท่ง หรือเกลียว
เซลลูโลส	สารประกอบคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ซับซ้อน มีสูตร (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลมากมายเชื่อมโยงกัน ลักษณะเป็นของแข็ง ไม่มีสี ไม่มี กลิ่น ไม่มีรส ไม่ละลายในน้ำ เป็นองค์ประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของพืช
เซลลูเลส	เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของเซลลูโลสที่พันธะบีตา-1, 4-ไกลโคไซด์ได้เป็นเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลน้ำตาล 2 หน่วย
เอนไซม์	น้ำย่อย, สารอินทรีย์ประเภทโปรตีน มีอยู่ทั้งในพืช และสัตว์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีของกรรมวิธีต่าง ๆ ทางชีววิทยา เช่น การย่อยอาหาร กระบวนการเมแทบอลิซึม
Biogas	: ก๊าซชีวภาพ หรือที่เรียกกันว่า ไบโอก๊าซ (Biogas) หรือไบโอมีเทน (Biomethane) เป็น ก๊าซ ที่ผลิตได้จากกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ เช่น น้ำเสีย ชีวมวล และมูลสัตว์ ด้วยจุลินทรีย์ในสภาวะ ไร้ออกซิเจน (Anaerobic Digestion)
Biomass	: ชีวมวล (Biomass) เป็นแหล่งกักเก็บพลังงานของพืชที่ต้องอาศัยแสงอาทิตย์ในการสังเคราะห์แสงและเจริญเติบโต จากนั้นแปรเปลี่ยนสภาพเป็นของแข็งหรือแปรสภาพเป็นของเหลวที่สามารถนำมาใช้เป็นพลังงาน

- ทดแทนพลังงานจากฟอสซิลได้จัดเป็นพลังงานหมุนเวียน (Renewable Energy)
- PM 2.5 : ฝุ่น PM2.5 คือ ฝุ่นละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 2.5 ไมครอน หรือมีขนาดประมาณ 1 ใน 25 ของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นผมมนุษย์ ฝุ่นขนาดเล็กจิ๋วนี้ เกิดขึ้นจากกิจกรรมหลายชนิด อาทิเช่น การเผาไหม้ของเครื่องยนต์ และการก่อสร้าง
- Anaerobic digestion : ก๊าซชีวภาพเกิดจากการหมักของสารอินทรีย์โดยมีจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียเช่นจุลินทรีย์กลุ่มสร้างมีเทน (methane-producing bacteria) หรือเมทาโนเจน และจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรด (acid-producing bacteria) มาช่วยย่อยในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน ในกระบวนการย่อยในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน เป็นการที่จุลินทรีย์ต่างๆ ทำปฏิกิริยาย่อยสลายสารอินทรีย์ ลงจากสิ่งมีชีวิตซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนลงเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนน้อยลงเป็นขั้นๆ ไป
- Hydraulic Retention Time, HRT : ระยะเวลาที่เก็บน้ำเสียในถังปฏิกรณ์ต่างๆ ส่วนมากจะใช้น้ำน้อยกว่าเวลาน้ำเสียเข้าระบบแต่ละส่วนมี HRT เท่าไหร่ เช่น HRT ของถังเติมอากาศ 6 ชั่วโมง, HRT ของถังตกตะกอน 2 ชั่วโมง เป็นต้น
- Volatile Fatty acids, VFAs : Volatile fatty acids (VFA) หรือกรดไขมันระเหย เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก เป็นต้น เป็นกลุ่มของสารประกอบที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเคมี ที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นในรูปของขยะอุตสาหกรรม ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลังงานชีวภาพ (Bioenergy) เป็นต้น
- Rumen fluid : ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง