



## รายงานการวิจัย

การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิซซ์-ฟิล์มไบโอรีแอกเตอร์  
แบบต่อเนื่อง  
(Development of ethanol production by continuous fixed-film  
bioreactor)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



## รายงานการวิจัย

การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิกซ์-ฟิล์มไบโอรีแอกเตอร์  
แบบต่อเนื่อง  
(Development of ethanol production by continuous fixed-film  
bioreactor)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. สिरาภรณ์ โพธิวิษยานนท์

สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม

สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2561

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิช-ฟิล์มไบโอรีแอกเตอร์แบบต่อเนื่อง” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2557 ซึ่งสำเร็จจุล่งด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้ให้โอกาสและให้การสนับสนุนแก่คณะวิจัยในการศึกษาวิจัย ทำให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ท้ายนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานการวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์แก่วงการวิจัย และเกิดประโยชน์ต่อการผลิตพลังงานของประเทศไทยต่อไป

คณะผู้วิจัย



## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการต่อยอดการพัฒนาความสามารถของจุลินทรีย์ *Petrobacter* sp. SUTSP5 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film EthaRex or FEthaRex) ที่อัตราส่วนก๊าซผสมคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจน 15 : 25 : 40 %v โดยมีอัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 100 ml/min. และอัตราการไหลของของเหลวไหลเวียน 20 ml/min. พบว่าระบบนี้สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 0.1305 g/L/hr และเพิ่มขึ้นเป็น 0.1780 g/L/hr ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ และพบว่าระบบ FEthaRex ยังคงสามารถผลิตได้ต่อเนื่องเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซผสมมากขึ้นเป็น 30 : 50 : 20 %v โดยมีอัตราการผลิตอยู่ที่ 0.1585 g/L/hr. และเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นเป็น 0.2132 g/L/hr. นอกจากนี้ยังพบว่าระบบยังคงสามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นภายหลังจากการหยุดให้ก๊าซผสม ซึ่งมีอัตราการผลิตสูงสุด 1.9860 g/L/hr. คิดเป็นความเข้มข้นของเอทานอล 6.0411%v ในชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา โดยจุลินทรีย์ภายในระบบมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย  $10^7$  CFU/ml จากผลการศึกษาการพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์มนี้ช่วยส่งเสริมให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลของระบบมีการผลิตได้มากขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำสำคัญ (keywords): เอทานอล (Ethanol) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (Carbon monoxide) ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen) ระบบฟิสิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film) ระบบการผลิตเอทานอล (FEthaRex system) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล (Ethanol producing microorganisms)

## Abstract

The ethanol producing bacteria as *Petrobacter* sp. SUTSP5 was developed for improving the efficiency of ethanol production with fixed-film EthaRex or FEthaRex system. In this study, the carbon rich gas composed of CO<sub>2</sub>:CO:H<sub>2</sub> in a ratio of 15:25:40 % by volume were pump upward into FEthaRex column at a flow rate of 100 ml/min. and the nutrient liquid medium was recirculated at a flow rate 20 ml/min. The results showed that system produced of ethanol concentration approximately 0.1305 g/L/hr. within 24 hrs. and slightly increased to 0.1780 g/L/h. after 48 hrs. of operation time. The ethanol concentrations were still in the trend of increasing from 0.1585 g/L/hr. and up to 0.2132 g/L/hr. when the gas flow rate increased to 30:50:20 % by volume. Furthermore, the FEthaRex system was continuously performed when the system was operated without mixed gas feeding. As a result, the maximum ethanol concentration revealed 1.9860 g/ L/ hr. or 6.0411% by volume at 48 hrs of study with ethanol producing cells approximately 10<sup>7</sup> CFU/ml. Therefore, the FEthaRex system showed the capability to promote of ethanol production.

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.2 การเกาะและการหลุดของฟิล์มชีวะ	19
2.6.3 องค์ประกอบทางเคมีของฟิล์มชีวะ	20
2.7 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์	20
2.7.1 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์	20
2.7.2 คุณลักษณะที่ดีของตัวพุงที่ใช้ในการตรึงเซลล์	22
2.7.3 ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงรูป	23
2.7.4 ข้อจำกัดในการใช้เซลล์ตรึงรูป	23
2.8 คาร์บอนมอนอกไซด์	24
2.8.1 ผลกระทบของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ต่อสภาวะแวดล้อม	24
2.8.2 ผลกระทบของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ต่อสุขภาพอนามัย	25
2.9 คาร์บอนไดออกไซด์	26
2.9.1 ประโยชน์ของคาร์บอนไดออกไซด์	26
2.9.2 ผลกระทบของคาร์บอนไดออกไซด์	26
2.10 ก๊าซไฮโดรเจน	27
2.11 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	31
3.1 รูปแบบการวิจัย	31
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	31
3.2.1 จุลินทรีย์ในการทดลอง (Ethanol producing microorganisms)	31
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Enrichment medium)	31
3.2.3 สารอาหารรวมในถังปฏิกริยา (Combination nutrient)	31
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย	32
3.4 การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอล (Continuous fixed-film bioreactor)	32
3.4.1 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)	32
3.4.2 ระบบการผลิตเอทานอลแบบฟิกซ์-ฟิล์ม (Continuous fixed-film bioreactor)	33
3.4.3 การวิเคราะห์ผล	36

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	38
4.1 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (Cell immobilization)	38
4.2 การศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film)	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	47
5.1 การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมด้วยจุลินทรีย์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล	47
5.2 พารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมด้วยระบบ EthaRex	48
5.3 ข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	50
ภาคผนวก	58
ประวัติผู้วิจัย	83



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักก๊าซคาร์บอนเพื่อการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ	11
ตารางที่ 2-2 ข้อดีและข้อเสียของการตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว	21
ตารางที่ 3-1 สภาวะและตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย	35
ตารางที่ 4-1 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลาการศึกษา	39
ตารางที่ 4-2 การสุ่ม (Random) ชั่งน้ำหนักตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring หลังจากการตรึงเซลล์ (Cell immobilization)	40
ตารางที่ 4-3 ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้จากก๊าซผสม 15 : 25 : 40 %v ด้วยระบบ FEthaRex	41
ตารางที่ 4-4 ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้จากก๊าซผสม 30 : 50 : 20 %v ด้วยระบบ FEthaRex	42
ตารางที่ 4-5 ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้จากการให้ก๊าซผสม 30 : 50 : 20 %v แบบกึ่งกะของ ระบบ FEthaRex	44
ตารางที่ 4-6 น้ำหนักของตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring ที่เพิ่มขึ้นภายหลังจากการเดินระบบ	45



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 การเกิดเอทานอลจากกระบวนการเกิดก๊าซหรือก๊าซสังเคราะห์ และกระบวนการหมัก	7
ภาพที่ 2-2 กระบวนการผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์	9
ภาพที่ 2-3 กระบวนการผ่านเข้าออกของสารเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์แบบฟิล์มตรึง	19
ภาพที่ 2-4 แบบจำลองการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์มรีแอกเตอร์แบบต่อเนื่อง	30
ภาพที่ 3-1 ตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall ring สำหรับให้จุลินทรีย์ยึดเกาะ	33
ภาพที่ 3-2 การตรึงจุลินทรีย์บนตัวกลาง (Cell immobilization)	33
ภาพที่ 3-3 แบบจำลองระบบการผลิตเอทานอลจากระบบ Continuous fixed-film bioreactor (1. CO <sub>2</sub> gas; 2. CO gas; 3. H <sub>2</sub> gas; 4. Flow meter; 5. Regulator; 6. 3-way connector tank; 7. Fixed-film bioreactor; 8. Peristaltic pump; 9. Recirculation tank)	34
ภาพที่ 3-4 การผลิตเอทานอลจากระบบ Continuous fixed-film bioreactor (FEthaRex system)	35
ภาพที่ 4-1 กระบวนการเกิดฟิล์มชีวภาพ (Biofilm formation)	40
ภาพที่ 4-2 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตจากก๊าซผสม ด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างกัน	43
ภาพที่ 4-3 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ <i>Petrobacter</i> sp. SUTSP5	45

## คำอธิบายสัญลักษณ์

ATP	=	Adenosine triphosphate
CFU/ml	=	Colony Forming Unit per Milliliter
CO	=	Carbonmonoxide
CO <sub>2</sub>	=	Carbondioxide
N <sub>2</sub>	=	Nitrogen gas
H <sub>2</sub>	=	Hydrogen gas
HbCO	=	Carboxyhemoglobin
ml/min	=	Milliliter per minute
m <sup>3</sup>	=	Cubic meter
M	=	Molarity (mol/L)
MTBE	=	Methyl Tertiary Butyl Ether
GC-FID	=	Gas Chromatography-Flame Ionization Detector

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
2.1 กระบวนการผลิตเอทานอล	3
2.2 กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ	5
2.2.1 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาล	5
2.2.2 การผลิตเอทานอลทางชีวภาพจากก๊าซสังเคราะห์	6
2.3 การผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนเพียงพอ	7
2.4 กระบวนการหมักเอทานอล	11
2.4.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)	11
2.4.2 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)	12
2.4.3 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)	14
2.4.4 การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation)	14
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอลด้วยก๊าซคาร์บอนเพียงพอ	14
2.6 ระบบตรึงผิวชีวภาพ (Cell-immobilized/Fixed-film system)	17
2.6.1 ฟิล์มชีวภาพ (Bio-film)	18

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การพัฒนาแนวคิดในการนำก๊าซที่ปล่อยจากกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมหรือในการเผาไหม้ซึ่งเป็นปัญหาทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ มาใช้ในการผลิตเอทานอล (Demirbas et al., 2002) นั้น กำลังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเกิดพลังงานทดแทนในรูปของเอทานอลและทำให้ลดมลพิษทางอากาศที่เกิดจากอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งกระบวนการที่ทำให้ก๊าซคาร์บอนนี้เปลี่ยนไปเป็นพลังงานเชื้อเพลิงนั้นมีหลายวิธีไม่ว่าจะเป็นวิธีทางเคมี (Chemical catalysts) โดยใช้ตัวกระตุ้น (Activators) หรือวิธีทางชีวภาพ (Biological conversion) อย่างไรก็ตามวิธีทางเคมีนั้นยังไม่มีประสิทธิภาพมากพอในการผลิตเอทานอล (Stiles et al., 1991) ส่วนวิธีทางชีวภาพทำให้ทั่วโลกสามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ  $48.7 \times 10^6$  m<sup>3</sup> ต่อปี โดยเฉพาะประเทศบราซิลและสหรัฐอเมริกามีความสามารถในการผลิตได้ถึง 72.6% ของทั่วโลก ขณะที่ประเทศไทย ผลิตได้เพียง 0.72% เท่านั้น (RFA, 2007) ในขณะเดียวกันมีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการที่จะทำให้เกิดเอทานอลมากขึ้น เช่น การผลิตเอทานอลด้วยจุลินทรีย์ในระบบหมักแบบกะ การผลิตเอทานอลด้วยกรวมหมักแบบต่อเนื่อง (Zeikus, 1980; Alterthum and Ingram, 1989; Weuster-Botz., 1993; Lynd et al., 2002; Demain et al., 2005) ซึ่งในการพัฒนากรวมหมักแบบต่อเนื่องนั้นพบว่าสามารถทำให้เกิดปริมาณเอทานอลมากขึ้นได้โดยไม่เกิดปัญหาเอทานอลทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ (Christen et al., 1990; Cysewski and Wilke, 1977) และมีการศึกษาเกี่ยวกับการทำให้ปริมาณชีวมวล (Biomass) เพิ่มขึ้นซึ่งจะทำให้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการทำให้มีเซลล์จุลินทรีย์หมุนเวียนในระบบ (Cell recycle) (Tin and Mawson, 1993) และการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในระบบ (Cell immobilization) (Ngyuyen and Shich, 1992) ทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลมากขึ้น ดังนั้นการนำระบบ Continuous fixed-film bioreactor มาช่วยในการผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนซึ่งเป็นพลังงานสะอาดชนิดหนึ่งมาเป็นสารตั้งต้นร่วมอาจช่วยทำให้เกิดปริมาณเอทานอลมากขึ้น

### 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบ continuous fixed-film bioreactor

1.2.2 เพื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมด้วยระบบ continuous fixed-film bioreactor

### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในระบบ continuous fixed-film bioreactor ได้แก่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูง ซึ่งได้จากการคัดแยก หาสายพันธุ์และทดสอบการผลิตเอทานอลแล้วจากงานวิจัยเรื่องการผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์โดยเชื้อจุลินทรีย์ และจากการศึกษาพัฒนาระบบ EthaRex

1.3.2 พัฒนาความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมซึ่งได้แก่คาร์บอนทั้ง 2 ชนิดและก๊าซไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่สังเคราะห์ขึ้น

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มการผลิตเอทานอลจากระบบที่มีองค์ประกอบก๊าซผสมซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากก๊าซมลพิษมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตด้วยจุลินทรีย์

1.4.2 สามารถนำจุลินทรีย์และระบบการผลิตเอทานอลที่ศึกษาวิจัยเป็นแนวทางให้แก่ภาคอุตสาหกรรมที่มีการปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ รวมทั้งนำก๊าซไฮโดรเจนซึ่งเป็นพลังงานสะอาดนำไปประยุกต์ใช้โดยการนำก๊าซดังกล่าวไปผลิตเอทานอลต่อไป

1.4.3 เป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้แก่ภาคอุตสาหกรรมในการลดมลพิษที่เกิดจากก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

1.4.4 เขียนบทความเพื่อเผยแพร่ผลการวิจัย หรือตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารทางด้านพลังงานและสิ่งแวดล้อม

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

เอทานอล (Ethanol) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol)” หมายถึง แอลกอฮอล์ มีสูตรเคมี  $C_2H_5OH$  เอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จุดเดือดที่ความดันบรรยากาศประมาณ 78 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -115 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นที่ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $0.789 \text{ g/cm}^3$  ให้ค่าพลังงานความร้อน (Calorific value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 12,800 บีทียูต่อปอนด์ หรือประมาณ 7,100 แคลลอรี่ต่อกรัม ในสภาวะปกติเอทานอลจะเป็นของเหลวใส ระเหยง่ายมีรสขมและมีกลิ่นเฉพาะตัว ระเหยง่ายจุดไฟติด ละลายในน้ำและสารอินทรีย์อื่นๆ ได้ดี ประโยชน์ใช้สอยของเอทานอลมีหลายประการ เช่น ใช้เป็นเครื่องต้มแอลกอฮอล์ ใช้ในการผลิตยา ใช้เป็นตัวทำละลายในการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหลายชนิด ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและสารชีวเคมี ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อขับเคลื่อนเครื่องยนต์ และใช้เป็นสารเพิ่มออกเทนให้แก่น้ำมันเบนซินสำหรับรถยนต์ ซึ่งสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เป็นต้น โดยกระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพมีองค์ความรู้ประกอบการศึกษา ดังนี้

- 2.1 กระบวนการผลิตเอทานอล
- 2.2 กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ
- 2.3 การผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนเพียงพอ (Carbon-rich gas)
- 2.4 กระบวนการหมักเอทานอล
- 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอลด้วยก๊าซคาร์บอนเพียงพอ (Fermentation conditions of carbon-rich gas)
- 2.6 ระบบตรึงผิวชีวภาพ (Cell-immobilized/Fixed-film system)
- 2.7 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์
- 2.8 ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์
- 2.9 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- 2.10 ก๊าซไฮโดรเจน
- 2.11 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

#### 2.1 กระบวนการผลิตเอทานอล

เชื้อเพลิงเอทานอล หรือ Ethyl Alcohol คือแอลกอฮอล์ที่แปรรูปมาจากพืชจำพวกแป้งและน้ำตาล รวมทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยผ่านกระบวนการหมัก (Fermentation) วัตถุดิบที่ใช้เพื่อการผลิตเอทานอลแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

1) สารจำพวกน้ำตาล (Saccharide material) ได้แก่ อ้อยและกากน้ำตาล ซึ่งจะนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลได้โดยตรง

2) สารจำพวกแป้ง (Starchy material) ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี และมันสำปะหลัง โดยที่ก่อนจะนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล สารจำพวกแป้งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารจำพวกน้ำตาลโดยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis) เสียก่อน

3) สารจำพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส (Cellulose and hemicellulose) ซึ่งก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลจะต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นสารจำพวกน้ำตาลเสียก่อน สารจำพวกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ พืชที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ

น้ำมันแก๊สโซฮอล์ (Gasohol) เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเบนซิน เกิดจากการผสมของน้ำมันเบนซินกับเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 หรือเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ การผสมแอลกอฮอล์ลงในน้ำมันเบนซินในข้างต้น เป็นในลักษณะของสารเติมแต่ง ปรับปรุงค่า Oxygenates และออกเทน (Octane) ของน้ำมันเบนซิน ซึ่งสามารถใช้ทดแทนสารเติมแต่ง คือ Methyl-Tertiary- Butyl-Ether (MTBE) กระบวนการผลิตเอทานอล ประกอบด้วย กระบวนการเตรียมวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล กระบวนการหมัก และการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบนั้น ถ้าเป็นประเภทแป้งหรือเซลลูโลส เช่น มันสำปะหลังและธัญพืช จะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยแป้งหรือเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์ ส่วนวัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น กากน้ำตาลหรือน้ำอ้อย เมื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมแล้วสามารถนำไปหมักได้ ในกระบวนการหมักจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ยีสต์ นอกจากนี้ยังมีการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนหรือ Synthesis gas หรือ Syngas มาผ่านกระบวนการปรับสภาพของก๊าซหรือเรียกว่า กระบวนการที่ทำให้เกิดก๊าซ (Gasification) แล้วนำไปผ่านกระบวนการหมัก (Fermentation) ด้วยจุลินทรีย์ เช่น จุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรดอะซิติก (Acetogenic organisms) หรือจุลินทรีย์ตรึงคาร์บอน (Carbon-fixing microorganisms) ซึ่งสามารถหมักก๊าซสังเคราะห์ดังกล่าวเป็นเอทานอลได้ด้วยเช่นเดียวกัน (Rajagopalan et al., 2002; Maddipati et al., 2011; Latif et al., 2014; Esquivel-Elzondo et al., 2017; Sun et al., 2018) รวมถึงมีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์แบบฟิล์มตรึง (Fixed-film) เช่น การตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034 ใน calcium alginate (McGhe et al., 1982) หรือตรึงเซลล์ *Candida shehatae* บนกากมะพร้าวและซังข้าวโพด (Yuvadatkun et al., 2018) เพื่อเพิ่มความสามารถของเซลล์ในการใช้วัตถุดิบและเพิ่มผลผลิต (Yield) ของการหมัก เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ได้ดำเนินการศึกษาการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ฟิล์มตรึงบนตัวกลางพลาสติก Polypropylene ring (PP ring) มาใช้พัฒนาความสามารถของจุลินทรีย์ให้มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลให้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้การเลือกใช้ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบที่นำมาหมัก จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักคือ เอทิลแอลกอฮอล์

หรือเอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร น้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักจะนำมาแยกเอทานอลออกโดยใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 95 โดยปริมาตร จากนั้นจึงเข้าสู่กรรมวิธีในการแยกน้ำโดยใช้โมเลกุลซีฟ (molecular sieve separation) เอทานอลที่ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 จะผ่านเข้าไปในหอดูดซับที่บรรจุตัวดูดซับประเภทซีโอไลต์ โมเลกุลของเอทานอลจะไหลผ่านช่องว่างของซีโอไลต์ออกไปได้ แต่โมเลกุลของน้ำจะถูกดูดซับไว้ ทำให้เอทานอลที่ไหลออกไปมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 ส่วนซีโอไลต์ที่ดูดซับน้ำไว้จะถูกรีเจนเนอเรตโดยการไล่น้ำออก เอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 สามารถนำมาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงได้ 3 รูปแบบ ได้แก่

- (1) ใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล
- (2) ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่า ดีโซฮอล์ (Diesohol)
- (3) ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทน ของน้ำมันให้กับเครื่องยนต์ โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอลมาเป็นสาร ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether)

## 2.2 กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ

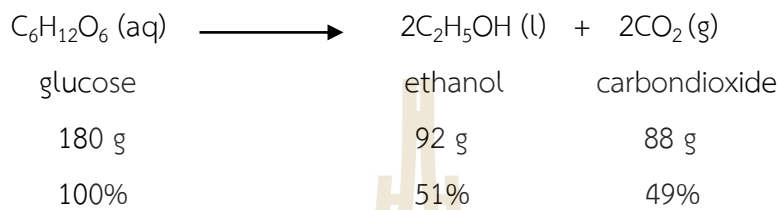
ปัจจุบันเอทานอล ที่ใช้ในรูปของเชื้อเพลิงได้มาจากกระบวนการหมัก (Fermentation) จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรประเภทที่มีแป้งและน้ำตาลโดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ในการผลิต รวมทั้งมีการนำก๊าซต่างๆ เช่น CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> และ N<sub>2</sub> โดยก๊าซเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยวิธีการหมักด้วยเอนไซม์จากเซลล์จุลินทรีย์ (Wilkins and Atiye, 2011) และอาจเรียกเอทานอลที่ได้ว่า “เอทานอลชีวภาพ” หรือ “ไบโอเอทานอล (bioethanol)” โดยกระบวนการทางชีวภาพมีดังนี้

### 2.2.1 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาล

กระบวนการผลิตทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการใช้คาร์โบไฮเดรตในการเจริญ แล้วให้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งจุดประสงค์ประการหนึ่งของการผลิตเอทานอลทางชีวภาพ คือ ต้องการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบสูง) นำกลับมาใช้ให้ก่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจ โดยในทางทฤษฎีจากกระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์เมื่อน้ำตาลถูกใช้โดยยีสต์ น้ำตาลจะถูกนำเข้าสู่เซลล์แล้วถูกย่อยสลายโดยวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) หรือผ่านวิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) โดยไม่มีการใช้ออกซิเจนในถึงปฏิกิริยาแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล ซึ่งกรดไพรูวิกในสิ่งมีชีวิตจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในหลายๆ เมทาบอลิซึมภายในเซลล์ จุลินทรีย์ที่สามารถจะให้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ได้นั้นมักต้องการสภาวะที่เหมาะสมเฉพาะของจุลินทรีย์นั้นๆ ในยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดสามารถเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นเอทานอลได้ ซึ่งต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์และควบคุมสภาวะให้เหมาะสม เพื่อที่จะไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์



ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ในทางทฤษฎี กลูโคส 100% จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล 48.9 และ 51.1 % โดยน้ำหนักตามลำดับ และมีการผลิต ATP 2 โมเลกุล ซึ่งยีสต์นำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียคาร์บอนและได้สารประกอบอื่นๆ (by products) เช่น กลีเซอรอล (glycerol) กรดอินทรีย์ และ higher alcohols (Bai et. al., 2008) รวมทั้งใช้คาร์บอนในการสร้างเซลล์ ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) เพียงประมาณ 50-90 % ของค่าตามทฤษฎี ดังสมการ ต่อไปนี้

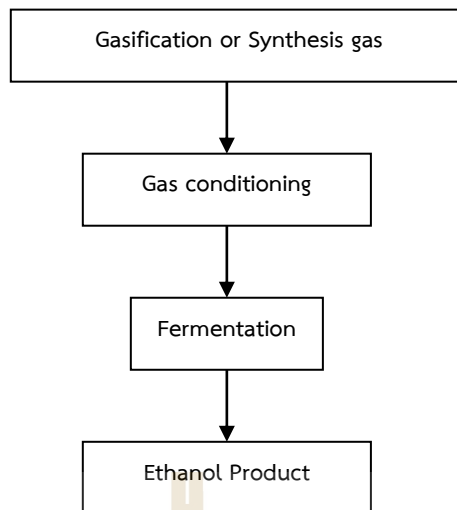


ในการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมสามารถพัฒนาจนได้ผลผลิตเอทานอลสูงถึง 90-93% ซึ่งโดยทั่วไปเมื่อสิ้นสุดการหมักจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเหลืออยู่ไม่เกิน 2 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทั้งหมดเหลือไม่เกิน 5 กรัมต่อลิตร (Bai et. al., 2008) ซึ่งถ้าควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสมจะได้เอทานอลความเข้มข้น 10-12% โดยปริมาตร ภายในเวลา 5 วัน (Demain, 2009)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้โดยทั่วไป ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragillis*, *S. uvarium*, *Kluyveromyces fragillis*, *Nematospora* sp., *Shizosaccharomyces* sp. และ *Zymomonas mobilis* เป็นต้น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หลังจากการหมักที่ตรวจสอบ เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 48.4 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 46.5 อะซีตัลดีไฮด์ร้อยละ 0.0-0.3 กรดอะซีติกร้อยละ 0.05-0.25 กลีเซอรอลร้อยละ 2.5-3.6 กรดแลคติกร้อยละ 0.0-0.2 กรดซัคซินิกร้อยละ 0.5-0.77 และ Fuel oil ร้อยละ 0.25-0.5 เป็นต้น (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2522)

### 2.2.2 การผลิตเอทานอลทางชีวภาพจากก๊าซสังเคราะห์ (Carbon-rich gas)

ในกระบวนการผลิตเอทานอลนั้นนอกจากการใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติในการผลิตเอทานอลแล้ว ยังมีการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์หรือ Synthesis gas หรือ Syngas มาผ่านกระบวนการปรับสภาพของก๊าซหรือเรียกว่า กระบวนการที่ทำให้เกิดก๊าซ (Gasification) แล้วนำไปผ่านกระบวนการหมัก (Fermentation) ด้วยจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ก๊าซคาร์บอนได้เรียกว่า Autotrophic bacteria จะทำให้เกิดเอทานอลขึ้น (Reed and Jantzen, 1979; Vega et al., 1990; Natarajan et al., 1998; Datar et al., 2004) หรืออาจใช้ก๊าซที่มีคาร์บอนเพียงพอ (Carbon-rich gaseous) เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้เช่นเดียวกัน (Cotter, 2006) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 2-1



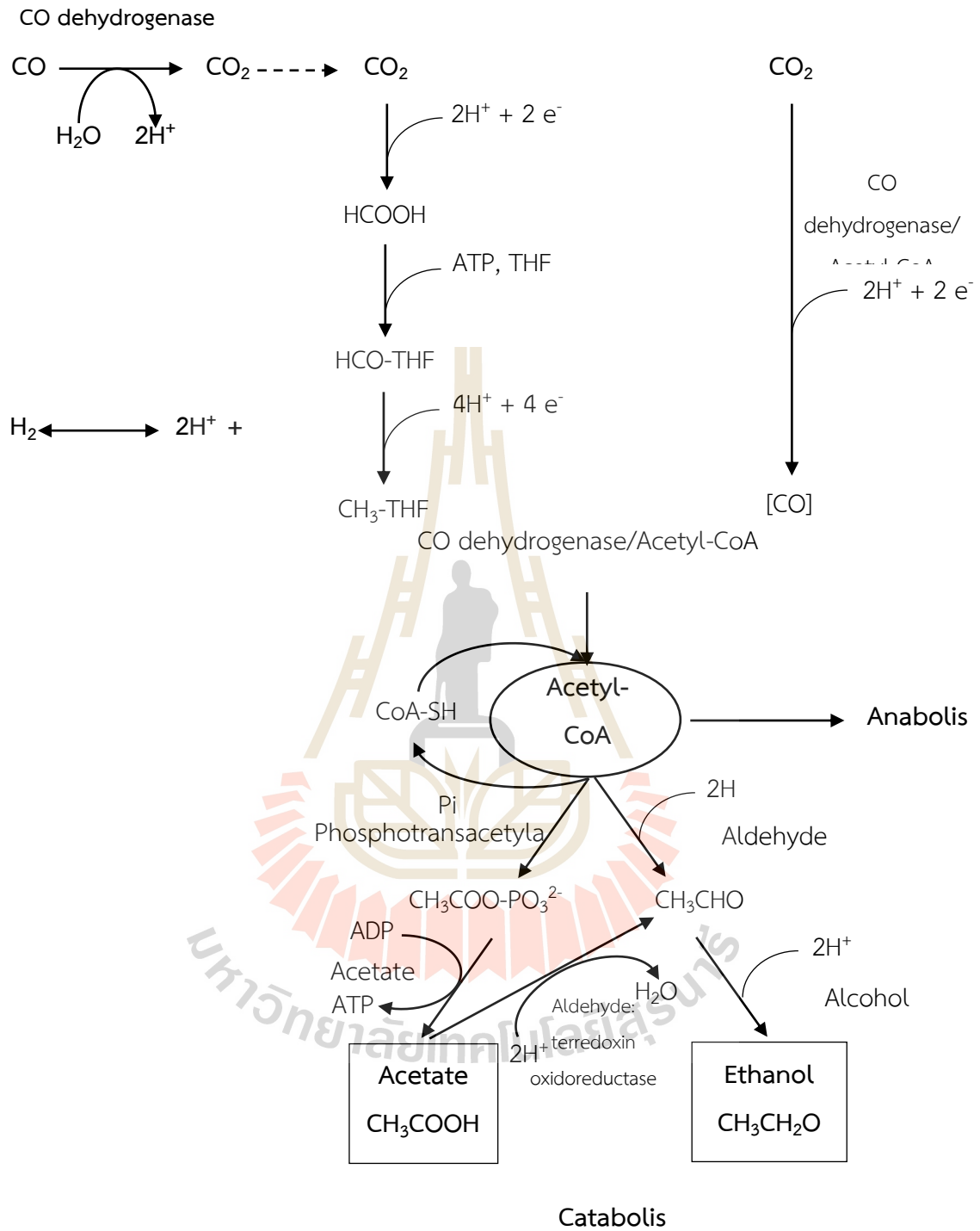
ภาพที่ 2-1 การเกิดเอทานอลจากกระบวนการเกิดก๊าซหรือก๊าซสังเคราะห์และกระบวนการหมัก (Ljungdahl, 1986; Diekert and Wohlfarth, 1994)

### 2.3 การผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนเพียงพอ (Carbon-rich gas)

การผลิตเอทานอลจากการหมักก๊าซสังเคราะห์ เป็นวิธีการเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีของสารด้วยวิธีผสมผสานระหว่างวิธีทางชีวเคมีร่วมกับการใช้ความร้อน (Thermochemical-biochemical process) โดยก๊าซที่นำมาหมักนี้ได้ผ่านกระบวนการ gasification (gasification-syngas fermentation) ประกอบด้วยก๊าซ CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> และ N<sub>2</sub> ซึ่งก๊าซเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยวิธีการหมักด้วยเอนไซม์จากเซลล์จุลินทรีย์ (Drake et al., 2008; Wilkins and Atiye, 2011) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล (Ethanol producing microorganisms) ซึ่งมีความสามารถในการหมักก๊าซคาร์บอนดังกล่าวให้เป็นเอทานอลได้นั้น ได้แก่ *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium autoethanogenum*, *Moorella* sp. HUC22-1, และ *Bacterium* P7 (Barik et al., 1988; Abrini et al., 1993; Rajagopalan et al., 2002; Datar et al., 2004; Sakai et al., 2004, 2005) *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans* และ *Clostridium autoethanogenum*, *Alkalibaculum bacchi* (Phillips et al., 1993; Phillips et al., 1994; Wilkins and Atiyeh, 2011; Ukpong et al., 2012; Liu et al., 2012; Ukpong et al., 2012; Abubackar et al., 2015) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถนำก๊าซ CO, CO<sub>2</sub>, และ H<sub>2</sub> เข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปผลิตเอทานอลและกรดอะซิติก ผ่านกระบวนการหมักที่มีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์ที่เรียกว่า Wood-Ljungdahl pathway หรือเรียกว่า Acetyl-CoA pathway (Wood et al., 1986) โดยจุลินทรีย์จะใช้เป็น CO และ CO<sub>2</sub> เป็นแหล่งคาร์บอน และมีก๊าซไฮโดรเจนเป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน และมีเอนไซม์คาร์บอนมอนอกไซด์ดีไฮโดรจิเนส (CO dehydrogenase)

เอนไซม์ไฮโดรจิเนส (Hydrogenase) เข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน (Kopke et al., 2010) จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารกลุ่มเมทิล ( $\text{CH}_3$ ) และอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลโดยการทำงานของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ดังรูปที่ 2-2





ภาพที่ 2-2 กระบวนการผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (Wilkins and Atiyeh., 2011)

จากภาพพบว่า เมื่อมี CO ซึ่งเกิดจากกระบวนการ gasification เพียงอย่างเดียว จำนวนคาร์บอนที่จะเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลมีเพียง 1 ใน 3 เท่านั้น โดยใช้เอนไซม์ carbonmonoxide dehydrogenase (สมการที่ 1) กับ CO<sub>2</sub> ส่วนปฏิกิริยาระหว่าง H<sub>2</sub> กับ CO<sub>2</sub> นั้น พบว่า คาร์บอนทุกตัวสามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ทั้งหมด (สมการที่ 2) และเมื่อนำสมการที่ (1) และ (2) มารวมกันจะได้เป็นสมการที่ (3) ดังนี้



จากสมการที่ (3) พบว่า มีคาร์บอนจำนวน 2 ใน 3 ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยสมการหลังนี้ จะเกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์ hydrogenase ดังนั้นปริมาณเอทานอลที่ได้จะขึ้นอยู่กับสัดส่วนขององค์ประกอบของก๊าซที่นำมาหมัก อีกทั้งปริมาณ H<sub>2</sub> มีค่าน้อยกว่าที่คาดไว้เนื่องจากมีบางส่วนทำปฏิกิริยากับชีวมวลที่เป็นคาร์บอนเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) (Datar et al., 2004) จากการศึกษาของ Rajagopalan และคณะ (2002) พบว่า การผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์สังเคราะห์ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ Bacterium P7 ทำให้เกิดเอทานอลมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.61 wt% เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี หรือคิดเป็น 0.15 โมลเอทานอลต่อโมล CO ที่ใช้ และจากการศึกษาวิจัยการผลิตด้วยกระบวนการแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch process) พบว่าผลิตเอทานอลได้น้อยกว่าคือผลิตได้ประมาณ 0.062 โมลเอทานอลต่อโมล CO ที่ใช้ (Phillips et al., 1994) ซึ่งจากการวิจัยเหล่านี้พบว่า ควรมีการพัฒนาต่อโดยใช้การผลิตด้วยกระบวนการแบบต่อเนื่อง (Continuous process) เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น และควรควบคุมสภาวะการทดลองให้เหมาะสม ได้แก่ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ ปริมาตรของก๊าซที่ใช้ อัตราการไหลของก๊าซ และค่าพีเอช โดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล (Ethanol producing microorganisms) ซึ่งมีความสามารถในการหมักก๊าซคาร์บอนดังกล่าวให้เป็นเอทานอลได้นั้น แสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักก๊าซคาร์บอนเพื่อการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Mohammadi et al., 2011)

ชนิดของจุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์การหมัก	อ้างอิง
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	Mixture of acetic acid and ethanol $6\text{CO} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 4\text{CO}_2$	Abrini et al., 1994
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	$2\text{CO}_2 + 6\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 3\text{H}_2\text{O}$	Gaddy ., 2000
<i>Moorella sp. HUC22-1</i>	$6\text{CO} + 6\text{H}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{CO}_2$	Sakai et al., 2004
<i>Acetobacterium kivui</i>	$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	Allen et al., 2010
<i>Alkalibaculum bacchi</i>		
<i>Eubacterium limosum</i>	Mixture of ethanol, butanol, acetic acid and butyric acid	Ahmed., 2006
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	$6\text{CO} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 4\text{CO}_2$	Liou et al., 2005
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	$4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2$ $12\text{CO} + 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_4\text{H}_9\text{OH} + 8\text{CO}_2$ $10\text{CO} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_4\text{H}_9\text{OH} + \text{CO}_2$ $12\text{H}_2 + 4\text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_9\text{OH} + 7\text{H}_2\text{O}$	Heiskanen et al., 2007

## 2.4 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 4 ประเภทหลักๆ คือ กระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation) การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) และการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่องเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตเอทานอล ซึ่งกระบวนการหมักแต่ละประเภทมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ในการเลือกใช้กระบวนการใดในการหมักควรคำนึงถึงวัตถุดิบที่ใช้ รวมทั้งต้นทุนในการดำเนินการโดยเฉพาะค่าร้อยละผลได้ (% yield) และอัตราผลผลิต (Productivity) ของผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญในการเลือกกระบวนการหมัก

### 2.4.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

การหมักแบบกะนั้น สารอาหารทั้งหมดจะถูกเตรียมไว้ก่อนที่จะมีการเติมเชื้อยีสต์ลงไปและจะไม่มีการเติมสารอาหารอื่นๆ ลงไปในระหว่างที่การหมักดำเนินไป เอทานอลที่ถูกผลิตขึ้นจะสะสมอยู่ภายในน้ำหมัก ปฏิกิริยาชีวภาพจะดำเนินไปจนถึงจุดที่ต้องการ แล้วจึงแยกเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ออก โดยทั่วไปจะรอจนผลิตภัณฑ์มีปริมาณสูงสุดและมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสิ้นสุด ซึ่งในระบบการหมัก

แบบกะนี้เมื่อเติมจุลินทรีย์ลงในอาหารระยะแรกเซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน ระยะนี้เรียกว่า Lag phase เนื่องจากเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว ในช่วง Lag phase นี้ กระบวนการหมักในอุตสาหกรรมจำเป็นต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้น (Starter หรือ Inoculum) ที่เหมาะสมหลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเพิ่มขึ้นจนเข้าสู่ระยะ Log phase หรือ Exponential phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการแบ่งตัวทวีคูณ จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นแบบ Exponential การเจริญเติบโตในระยะนี้จะเกิดขึ้นต่อไปหลายชั่วโมงจนกว่าองค์ประกอบของสารอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลง เช่น อาหารมีปริมาณน้อยลง และปริมาณออกซิเจนจำกัดเนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่น เมื่อถึงจุดนี้การเจริญเติบโตจะช้าลงและปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่ เซลล์จะเข้าสู่ระยะใหม่ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์หยุดการทวีคูณและอยู่ในสภาวะคงที่ไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง การหยุดทวินั้นอาจเนื่องจากปริมาณสารอาหารบางอย่างหมดหรือลดน้อยลง หรือมีการสร้างสารพิษระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ การที่จำนวนประชากรคงที่นั้น แสดงว่าเซลล์ไม่มีการแบ่งตัวอีกเลยหรืออัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายหรือสมดุล ถึงแม้ว่าไม่มีการเจริญเติบโตเกิดขึ้นแต่หน้าที่ต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น เมตาบอลิซึมทางพลังงาน และกระบวนการสร้างทางชีวภาพ ระยะนี้เรียกว่า Stationary phase ระยะสุดท้ายจุลินทรีย์ที่เหลือจะมีการตายเร็วกว่าการเพิ่มจำนวน ระยะนี้เรียกว่า Death phase ซึ่งเกิดจากการหมดหรือมีการสะสมสารยับยั้งการเจริญ เช่น กรดหรือสารพิษ จุลินทรีย์ระยะนี้จะไม่เหมาะที่จะนำไปใช้งานเพราะมีจำนวนน้อยมักมีแต่เซลล์ตาย ขนาดเซลล์เล็ก ผิดปกติ อาจมีขนาดยาวหรือเป็นเส้น มีหลายนิวเคลียส ไม่มีผนังเซลล์หรือผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ เซลล์ต่างๆ เหล่านี้ถ้านำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่จะสามารถกลับมาเป็นเซลล์ปกติได้ ทั้งนี้ได้มีการศึกษาผลของระดับเอทานอลที่เพิ่มขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของจุลศาสตร์การหมัก และได้พบว่าอัตราการผลิตเอทานอลจะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น ซึ่งสาเหตุหลักนั้นพบว่าการเกิดขึ้นจากการที่เอทานอลได้ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อยีสต์ที่ทำให้สูญเสียความสามารถในการคัดเลือกผ่านของสารเข้า-ออกเซลล์ ทำให้เชื้อยีสต์ตายไปในที่สุด โดยทั่วไป พบว่า การหมักแบบกะนี้ ปริมาณของเอทานอลที่สะสมมักจะอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก และจะมีอัตราการผลิตเอทานอลอยู่ที่ประมาณ 1.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Neelam and Amarjit, 1991) อย่างไรก็ตามการหมักแบบกะนี้ มักจะได้ผลผลิตของเอทานอลที่ต่ำกว่าระบบการหมักแบบอื่นๆ ทำให้ไม่เป็นที่นิยมมากนักในการหมักระดับอุตสาหกรรม

#### 2.4.2 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

การหมักเอทานอลแบบกะเป็นวิธีการเดียวในการผลิตเอทานอลในอดีต แต่ร้อยละ 30 ได้ถูกเปลี่ยนมาเป็นกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในเวลาต่อมา (Wheals et al., 1999) กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องจะมีการเติมอาหารลงไปในระบบและจะมีการนำเอาหมักบางส่วนออกโดยที่อัตราการป้อนอาหารเข้าถังหมักต่อปริมาตรของน้ำหมักในถังหมัก เรียกว่า อัตราการเจือจาง ซึ่งจะมีหน่วยเป็นต่อชั่วโมง โดยที่อัตราการไหลเข้าออกของสารอาหารในระบบไม่ควรสูงไปกว่าอัตราการเจริญจำเพาะ

สูงสุดของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันจุลินทรีย์ออกจากระบบ ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์ในระบบการหมัก มีหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการหมักแบบต่อเนื่อง เช่น การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยการตรึงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034 ใน calcium alginate (McGhe et al., 1982) ซึ่งมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในน้ำหมักด้วยอัตราการเจือจางที่ 0.2 ต่อชั่วโมง อีกทั้งสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ค่าผลิตผลเอทานอลต่อกลูโคสสูงถึง 0.31 กรัมเอทานอลต่อ 1.0 กรัมกลูโคส (Ranulfo et al., 2003) ขณะที่ Liu และคณะ (2014) พบว่า การผลิตเอทานอลของ *Alkalibaculum bacchi* CP15 จากก๊าซผสม CO:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> (%v: %v: %v: %v) ที่อัตราส่วน 20:15:5:60 ด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ Bioflo 415 fermenter ขนาด 7 ลิตร ปริมาตรทำงานเท่ากับ 3.3 ลิตร พบว่าสามารถผลิตเอทานอล โพรพานอลและบิวทานอลได้ 8 g/L, 6 g/L และ 1 g/L ตามลำดับ

โดยข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง คือ ปริมาณประชากรของเซลล์สามารถรักษาสภาวะคงตัว (Steady-state) อยู่ในช่วง Exponential phase ได้เป็นเวลานาน ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องจะมีการป้อนอาหารเข้า และนำอาหารออกจากระบบตลอดเวลาด้วยอัตราคงที่ค่าหนึ่ง ระบบหมักการหมักแบบต่อเนื่องสามารถแบ่งการควบคุมออกเป็น 2 ลักษณะคือ ระบบการหมักต่อเนื่องแบบ Chemostat และแบบ Turbidostat โดยหลักการของทั้ง 2 ระบบคือ ต้องทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ในระบบมีปริมาณคงที่ ดังนั้นการเติมสารอาหารลงในถังหมักจึงต้องสัมพันธ์กับ Generation time ของจุลินทรีย์ โดยถ้าอัตราการให้สารอาหารต่ำจุลินทรีย์จะเจริญเข้าสู่ช่วง Stationary phase ทำให้ไม่สามารถรักษาระบบให้ดำเนินการแบบต่อเนื่องได้เช่นเดียวกัน

ระบบ Chemostat อัตราการนำอาหารเข้าและอัตราการนำน้ำหมักออกจากระบบจะมีค่าคงที่ตลอดการดำเนินการ และอัตราการเจริญจะควบคุมด้วยปริมาณของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต pH หรืออุณหภูมิ ส่วนระบบแบบ Turbidostat จะมีการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมักให้คงที่ โดยควบคุมอัตราการเติมสารอาหารลงในถังหมักและอัตราการนำน้ำหมักออกโดยใช้เครื่องควบคุมความขุ่นของจุลินทรีย์

อย่างไรก็ตามการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องนี้อาจจะก่อให้เกิดการสูญเสียจุลินทรีย์ไปในระหว่างที่มีการถ่ายน้ำหมักออกจากระบบด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีอัตราการเจริญเติบโตน้อยและมีอัตราการเจือจางสูง นอกเหนือจากปัญหาดังกล่าวแล้ว การควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้เกิดสถานะคงตัว (Steady state) ของทั้ง Chemostat และ Turbidostat ระหว่างกระบวนการหมักพบว่ามีปัญหายากมาก โดยที่ Chemostat เป็นการควบคุมระบบให้เกิดสภาวะคงตัวของปริมาณน้ำหมักโดยการควบคุมอัตราการป้อนของสารอาหารและอัตราการถ่ายน้ำหมักออกจากระบบให้เท่ากัน ส่วน Turbidostat เป็นการควบคุมปริมาณของน้ำหมักให้คงที่โดยการควบคุมอัตราการป้อนสารอาหารและอัตราการถ่ายน้ำหมักออก ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นของเซลล์ในระบบเป็นตัวกำหนดและ



จะต้องอาศัยการควบคุมที่ซับซ้อนซึ่งไม่เป็นที่นิยมในการหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Doran, 1995)

#### 2.4.3 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

ในกระบวนการหมักเอทานอลแบบกึ่งกะนั้น สารอาหารจะถูกป้อนเข้าสู่ระบบเป็นครั้งคราว หรือต่อเนื่องก็ได้ แต่จะไม่มี การถ่ายเอา น้ำหมักออกจากระบบในระหว่างการหมัก ซึ่งจะเป็นการ ผสมผสานระหว่างการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง ซึ่งกระบวนการหมักแบบนี้ได้รับความนิยมมาก ที่สุดในระดับอุตสาหกรรม (Caylak and Sukan, 1998) โดยที่สามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับการหมัก โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ที่สูงได้ เพื่อเพิ่มความต้านทานความเป็นพิษของเอทานอลและลดต้นทุน ที่เกี่ยวกับการเตรียมเชื้อเริ่มต้นลง นอกจากนี้ส่วนที่สำคัญที่สุดยังเป็นการเพิ่มอัตรา ในการผลิตเอทานอลโดยอาจจะมีค่าสูงถึง 3.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ความเข้มข้นของเอทานอลสุดท้ายที่ ประมาณ 70 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นกับกระบวนการหมักแบบนี้ก็คือการ ที่ยังมีการสะสมของเอทานอล ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงสะสมอยู่ในระบบทำให้ในท้ายที่สุดแล้ว การหมักก็จะยุติลงจากการที่เชื้อยีสต์ไม่สามารถทนความเป็นพิษของเอทานอลได้ (Converti et al., 2003)

#### 2.4.4 การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation)

ระบบการหมักแบบนี้จะทำการหมักแบบกะก่อนแต่เมื่ออาหารในระบบเริ่มหมด จะมีการนำ น้ำหมักออกจากระบบไปเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์โดยจะเหลือน้ำหมักส่วนหนึ่งไว้ในถังหมัก หลังจากนั้นจะ เติมน้ำหมักเข้าไปเหมือนการหมักแบบกึ่งกะทันที แต่ปริมาตรที่เติมเข้าไปในถังหมักจะเติมปริมาตร ปริมาตรทำงานของระบบทุกครั้งไม่เหมือนแบบกึ่งกะ ระบบหมักจะหมุนเวียนกันไปเรื่อยๆ เหมือนดัง การหมักแบบต่อเนื่อง ข้อดีของกระบวนการหมักแบบนี้คือ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้อย่าง ต่อเนื่อง ระบบไม่แพงเท่ากับการหมักแบบต่อเนื่อง และสารอาหารที่ให้เข้าไปมีการนำไปใช้ได้อย่างมี ประสิทธิภาพ ส่วนข้อเสียคือ จะต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ และต้องใช้แรงงานคนคอยดูแลและติดตามการให้อาหารของจุลินทรีย์ แล้วทำการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ไปพร้อมกับการให้อาหารชุดใหม่จึงค่อนข้างยุ่งยาก หากมีการดำเนินการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องไปตลอด

### 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอลด้วยก๊าซคาร์บอนเพียงพอ (Fermentation conditions of carbon-rich gas)

เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการหมักสูงสุดและได้ปริมาณเอทานอลสูง จำเป็นต้องมีการ ควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก เช่น ความเข้มข้นและองค์ประกอบของ สารอาหาร อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการไหลของของเหลว รวมถึงการควบคุมความ เข้มข้นของผลิตภัณฑ์เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ (Gaddy, 2000) ซึ่งปัจจัย

สิ่งแวดล้อมเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในการหมักเอทานอล โดยมีองค์ประกอบที่เป็นปัจจัยสำคัญ ดังต่อไปนี้

**1) ระดับอุณหภูมิ** อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของยีสต์ และมีผลทางอ้อมต่อปริมาณเอทานอล และสารประกอบโอโรแมติกต่างๆ อุณหภูมิส่วนมากที่ใช้ในการหมักจะอยู่ประมาณ 10-30 องศาเซลเซียสซึ่งถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วงนี้ จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์เพิ่มเป็นสองเท่าถ้าอุณหภูมิสูงมากๆ จะทำให้เอนไซม์ในยีสต์เกิดการ denature ความว่องไวของปฏิกิริยาลดลงในระหว่างที่อุณหภูมิ 55-85 องศาเซลเซียส (ยีสต์อาจตายได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของยีสต์ที่นำมาใช้ในการหมัก) เนื่องจากกระบวนการหมักเป็นกระบวนการคายความร้อน ซึ่งการหมักของน้ำตาลซูโครสจะมีการคายความร้อน 149.5 แคลอรีต่อกรัมซูโครส และการหมักน้ำตาลกลูโคสจะมีความร้อนเกิดขึ้น 140.2 แคลอรีต่อกรัมกลูโคส ดังนั้นในกระบวนการหมักต้องมีระบบถ่ายเทความร้อน เพื่อควบคุมอุณหภูมิของการหมักให้พอเหมาะความทนต่ออุณหภูมิ (temperature tolerance) สำหรับการเจริญและการหมักเอทานอลเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ถ้าอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักต่างกัน ปริมาณของผลพลอยได้ (by product) ก็จะแตกต่างกันออกไป เช่น มีอุณหภูมิต่ำๆ จะเกิดพวก volatile ester, acetaldehyde, isoamyl มาก และ active amyl alcohol ในปริมาณที่น้อย รวมทั้งสารอื่นๆ ซึ่งมีปะปนเป็นปริมาณน้อยมาก สารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการย่อยของเอนไซม์ที่ไม่สมบูรณ์หรือรุนแรงเกินไป

**2) ปริมาณออกซิเจน** ในขั้นตอนของการเตรียมเชื้อเริ่มต้น ออกซิเจนมีความสำคัญมาก เนื่องจากยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงในสภาวะที่มีออกซิเจนมาก แต่จะมีผลให้การหมักลดลง ออกซิเจนจะเสริมให้การออกซิเดชันสมบูรณ์และมีการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ออกซิเจนยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความสำคัญทำให้ยีสต์ทนต่อเอทานอลได้มากขึ้น ดังนั้นในสภาวะที่ขาดออกซิเจนยีสต์จึงไม่สามารถสังเคราะห์ไขมันที่ไม่อิ่มตัวได้ จึงต้องมีการเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อให้ยีสต์สามารถอยู่รอดได้ ยีสต์ใช้ออกซิเจนในการหายใจเพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องจึงควรมีการเติมอากาศบ้างในระหว่างการหมัก เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ทดแทนเซลล์ที่ตายลง และช่วยให้ยีสต์มีความทนทานต่อเอทานอลได้ดี

**3) ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์** คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ทั้งภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ที่ความดันบรรยากาศปกติหากมีคาร์บอนไดออกไซด์สูง จะเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักอย่างรุนแรง และคาร์บอนไดออกไซด์ยังมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การขนส่งสารเข้าสู่เซลล์เปลี่ยนไป อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล (Ethanol producing microorganisms) ซึ่งมีความสามารถในการหมักก๊าซคาร์บอนดังกล่าวให้เป็นเอทานอลได้ เช่น *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans* และ *Clostridium autoethanogenum*, *Alkalibaculum bacchi* (Phillips et al., 1993; Phillips et al., 1994; Wilkins and Atiyeh, 2011; Ukpong et al., 2012; Liu et al., 2012; Ukpong et al., 2012;

Abubackar et al., 2015) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถนำก๊าซ CO, CO<sub>2</sub>, และ H<sub>2</sub> เข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปผลิตเอทานอลได้

**4) ความเข้มข้นของเอทานอล** ในสภาพที่มีเอทานอลสูง การเจริญเติบโตและการหมักยีสต์จะถูกยับยั้ง โดยจะเห็นได้ว่าถ้าเอทานอลมีความเข้มข้นสูงขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะลดลง ซึ่งจะทำให้อัตราการหมักลดลงไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์ โดยเอทานอลจะไปมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) และเฮกโซไคเนส (Hexokinase) และมีผลต่อเมมเบรนของเซลล์จุลินทรีย์ กล่าวคือ อาจมีการทำลายหรือทำให้เมมเบรนเปลี่ยนแปลงไป (พัฒนา., 2552) เมื่อเปอร์เซ็นต์เอทานอลมากกว่า 1% โดยน้ำหนัก จะมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลงและจะหยุดเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8% โดยน้ำหนัก โดยต่อจากนั้นจะเป็นการหมักเอทานอลจนถึงความเข้มข้น 14% โดยน้ำหนัก การที่ยีสต์ไม่เจริญเติบโตทำให้อัตราการหมักลดลงด้วย

**5) ค่า pH** ในกระบวนการหมักค่า pH ถือเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลในการควบคุมการเผาผลาญสารอาหาร และส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาของเซลล์ โดยจะส่งผลต่อการแลกเปลี่ยนไอออนและการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ (Devi et al., 2010) เนื่องจากการลดลงของ pH ซึ่งสาเหตุของการลดลงของค่า pH อาจเกิดจากการสะสมของกรดอะซิติกเกิดขึ้นภายในระบบและสามารถแตกตัวให้โปรตอนและสามารถผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ตรึงรูป ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของโปรตอนผ่านไซโตรพลาสติกเมมเบรนส่งผลให้ pH ภายในเซลล์ลดลง จึงมีการใช้พลังงาน (ATP) เพิ่มสูงขึ้น (Devi et al., 2010; Galazzo and Bailey, 1990) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดเอทานอลและสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น (Kundiyan et al., 2010; Mohammadi et al., 2011) นอกจากนี้การเป็นกรดจะกีดขวางการเจริญของพวกแบคทีเรียและราบางชนิด ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือทำให้เซลล์ตาย จึงเสียสมดุลของกระบวนการทางชีวภาพส่งผลให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ของเซลล์ลดลง แต่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี (ระหว่าง pH 3-5) ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์และอัตราเร็วของการหมักเพิ่มขึ้น สำหรับการเลือก pH ที่จะใช้ในการหมักซึ่งไม่มีระบบควบคุม pH ระหว่างการหมักนั้นขึ้นอยู่กับ buffering capacity ของอาหารสำหรับหมัก ในอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมควรใช้ประมาณ 5.5 แต่ถ้าอาหารนั้นมีบัฟเฟอร์สูง pH ที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5-4.7 ในการหมักเอทานอลเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบใช้ pH 4-5 แต่เมื่อใช้เมล็ดธัญพืช pH ที่ควรเลือกใช้จะอยู่ในช่วง 4.8-5 สำหรับการหมักเอทานอลโดยใช้อาหารที่มี buffering capacity ต่ำ บางครั้งการควบคุม pH อาจทำได้โดยการเติมแอมโมเนียเหลวลงไปในระหว่างการหมัก pH ที่ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้คือ pH ในช่วง 2.4-8.6 โดยมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5 ซึ่งในสภาพที่เป็นกรดอ่อนนี้สามารถช่วยควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียได้

ทั้งนี้การตรวจวัดค่า pH ในช่วงการหมักนั้นมีความจำเป็นบ่อยครั้งปัญหาที่เกิดขึ้นเราสามารถคาดการณ์ได้ว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นในกระบวนการหมัก โดยการสังเกตจากค่าอุณหภูมิของ

ของเหลวควบคู่กับค่า pH ที่ลดลงอย่างรวดเร็วผิดปกติ โดยที่แอลกอฮอล์ไม่เกิดขึ้น เมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนี้ขึ้นบางโรงงานอุตสาหกรรมจะมีการแก้ปัญหาโดยการสับถ่ายไปผสมกับถังหมักอื่นที่หมักได้ดีมีแอลกอฮอล์สูงเกินกว่า 5% และเติมกล้ำจุลินทรีย์เพิ่มควบคู่กันไปอีกทางหนึ่งด้วย

**8) ธาตุอาหาร** ยีสต์ต้องการธาตุอาหารเพื่อการเจริญและการหมักเอทานอล ความต้องการธาตุอาหารที่ใช้เพื่อการเจริญเป็นสัดส่วนกับองค์ประกอบหลัก (major component) ของเซลล์ธาตุอาหารเหล่านั้นคือ คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โปแตสเซียม และแมงกานีส เพื่อการสังเคราะห์องค์ประกอบรอง (minor component) และต้องการแมงกานีส โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก และสารอินทรีย์บางชนิด คือ กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิกและวิตามิน ในปริมาณที่น้อยมากสำหรับวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ มักจะมีธาตุอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์นอกเหนือจากคาร์โบไฮเดรต แต่สำหรับวัตถุดิบบางชนิดอาจจะต้องมีการเติมธาตุอาหารบางอย่างเสริมลงไป เช่น

- ไนโตรเจน โดยทั่วไปยีสต์ใช้อะมิออนัม (ammonium ion) ได้ แม้ว่าบางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่จำเพาะ ในอุตสาหกรรมจะใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เช่น ในการหมักกาน้ำตาล
- ฟอสฟอรัส ปกติใส่ในรูปของฟอสเฟต ซึ่งเป็น ionic factor ที่มีความสำคัญต่อการหมัก
- ซัลเฟอร์ ในเซลล์ของยีสต์พบมีซัลเฟอร์ปริมาณร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักแห้ง โดยเมไธโอเนินเป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่ยีสต์ชอบ ส่วนซัลเฟตที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้เช่นกัน โดยจะถูกรีดิวซ์เป็นเมไธโอเนินภายในเซลล์ แต่เมไธโอเนินมีราคาแพงเกินกว่าที่จะใช้ในอุตสาหกรรม โดยปกติในอุตสาหกรรมจะใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

**9) โลหะ** ในพวกธัญพืชต่างๆ (cereal grains) เช่น ข้าว จะมีพวกธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม ทองแดง เหล็ก แมกนีเซียม และแมงกานีส ซึ่งเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และในกระบวนการหมักเอทานอลจากกลูโคส ถ้าปริมาณของโลหะมากเกินไปจะกลายเป็นตัวยับยั้งทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์ชะงัก พวกสารประกอบซัลเฟอร์จะทำให้เซลล์ของยีสต์แก่เร็ว ส่วนพวก เหล็ก อลูมิเนียม ตะกั่ว สังกะสี ไม่ค่อยมีผลมากนักต่อปฏิกิริยาการหมัก แต่ถ้าเป็น แคดเมียม ทองแดง พรอท พาราเดียม ออสเมียมและเงิน จะเป็นตัวหน่วงการเจริญของยีสต์อย่างแรง (strong retarding)

จะเห็นได้ว่าโดยทั่วไปกระบวนการหมักเอทานอลมักจะใช้ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดเอทานอล อย่างไรก็ตามยังมีนักวิจัยอีกหลายคนที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลดังที่ได้กล่าวในขั้นต้น

## 2.6 ระบบตรึงผิวชีวภาพ (Cell-immobilized/Fixed-film system)

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (Immobilized cell) มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวทำให้ปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นและมีประสิทธิภาพในการทำงานในระบบต่างๆ มากขึ้นด้วย (Qureshi et al., 2005) เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ภายในระบบนี้อาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม

คือ กลุ่มแรกเป็นจุลชีพประเภทที่ตรึงผิว (Fixed-film) เกาะบนผิวพื้นวัสดุ และกลุ่มที่สองเป็นจุลชีพประเภทที่แขวนลอยในน้ำ (Suspended microorganisms) (สันทัด, 2552) การมีจุลินทรีย์แขวนลอยเกิดขึ้นในระบบนั้นอาจเกิดจากการหลุดของเซลล์จุลินทรีย์ในสถานะที่มีก๊าสเกิดขึ้นภายในชั้นของฟิล์มหรือเกิดขึ้นจากสภาวะการขาดแคลนสารอาหาร ซึ่งการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุที่เหมาะสมจะทำให้เกิดชั้นของไบโอฟิล์ม (Biofilm) วัสดุที่เหมาะสมต้องมีพื้นผิวหยาบ (Rough surface) มีลักษณะเป็นรูพรุน (Porous materials) ซึ่งวัสดุที่ทำให้เกิดไบโอฟิล์มได้ดีและรวดเร็วได้แก่วัสดุจำพวกพลาสติกซึ่งจะเกิดไบโอฟิล์มได้ดีกว่าการใช้พวกแก้วหรือโลหะเป็นวัสดุในการตรึงเซลล์ (Characklis et al., 1990; Donlan and Costerton, 2002) โดยสามารถใช้ในระบบที่มีการทำงานอย่างต่อเนื่องได้ ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้มีการประยุกต์นำการตรึงเซลล์จุลินทรีย์มาใช้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลและเป็นระบบต่อเนื่องจึงเรียกว่า Continuous fixed-film bioreactor ทั้งนี้ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ตรึงเซลล์ เช่น Shen และคณะ (2003) ศึกษาผลของการตรึงเซลล์ *S. cerevisiae* KUL.CMBS.151 ต่อกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 80 g/L โดยเปรียบเทียบผลของการระหว่างการใช้จุลินทรีย์แบบแขวนลอยและจุลินทรีย์แบบฟิล์มตรึง (Immobilized cell) บนเหล็กกล้าไร้สนิมที่หุ้มด้วยไฟเบอร์และใย ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Cylinder-conical glass bioreactor พบว่าเมื่อใช้เซลล์ตรึงรูปจะมีอัตราการใช้น้ำตาลและอะมิโนไนโตรเจนอิสระ (Free amino nitrogen) เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลต่อกระบวนการหมักทำให้ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้เซลล์อิสระ เช่นเดียวกับ Nikoric และคณะ ศึกษาการผลิตเอทานอลจากข้าวโพดด้วยกระบวนการหมักแบบกะ (Batch system) โดยการตรึงเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* บนแคลเซียมแอลจีเนต พบว่าการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนตัวกลางส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตมากถึง 2.13 g/L/h อย่างไรก็ตามจุลชีพตรึงผิวหรือ Fixed-film ที่ใช้ในระบบนั้นจะทำให้เกิดฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) ลักษณะสมบัติของฟิล์มชีวภาพ ที่เกาะบนผิววัสดุต่างๆ นั้น ขึ้นกับองค์ประกอบหลายประการ เช่น ความเร็วของน้ำไหลผ่านผิวของวัสดุ ความเข้มข้นของสารอาหารที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ในน้ำ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ อุณหภูมิในขณะนั้น ลักษณะผิววัสดุที่ฟิล์มชีวภาพเกาะ เป็นต้น

### 2.6.1 ฟิล์มชีวภาพ (Bio-film)

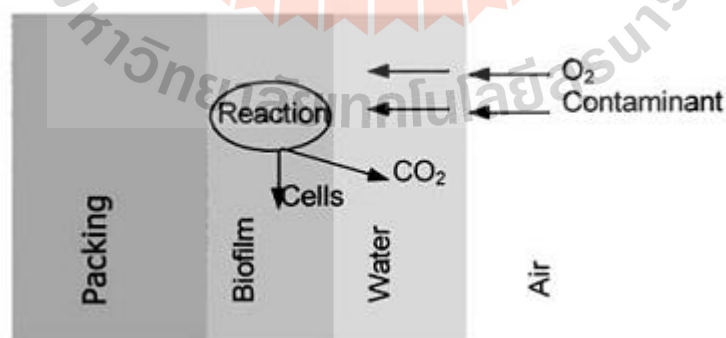
ฟิล์มชีวภาพ หมายถึงชั้นของจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตและเกาะอยู่บนพื้นผิวของของแข็งไม่ว่าจะเป็นไม้ เหล็ก พลาสติก ยาง หรือแม้กระทั่งเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (ณฐนนท์, 2551) ฟิล์มชีวภาพ (Bio-film) เป็นกลไกที่สำคัญในการกำจัดมลพิษของระบบบำบัดแบบชีวภาพซึ่งเป็นมวลของจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตบนผิวของตัวกลาง และทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปสารมลพิษให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษน้อยลง การเจริญเติบโตของฟิล์มชีวภาพบนผิวของตัวกลางเป็นผลมาจากกระบวนการทางกายภาพ เคมี และชีววิทยาดังนี้

- 1) การขนส่ง (Transportation) และการดูดซับ (adsorption) ของโมเลกุลของสารอินทรีย์ไปยังผิวของตัวกลาง
- 2) การขนส่ง (Transportation) ของเซลล์จุลินทรีย์ไปยังผิวของตัวกลาง
- 3) การเกาะยึด (Attachment) ของจุลินทรีย์
- 4) การแปลงรูป (Transformation) ของจุลินทรีย์เป็นฟิล์มชีวะที่บริเวณผิวของตัวกลาง
- 5) การหลุด (Detachment) ของฟิล์มชีวะบางส่วนเนื่องมาจากแรงเฉือน (fluid shear stress) ของน้ำ

ลักษณะสมบัติของฟิล์มชีวะที่เกาะบนผิววัสดุต่างๆ นั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายประการ เช่น ชนิดของสารอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำ ความเร็วของน้ำที่ไหลผ่านผิวของวัสดุ ความเข้มข้นของสารอินทรีย์ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ค่าพีเอชของน้ำ ลักษณะผิวของวัสดุที่ฟิล์มชีวะเกาะ เป็นต้น

#### 2.6.2 การเกาะและการหลุดของฟิล์มชีวะ

จุลินทรีย์หรือแบคทีเรียสามารถเกาะได้ดีบนผิวของวัสดุที่มีความหยาบ การเกาะติดบนผิววัสดุส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียจะสร้างเส้นใยขนาดเล็กกรอบตัวเซลล์ เส้นใยเหล่านี้จะเกาะจับกันแน่นกับเส้นใยของเซลล์อื่น ทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะติดหนาเป็นฟิล์มบนผิวตัวกลางได้ เส้นใยเหล่านี้เรียกว่า Glycocolyx ซึ่งเป็นสารพวก Polysaccharide ดังนั้น ปริมาตรรวมของเซลล์เหล่านี้จึงน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตรทั้งหมดของฟิล์มชีวะ เส้นใยนี้เป็นที่เก็บน้ำย่อยที่ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เล็กลงและสามารถละลายน้ำได้ก่อนที่จะถูกซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ดังภาพที่ 2-3



ภาพที่ 2-3 กระบวนการผ่านเข้าออกของสารเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์แบบฟิล์มตรึง (Tan and Field., 2000)

การหลุดของฟิล์มชีวะจะเป็นขบวนการเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยขึ้นอยู่กับภาวะไฮโดรไดนามิกซ์ (Hydrodynamic condition) ความเร็วของน้ำที่ไหลผ่านแรงเฉือน (Shear force) จะมีส่วนช่วยให้เกิดการหลุดของฟิล์มชีวะ สำหรับการลอก (Sloughing) ของฟิล์มชีวะนั้นเกิดจากสภาพขาดแคลนสารอาหารหรือปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำบริเวณชั้นผิวด้านในของฟิล์ม การลอกออกเนื่องจากฟิล์มมีความหนาจนทำให้เกิดสภาพขาดแคลนอาหารหรือขาดแคลนออกซิเจนนี้มักเกิดในสภาวะที่มีแรงเฉือนต่ำ นอกจากนี้ถ้าฟิล์มชีวะมีความหนามากในที่สุด จะถูกถ่วงดึงให้หลุดโดยน้ำหนักของฟิล์มชีวะเอง รวมถึงเกิดจากการเจริญของเซลล์ที่อยู่ภายในเซลล์ส่งผลให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในเซลล์ตรึงรูปและก๊าซที่เกิดขึ้นนี้ไม่สามารถแพร่ออกสู่ภายนอกชั้นฟิล์มได้ ส่งผลให้เกิดความดันขึ้นภายในเซลล์ ทำให้ชั้นฟิล์มตรึงเกิดการแตกและหลุดออกมาทำให้ปริมาณเซลล์อิสระเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักได้เช่นกัน

### 2.6.3 องค์ประกอบทางเคมีของฟิล์มชีวะ

ฟิล์มชีวะประกอบด้วยน้ำสูงถึง 87-96 % โดยน้ำหนักและมีของแข็งระเหย (Volatile solids) ต่ำเพียง 1.9-3.2 % เท่านั้น นอกจากนี้ฟิล์มชีวะยังประกอบไปด้วยสารอนินทรีย์ในปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และเหล็ก (Fe) เป็นต้น ซึ่งปริมาณสารอนินทรีย์เหล่านี้ในฟิล์มชีวะขึ้นกับความเข้มข้นของสารอนินทรีย์ในน้ำเสีย

## 2.7 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์

การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ หมายถึงการจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด โดยเซลล์ยังมีกิจกรรมต่างๆ ดังเดิม จุลินทรีย์หรือเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักทั้งแบบกะและแบบต่อเนื่อง โดยเซลล์ตรึงนี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ซึ่งเป็นการลดต้นทุนลงได้

### 2.7.1 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์สามารถแบ่งตามลักษณะการตรึงเซลล์ได้ 5 วิธี ดังนี้

#### 2.7.1.1 การตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว (Adsorption)

การตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิวเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ง่ายที่สุด เซลล์จะถูกดูดซับไว้บนตัวพวยง โดยอาศัยแรงอ่อนๆ ในการติดกับตัวพวยง เช่น พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) และแรงไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic force) เป็นต้น การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการนี้ไม่มีการใช้สารเคมีต่อการเกิดปฏิกิริยา ความสามารถในการดูดซับบนตัวพวยงขึ้นอยู่กับ ความเป็นกรด-ด่าง ตัวทำละลาย ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย ความเข้มข้นของเซลล์ต่อตัวพวยง และอุณหภูมิ เป็นต้น (Bickerstaff, 1997) สารพาหะที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว ได้แก่ อลูมินา (Alumina) ถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) คอลลาเจน (Collagen) ซิลิกาเจล (Silica gel) และตัวกลางพลาสติก (Polypropylene) เป็นต้น ซึ่งเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ โดยข้อดีและข้อเสียของการตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว แสดงดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ข้อดีและข้อเสียของการตรึงเซลล์แบบดูดซับบนผิว (Bickerstaff, 1997)

ข้อดี	ข้อเสีย
1) ไม่ทำลายเซลล์	1) เกิดการหลุดออก (Leakage) ของเซลล์จากตัวพุงได้ง่าย
2) วิธีการตรึงเซลล์ทำได้ง่าย ราคาถูก และรวดเร็ว	2) มีการเกาะแบบไม่จำเพาะและไร้ทิศทาง
3) ไม่มีการใช้สารเคมีซึ่งอาจมีผลต่อตัวพุงหรือเซลล์ที่ถูกตรึง	3) ตัวพุงอาจมีพื้นที่ให้เกาะไม่เพียงพอ

### 2.7.1.2 การตรึงเซลล์แบบอาศัยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding)

การตรึงเซลล์แบบนี้อาศัยการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์กับตัวพุงซึ่งเป็นพันธะระหว่างกลุ่มฟังก์ชันัล (Functional group) อยู่บนผิวของตัวพุงและกลุ่มฟังก์ชันัลของกรดอะมิโนที่เข้าร่วมกับการเกิดพันธะโควาเลนต์ โดยส่วนใหญ่เป็นพวกหมู่อะมิโน ( $\text{NH}_2$ ) ของไลซีน (Lysine) หรืออาร์จินิน (Arginin) หมู่คาร์บอกซิล ( $\text{CO}_2\text{H}$ ) ของแอสพาทิค (Aspartic) หรือกรดกลูตามิค (Glutamic) หมู่ไฮดรอกซิล ( $\text{OH}^-$ ) ของเซอริน (Serin) หรือธรีโอนิน (Threonine) และหมู่ซัลไฟไรล (Sulphydryl;  $\text{SH}$ ) ของซิสติน (Cystein) เป็นต้น (Bickerstaff, 1997)

### 2.7.1.3 การตรึงเซลล์แบบห่อหุ้ม (Encapsulation)

การตรึงเซลล์แบบห่อหุ้ม เป็นการหุ้มเซลล์ด้วยเมมเบรนที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่าน (Semi permeable membrane) โดยเซลล์จะมีอิสระภายในสารละลายแต่ถูกจำกัดบริเวณอยู่ โปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีขนาดใหญ่ จะไม่สามารถผ่านเข้าออกได้ ยกเว้นสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กที่สามารถผ่านเข้าออกเยื่อเลือกผ่านได้ ปัญหาการตรึงเซลล์วิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับการแพร่เข้าออกของสาร รวมทั้งรอยแตกออกของเมมเบรนเมื่อมีการสะสมของผลิตภัณฑ์อย่างรวดเร็ว พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในวิธีการตรึงเซลล์แบบห่อหุ้ม ได้แก่ เอทิลเซลลูโลส (Ethyl cellulose) พอลิสไตลีน (Polystyline) และเซลลูโลสไนเตรต (Cellulose nitrate)

### 2.7.1.4 การตรึงแบบกักขัง (Entrapment)

การตรึงเซลล์แบบกักขัง ใช้หลักการที่ให้เซลล์หรือเอนไซม์เป็นอิสระอยู่ในสารละลายคล้ายการตรึงแบบห่อหุ้ม แต่ถูกจำกัดการเคลื่อนที่ให้อยู่ในตาข่ายพอลิเมอร์ที่เกิดจากแรงเชื่อมกันไขว้กันโดยความพรุนของเจลจะควบคุมไม่ให้เซลล์หรือเอนไซม์หลุดออกมา ในขณะที่เดียวกัน สารอาหารและผลิตภัณฑ์ต้องสามารถผ่านเข้าออกเซลล์ได้ การเจริญเติบโตของเซลล์ภายในเม็ดเจลขึ้นอยู่กับความสามารถในการซึมผ่านของสารอาหาร ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของวัสดุที่ใช้ การตรึงเซลล์แบบกักขังทำให้การเจริญของเซลล์ที่อยู่ในเม็ดเจลแตกต่างกัน เซลล์จึงมีลักษณะแตกต่างกัน โดยเซลล์ที่มีการเจริญบนผิวหน้าของเซลล์ตรึงรูปจะมีลักษณะที่แตกต่างจากเซลล์ที่อยู่ภายในเซลล์ตรึงรูป



เนื่องจากภายในเซลล์ตรึงรูปมีปริมาณสารอาหารและออกซิเจนค่อนข้างจำกัด (Freeman and Lilly, 1998)

### 2.7.1.5 การตรึงเซลล์แบบเชื่อมไขว้ (Cross linking)

วิธีนี้เซลล์จะถูกตรึงโดยใช้สารเชื่อมไขว้ภายในและระหว่างโมเลกุลทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ภายในและระหว่างโมเลกุลทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ทั้ง 3 ทิศทาง และมีการจับกันเป็นก้อน โดยเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างเซลล์ สารที่นิยมใช้ในการตรึงด้วยการเชื่อมไขว้ เช่น กลูทาร์อลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) และโทลูอินไดไอโซไซยาเนต (Toluene diisocyanate) อย่างไรก็ตามสารเคมีเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการตรึงโดยวิธีนี้

นอกจากวิธีการตรึงเซลล์ 5 วิธีที่กล่าวมานั้น ยังมีการตรึงเซลล์แบบเชื่อมไขว้ทางกายภาพ เช่น การรวมตัวกันของเซลล์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น (Flocculation) ซึ่งทำให้แรงดึงดูดระหว่างเซลล์มีความแข็งแรงขึ้น (Ramakrishna and Prakasham, 2003)

### 2.7.2 คุณลักษณะที่ดีของตัวพุงที่ใช้ในการตรึงเซลล์

ตัวพุง (Carrier) หรือตัวกลางเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการตรึงเซลล์ โดยตัวกลางที่จะเป็นส่วนที่จุลินทรีย์สามารถเกาะติดได้ มีค่าความหนาแน่นของเนื้อสาร (Bulk density) ต่ำ น้ำหนักเบา มีพื้นผิวสัมผัสสูงเนื่องจากจะช่วยให้ออกซิเจนละลาย และจุลินทรีย์สามารถสัมผัสกันได้อย่างทั่วถึง และต้องทนต่อการกัดกร่อนของสารเคมี ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ตัวกลางจำพวกพลาสติก เช่น polypropylene เนื่องจากมีความทนทาน และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Gabriel et al., 2003; Cox et al., 2002) ซึ่งตัวกลางที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์สำหรับกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ ควรมีลักษณะดังนี้ (Kourkoutas et al., 2004)

- 1) มีพื้นที่ผิวเพียงพอและมีตำแหน่งสำหรับให้เซลล์เกาะยึดได้
- 2) สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้
- 3) มีความคงตัวสูง ใช้งานได้ง่าย และมีระยะเวลาของการใช้งานนาน
- 4) สามารถรักษากิจกรรมของเซลล์ได้เป็นอย่างดีเมื่อผ่านกระบวนการตรึงเซลล์
- 5) ลักษณะรูพรุนของตัวพุงควรมีลักษณะเป็นแบบเดียวกัน โดยสารตั้งต้น

ผลิตภัณฑ์ โคแฟกเตอร์ และก๊าซที่เกิดขึ้นสามารถแพร่ผ่านเข้าออกได้อย่างสะดวก

6) สามารถทนต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ สารละลาย แรงเฉือน และความดันที่เกิดขึ้นได้

7) มีความปลอดภัย ไม่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

8) วิธีการตรึงเซลล์และการใช้ตัวพุงนั้นควรเป็นวิธีการที่ง่ายและต้นทุนต่ำ และสามารถขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้นได้ข้อดีของการ

### 2.7.3 ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงรูป

การใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ มีข้อได้เปรียบเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระดังนี้ (Kourkoutas et al., 2004)

- 1) เพิ่มระยะเวลาของกิจกรรมและความคงตัวของตัวพยุง โดยการตรึงเซลล์จะช่วยป้องกันผลกระทบทางกายภาพและเคมี เช่น พีเอช (pH) อุณหภูมิ สารละลายและโลหะหนักต่างๆ เป็นต้น
- 2) มีความหนาแน่นของเซลล์ต่อปริมาตรถังหมักสูงทำให้ได้ปริมาณของสารผลิตภัณฑ์สูง โดยใช้ระยะเวลาของการหมักสั้นลง
- 3) เพิ่มความสามารถของเซลล์ในการใช้วัตถุดิบและเพิ่มผลผลิตได้ (Yield) ของการหมัก
- 4) สามารถใช้ได้ในการหมักแบบต่อเนื่องและใช้อัตราการเจือจางที่สูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของเซลล์อิสระ
- 5) เพิ่มความสามารถของเซลล์ในการทนต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูง และลดการเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นในระหว่างการหมัก
- 6) สามารถใช้ในการหมักที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งช่วยปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเฉพาะเครื่องดื่มแอลกอฮอล์
- 7) ง่ายต่อการจัดการหลังกระบวนการหมัก เช่น การแยกตะกอน การกรอง ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในด้านเครื่องมือและพลังงาน
- 8) สามารถนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่ เพื่อขยายระยะเวลาของการหมักแบบกะ (Batch) โดยไม่จำเป็นต้องมีการนำเอาตัวพยุงออกจากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ
- 9) ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์และกิจกรรมของการหมักสูง

### 2.7.4 ข้อจำกัดในการใช้เซลล์ตรึงรูป

- 1) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ อาจทำให้กิจกรรมของเซลล์เปลี่ยนแปลงหลังผ่านกระบวนการตรึงเซลล์
- 2) การใช้เซลล์ตรึงรูปอาจมีปัญหาเรื่องการแพร่ การขนส่งสารอาหารและผลิตภัณฑ์ผ่านสารพาหะที่ใช้ตรึงเซลล์
- 3) การใช้เซลล์ตรึงรูปในกระบวนการหมักเป็นระยะเวลานานๆ จะต้องมีมาตรการป้องกันการปนเปื้อน
- 4) ควรทราบชนิดของผลิตภัณฑ์ กระบวนการหมักที่ใช้เซลล์ตรึงรูป รวมทั้งการ

ควบคุมสภาวะของการหมักที่ใช้เซลล์ตรึงรูป รวมทั้งการควบคุมสภาวะของการหมัก เพื่อจะได้เลือกวิธีการตรึงเซลล์ที่เหมาะสม

## 2.8 คาร์บอนมอนอกไซด์

คาร์บอนมอนอกไซด์เป็นก๊าซไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและรส เกิดจากการสันดาปไม่สมบูรณ์ของสารประกอบคาร์บอน เบากว่าอากาศเพียงเล็กน้อยและละลายน้ำได้บ้าง ก๊าซนี้ดูดซึมรังสีอัลตราไวโอเล็ตในบรรยากาศชั้นโทรโปสเฟียร์ ในระยะของรังสีอินฟราเรด โดยมีจุดศูนย์กลางของการดูดซึมที่ความยาวคลื่น 4.67 ไมครอน จึงยกคุณสมบัติข้อนี้มาใช้ในหลักการตรวจวัดคาร์บอนมอนอกไซด์เป็นก๊าซเฉื่อยในสภาพอุณหภูมิและความกดดันอากาศปกติ (25 องศาเซลเซียส และความดัน 1 บรรยากาศ) แต่ไวต่อปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงและเป็นตัวลดออกซิเจนได้อย่างดีหากมีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นโลหะ เช่น พาลาเดียมกับซิลิกาเจล หรือส่วนผสมของแมงกานีส และออกไซด์ของทองแดง จะเกิดปฏิกิริยาเติมออกซิเจนให้ก๊าซนี้กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยเร็วยิ่งขึ้น (วงศ์พันธ์ ลิ้มปเสนีย์ และคณะ, 2538) นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์สามารถใช้ในการงานอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการแยกธาตุเกิดจากสินแร่ที่ประกอบด้วย เหล็ก โคบอลต์ และทองแดง นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิตโลหะผสมบางชนิด

### 2.8.1 ผลกระทบของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ต่อสภาวะแวดล้อม

ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ เป็นก๊าซมลพิษชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดการทำลายโอโซนในบรรยากาศ แต่ผลกระทบของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ต่อการทำลายโอโซนในบรรยากาศมีน้อยมาก ผลที่ได้รับจากการที่ชั้นโอโซนในบรรยากาศถูกทำลาย มีอยู่ 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ รังสีอัลตราไวโอเล็ตผ่านลงสู่ผิวโลก และอุณหภูมิของโลกเพิ่มมากขึ้น

#### (1) ผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตผ่านลงสู่ผิวโลก

ผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีต่อพืช คือ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ทำลายฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต ยับยั้งการงอกของเมล็ด และพืชมีการเจริญเติบโตผิดปกติ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะโปรตีน และกรดนิวคลีอิกมีความสามารถในการดูดซึมรังสีที่มีความยาวคลื่นใกล้เคียงกันได้มากที่สุด ดังนั้นจึงเกิดการทำลายดีเอ็นเอ ซึ่งมีผลต่อการกลายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ยังทำให้การสังเคราะห์แสงของพืชลดลงอีกด้วย

#### (2) ผลกระทบจากอุณหภูมิของโลกเพิ่มขึ้น

ระดับน้ำทะเลสูงขึ้น ทั้งนี้เพราะน้ำทะเลขยายตัวขึ้น และน้ำแข็งแถบขั้วโลกละลาย ก่อให้เกิดผลกระทบต่อพื้นที่ชายทะเลและกิจกรรมต่างๆ ในบริเวณนั้น เช่นการเพาะเลี้ยงสัตว์ การท่องเที่ยว ชุมชน การเกษตรกรรม ตลอดจนทรัพยากรธรรมชาติ ป่าชายเลน ชายหาด ได้รับความเสียหาย และระบบนิเวศน์แปรปรวนไป แหล่งน้ำจืดซึ่งเชื่อมกับทะเลทั้งที่เป็นน้ำผิวดิน และน้ำใต้ดิน เช่น แม่น้ำ และบ่อน้ำบาดาล ฯลฯ ย่อมถูกลุกน้ำโดยน้ำเค็ม เป็นผลให้น้ำเค็มขึ้น

ผลกระทบต่อภูมิอากาศ หากบรรยากาศแถบขั้วโลกร้อนขึ้น ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิที่บริเวณเส้นศูนย์สูตร และขั้วโลกย่อมลดน้อยลง ส่งผลต่อภูมิอากาศในระดับโลก เช่น ลมและฝน นอกจากนี้อาจเพิ่มภาวะความกดอากาศต่ำ ซึ่งเสริมให้ลมมรสุมมีกำลังแรง และเกิดน้ำท่วมบางกรณีถ้ามีฝนตกหนัก ประกอบกับหิมะละลาย อาจเกิดปัญหาน้ำเซาะดินทะเลาะลง เพิ่มความชื้นและอัตราการตกตะกอนตามเส้นทางคมนาคมทางน้ำ หมู่ปะการัง และป่าชายเลน และอาจเกิดความแห้งแล้งในบางบริเวณ สิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ซึ่งไม่ทนต่อสภาวะความเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ อาจสูญพันธุ์ได้ (วงศ์พันธ์ ลิ้มปเสนีย์ และคณะ, 2538)

### 2.8.2 ผลกระทบของก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ต่อสุขภาพอนามัย

ร่างกายของมนุษย์ต้องการออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์ต่างๆ บางระบบ เช่น ระบบสมอง ส่วนกลางจะไวต่อการขาดออกซิเจนมาก เมื่อใดที่สมองอยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนนานเกินควร ก็จะทำให้เกิดการเสื่อมสภาพโดยไม่อาจฟื้นฟูให้ดีเหมือนเดิมได้

เมื่อมนุษย์หายใจเอาอากาศเข้าสู่ปอด ออกซิเจนในอากาศจะจับตัวอย่างไม่แน่นกับฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดง ปฏิกริยาเติมออกซิเจน (Oxygenation) ในโลหิตนี้ทำให้เกิดสารประกอบไม่คงตัว คือ ออกซีฮีโมโกลบิน (Oxyhemoglobin-HbO<sub>2</sub>) หัวใจจะสูบฉีดโลหิตนี้ไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย และออกซีฮีโมโกลบินจะแตกตัวออก ปลดปล่อยออกซิเจนให้แก่เซลล์และในขณะเดียวกันก็รับเอาของเสียออกจากเซลล์ด้วย

ก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์เข้าสู่ปอดเมื่อหายใจเข้า และฟุ้งผ่านเยื่อในปอด (Alveolar capillary membrane) ด้วยวิธีการเดียวกับออกซิเจน ถ้าคนอยู่ในบรรยากาศที่มีระดับความเข้มข้นของก๊าซนี้อย่างคงที่เป็นเวลานานนับชั่วโมง อัตราที่ร่างกายรับก๊าซนี้จะลดลงอย่างเฉียบพลันจนกว่าจะถึงระดับสมดุล นั่นคือ เมื่อความกดตันก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ในโลหิต ในเส้นโลหิตฝอยในปอด (Pulmonary capillary blood) เท่ากันกับความกดตันในปอด

ก๊าซนี้มีผลกระทบต่อระบบประสาทรวมอย่างรวดเร็ว ดังนั้นแม้แต่เมื่อร่างกายได้รับก๊าซที่ระดับต่ำก็อาจมีผลต่อสมรรถนะในการระมัดระวัง การจำแนก การทำงานประณีต และงานใช้กำลัง

คนเริ่มมีพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงได้เมื่อมีคาร์บอนมอนนอกไซด์ที่จับกับฮีโมโกลบิน ตั้งแต่ (HbCO) 2-3 % โดยไม่อาจจำแนกความแตกต่างเล็กน้อย ภายในระยะเวลาสั้นได้ และสมรรถนะในการระมัดระวังจะเริ่มผิดปกติเมื่อมี HbCO เพิ่มขึ้นถึง 3 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับ HbCO ประมาณ 7% ความสามารถในการเรียนรู้เริ่มลดลง

ก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ในระดับสูงมีผลต่อการทำงานของหัวใจอย่างฉับพลัน ทำให้หัวใจผิดปกติ เช่น เต้นเร็วขึ้น เพิ่มจังหวะเต้น เริ่มอาการโรคหัวใจ (angina pectoris) ถี่ขึ้น นอกจากนี้ อาจมีอาการหัวใจโตชั่วคราว (Temporary heart dilation) การหอบหืดของหัวใจเนื่องจากขาดอากาศ (Cardiac asthma) และหลอดเลือดที่ปลายประสาทผิดปกติ (วงศ์พันธ์ ลิ้มปเสนีย์ และคณะ, 2538)

4) ผลกระทบต่อแหล่งพลังงาน เช่น เกิดผลกระทบต่อการขุดเจาะน้ำมันในทะเลและมหาสมุทร เนื่องจากเกิดพายุและมรสุมที่เกิดจากสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงไป

5) ผลกระทบต่อสุขภาพอนามัย มนุษย์จะได้รับผลกระทบโดยตรงจากภาวะมลพิษ เกิดปัญหากระทบต่อสุขภาพจิต ปัญหาสุขภาพกาย และอาจทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้มากขึ้น

## 2.10 ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen, H<sub>2</sub>)

พลังงานไฮโดรเจน (Hydrogen, H<sub>2</sub>) ซึ่งถือได้ว่าเป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับการเผาไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง สะอาด และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ได้รับการคาดหวังและยอมรับว่าจะเป็นแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงที่สำคัญอย่างมากในอนาคต ในปัจจุบันนี้กระบวนการเปลี่ยนรูปสารไฮโดรคาร์บอนด้วยไอน้ำ (Steam reforming of hydrocarbons) เป็นกระบวนการที่ใหญ่ที่สุดสำหรับการผลิตพลังงานไฮโดรเจน แต่ปัญหาหลักที่สำคัญมากของกระบวนการนี้คือ การปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมากซึ่งเป็นสาเหตุของสภาวะโลกร้อนหรือปรากฏการณ์เรือนกระจก นอกจากนี้แล้วยังประสบปัญหาการขาดแคลนแหล่งของไฮโดรคาร์บอนที่นำมาใช้ในกระบวนการอีกด้วย ดังนั้นกระบวนการอื่นซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ที่ปลอดภัย และสามารถผลิตพลังงานไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงควรได้มีการพัฒนาขึ้นเพื่อรองรับความต้องการพลังงานไฮโดรเจนในอนาคต

ก๊าซไฮโดรเจนถือได้ว่าเป็นเชื้อเพลิงอนาคต ทั้งนี้เนื่องจากไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเกิดการเผาไหม้กับก๊าซออกซิเจน โดยจะมีเพียงไอน้ำเป็นผลพลอยได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อเพลิงอื่นๆที่ทำให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก (Greenhouse gas) ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการทำให้โลกร้อนขึ้น (Global warming) นอกจากนี้ยังสามารถนำก๊าซไฮโดรเจนไปผลิตกระแสไฟฟ้าโดยป้อนเข้าเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ซึ่งขณะนี้นักวิจัยทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการพัฒนาเซลล์เชื้อเพลิงมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เนื่องจากประสิทธิภาพของเซลล์เชื้อเพลิงมีค่าสูงกว่าอุปกรณ์ผลิตไฟฟ้าแบบอื่นๆมาก ดังนั้นพลังงานไฮโดรเจนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานดั้งเดิมได้ เนื่องจากคุณสมบัติในด้านต่างๆโดยสรุปดังนี้

1. แหล่งพลังงานดั้งเดิมก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ซึ่งก๊าซชนิดนี้ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลกโดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซึ่งเกิดจากการสันดาป (Combustion) ของสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำมัน แต่พลังงานไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด ไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก ดังนั้นจึงไม่ส่งผลให้เกิดภาวะเรือนกระจก

2. การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงดั้งเดิม ไม่ว่าจะมาจากยานพาหนะหรือแหล่งอุตสาหกรรมต่าง ๆ ก่อให้เกิดกลุ่มควันและฝุ่นละออง แต่พลังงานไฮโดรเจนไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศเหล่านี้

3. พลังงานไฮโดรเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานที่ต้องใช้พลังงานดั้งเดิมได้ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับครัวเรือน เครื่องยนต์สันดาปภายใน เครื่องกังหัน และเครื่องไอพ่น

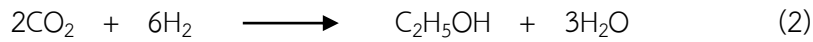
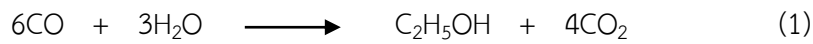
4. ค่าพลังงานเชื้อเพลิงที่ได้จากไฮโดรเจนจะมากกว่าค่าพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรคาร์บอน และเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลและเอทานอลถึง 2.5 และ 5 เท่าตามลำดับ
5. ก๊าซไฮโดรเจนสามารถนำไปใช้กับเซลล์เชื้อเพลิง (Fuel cell) ในการผลิตไฟฟ้า ซึ่งอยู่ระหว่างการพัฒนาและคาดว่าจะนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอนาคต

ดังนั้นโครงการศึกษาวิจัยนี้จะทำการพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลด้วยระบบ Continuous fixed-film bioreactor จากก๊าซผสมระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนด้วยจุลินทรีย์ SUTSP5 ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนดังกล่าวให้เป็นเอทานอลเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเกิดพลังงานทดแทนในรูปของเอทานอลและทำให้ลดมลพิษทางอากาศที่เกิดจากอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อีกทางหนึ่ง โดยมีกรอบแนวคิดในการวิจัยดังนี้

### 2.11 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

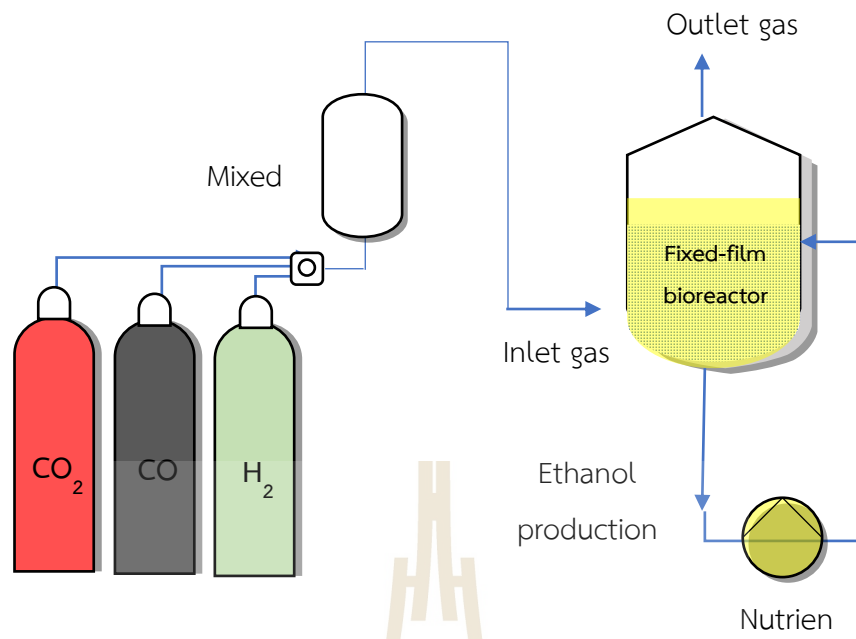
การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (Immobilized cell) มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวทำให้ปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นและมีประสิทธิภาพในการทำงานในระบบต่างๆ มากขึ้นด้วย (Qureshi et al., 2005) ซึ่งการตรึงเซลล์จุลินทรีย์บนวัสดุที่เหมาะสมจะทำให้เกิดชั้นของไบโอฟิล์ม (Biofilm) วัสดุที่เหมาะสมต้องมีพื้นผิวหยาบ (Rough surface) มีลักษณะเป็นรูพรุน (Porous materials) ซึ่งวัสดุที่ทำให้เกิดไบโอฟิล์มได้ดีและรวดเร็วได้แก่วัสดุจำพวกพลาสติกซึ่งจะเกิดไบโอฟิล์มได้ดีกว่าการใช้พวกแก้วหรือโลหะเป็นวัสดุในการตรึงเซลล์ (Characklis et al., 1990; Donlan and Costerton, 2002) โดยสามารถใช้ในระบบที่มีการทำงานอย่างต่อเนื่องได้ ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้มีการประยุกต์นำการตรึงเซลล์จุลินทรีย์มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลและเป็นระบบต่อเนื่องจึงเรียกว่า Continuous fixed-film bioreactor ดังภาพที่ 1-1

ซึ่งกระบวนการผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจน เป็นกระบวนการหนึ่งที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Mckendry, 2002; Rajagopalan et al., 2002; Sakai et al., 2005; Antoni et al., 2007) การนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจนหรือ Synthesis gas ที่เกิดจากการเผาไหม้ชีวมวลหรือเรียกว่ากระบวนการที่ทำให้เกิดก๊าซ (Gasification) แล้วนำไปผ่านกระบวนการหมัก (Fermentation) ด้วยจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ก๊าซคาร์บอนได้เรียกว่า Autotrophic bacteria จะทำให้เกิดเอทานอลขึ้น (Reed and Jantzen, 1979; Vega et al., 1990; Klasson et al., 1992; Natarajan et al., 1998; Datar, 2004) หรืออาจใช้ก๊าซที่มีคาร์บอนเพียงพอ (Carbon-rich gaseous) เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้เช่นเดียวกัน (Cotter, 2006) ตามปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 (Vega et al., 1990; Phillips et al., 1994)



จากปฏิกิริยาดังกล่าวมีก๊าซไฮโดรเจนเป็นก๊าซอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีส่วนในการผลิตเอทานอลได้สมบูรณ์มากขึ้นเช่นเดียวกับก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และคาร์บอนไดออกไซด์ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหมักก๊าซคาร์บอนดังกล่าวให้เป็นเอทานอลได้นั้น ได้แก่ *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium autoethanogenum*, *Moorella* sp. HUC22-1, and *Bacterium* P7 (Barik et al., 1988; Abrini et al., 1993; Rajagopalan et al., 2002; Datar et al., 2004; Sakai et al., 2004) ขณะเดียวกันโครงการศึกษาวิจัยการผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์ที่ผ่านมามีจุลินทรีย์ 2 ชนิดที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ นั่นคือ SUTSP1 และ SUTSP5 ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้ 0.02% ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง และจากปฏิกิริยาที่ 1 และ 2 มีการนำก๊าซไฮโดรเจนมาเป็นก๊าซตั้งต้นอีกชนิดหนึ่ง ขณะเดียวกันการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ที่ช่วยผลิตเอทานอลอาจทำให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ปริมาณมากขึ้น

ซึ่งโครงการศึกษาวิจัยนี้จะทำการพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลด้วยระบบ Continuous fixed-film bioreactor จากก๊าซผสมระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนด้วยจุลินทรีย์ SUTSP5 ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนดังกล่าวให้เป็นเอทานอล ทั้งนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลจากก๊าซผสม  $\text{CO}_2$ :  $\text{CO}$ :  $\text{H}_2$  ได้ดีกว่า SUTSP1 จากนั้นสร้างแบบจำลองการผลิตเอทานอลด้วยระบบ Continuous fixed-film bioreactor ขึ้น ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนจะเป็นสารตั้งต้นในการผลิต โดยในถังปฏิกิริยาจะมีพลาสติกมีเดียหรือตัวกลางที่ถูกตรึงด้วยจุลินทรีย์ SUTSP5 ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล จะทำการเปลี่ยนก๊าซผสมดังกล่าวที่เข้าสู่ถังปฏิกิริยาให้เป็นเอทานอล จากกระบวนการดังกล่าวทำให้ได้แบบจำลองการผลิตเอทานอลดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 แบบจำลองการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิซ-ฟิล์มรีแอกเตอร์แบบต่อเนื่อง



เมื่อร่างกายได้รับก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์มากๆ ทำให้ร่างกายเกิดอาการขาดออกซิเจน ทำให้อ่อนเพลีย วิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ ตาพร่ามัว ง่วงนอนและหมดสติ ชัก เนื่องจากสมองขาดออกซิเจนและถึงตายได้ในที่สุด (สำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2533)

## 2.9 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซไม่มีสี ไม่ติดไฟ หนักกว่าอากาศประมาณ 1.5 เท่า สามารถอยู่ได้ทั้ง 3 สถานะ คือ ก๊าซ ของแข็ง และของเหลว สามารถทำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นของเหลวได้โดยใช้ความดันประมาณ 300 psi ที่อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส และเมื่อลดอุณหภูมิลงถึง -56.6 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 60.4 psi จะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวนั้นเริ่มแข็งตัว และเมื่อลดอุณหภูมิถึง -78.5 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์เหลวดังกล่าวจะจับตัวกันกลายเป็นน้ำแข็งแห้ง (Parker, 1992)

### 2.9.1 ประโยชน์ของคาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน ใช้เป็นสารทำความเย็น เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง ทำให้สามารถเก็บอาหารไว้ได้ยาวนานขึ้น ในอุตสาหกรรมพลาสติก จะใช้ในการลดความร้อนของแม่พิมพ์ขณะขึ้นรูปพลาสติกทำให้สามารถเริ่มขึ้นงานต่อไปได้เร็วขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิต ในอุตสาหกรรมหนักนำไปใช้ช่วยลดอุณหภูมิในกระบวนการหลอมเหล็กและการเชื่อมโลหะในการประกอบอุปกรณ์บางชนิดเข้าด้วยกัน เช่น การสวมตลับลูกปืนเข้าไปในเพลลา โดยคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้เพลลาหดตัวลงทำให้สามารถสวมตลับลูกปืนเข้าไปได้ง่ายยิ่งขึ้น ในทางการแพทย์นั้นสามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อได้ สำหรับอุตสาหกรรมน้ำอัดลมจะใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนประกอบอีกด้วย ในการปรับปรุงคุณภาพของเสียจากโรงงานซึ่งอาจมีสภาพเป็นด่างสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในการปรับสภาพของน้ำเสียนั้นให้เป็นกลางได้นอกจากนี้ยังใช้คาร์บอนไดออกไซด์มาทำเป็นสารดับเพลิงได้อีกด้วย (Parker, 1992)

### 2.9.2 ผลกระทบของคาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะทำให้อุณหภูมิของโลกสูงขึ้น เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์จะดูดกลืนรังสีคลื่นสั้นเอาไว้ ซึ่งจะทำให้เกิดผลกระทบ ดังนี้ (Jeremy, 1990)

1) ผลกระทบต่อภูมิอากาศ จะทำให้เกิดพายุ อุณหภูมิระหว่างขั้วโลกและเส้นศูนย์สูตรจะลดลง เพิ่มภาวะความกดดันอากาศต่ำ จะทำให้มีลมมรสุมแรงและฝนตกหนัก หิมะละลาย

2) ผลกระทบต่อแหล่งน้ำ ทำให้เกิดน้ำท่วม เนื่องจากระดับน้ำทะเลสูงขึ้น หรือบางแห่งอาจเกิดความแห้งแล้ง เมื่อมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์มากพืชจะสังเคราะห์แสงได้มากทำให้ต้องการน้ำมากขึ้น

3) ผลกระทบต่อเกษตรกรรม คาร์บอนไดออกไซด์จะไปเร่งการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชปรับตัวไม่ทัน อาจทำให้เกิดการสูญพันธุ์ได้

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟลักซ์-ฟิล์มไบโอรีแอคเตอร์มีการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการทำงานของระบบ โดยมีรายละเอียดดังนี้

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองเพื่อพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลด้วยการตรึงเซลล์ด้วยจุลินทรีย์ SUTSP5

#### 3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

##### 3.2.1 จุลินทรีย์ในการทดลอง (Ethanol producing microorganisms)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองทำการแยกจากตะกอนในระบบบำบัดน้ำเสียแบบสภาวะไร้อากาศ (Anaerobic lagoon) จากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีระบบนี้ (สิราภรณ์และคณะ, 2553) ซึ่งได้ทำการศึกษาวินิจฉัยแล้วว่าสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาโดยการเพิ่มสารตั้งต้นเป็นก๊าซไฮโดรเจนร่วมกับพบว่า จุลินทรีย์ SUTSP5 มีความสามารถในการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสม  $\text{CO}_2$ :  $\text{CO}$ :  $\text{H}_2$  ได้ดีกว่า SUTSP1 ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงคัดเลือกใช้จุลินทรีย์ SUTSP5 เป็นจุลินทรีย์ในการพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลต่อไป เพื่อพัฒนาต่อยอดการผลิตเอทานอลให้เพิ่มขึ้น จุลินทรีย์ SUTSP5 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Enrichment medium) 10 มิลลิลิตร ที่พีเอช 5-6 ในขวดซีรัม (Serum bottle) และเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจนเพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศในปริมาตร 30:50:60 v/v แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศก่อนที่จะดำเนินการทดลองต่อไป

##### 3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Enrichment medium)

อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรมีส่วนประกอบดังนี้ 1.0 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์, 0.8 กรัม โซเดียมคลอไรด์, 0.1 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์, 0.1 กรัม โพแทสเซียมโมโนฟอสเฟต, 0.2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต, 20 มิลลิกรัม แคลเซียมคลอไรด์, 1.0 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต 1.0 กรัม ยีสต์เอกซเทรค, 0.2 กรัม ซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์, 0.2 กรัม โซเดียมซัลไฟด์, 20 มิลลิโมล โบโรไมเอเทนซัลโฟนิคเอซิค และเพิ่ม 10 มิลลิลิตรของแร่ธาตุที่สำคัญและธาตุโลหะที่สำคัญตามส่วนประกอบของสารอาหารในถังปฏิกรณ์

##### 3.2.3 สารอาหารรวมในถังปฏิกรณ์ (Combination nutrient)

สารอาหารรวม 1 ลิตรพัฒนาจากการศึกษาระบบการผลิตเอทานอล (EthaRex system)

ที่เหมาะสมสำหรับระบบนี้ในการศึกษา ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ประกอบด้วย 3.0 กรัม ของบีฟอกซ์แทรกซ์ และ 5 กรัม เพปโทน ซึ่งในถังสารอาหารนี้จะมีอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว 2 ลิตรในการเดินระบบ

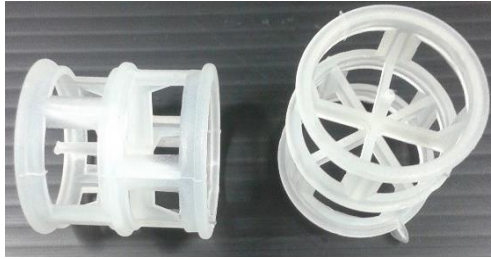
### 3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UE 500
2. ตู้บ่มเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ TKA รุ่น Steroclave 24 และ ยี่ห้อ Hiclave รุ่น HV-50
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น AG 285
5. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Precisa รุ่น XT 1200 C
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Jenway รุ่น 3510
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) ยี่ห้อ HOLTEN รุ่น SAFE 2010
8. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 7890A
9. เครื่องควบคุมอัตราการไหลของของเหลว (Peristaltic pump) ยี่ห้อ Watson Marlow รุ่น SCIQ 323
10. อ่างส่งคลื่นความถี่สูง (Ultrasonicator bath) ยี่ห้อ Bandelin รุ่น DT series

### 3.4 การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอล (Continuous fixed-film bioreactor)

#### 3.4.1 การตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

ตัวกลางสำหรับการตรึงเซลล์ทำด้วยพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว ดังแสดงในภาพที่ 3-1 ดำเนินการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ โดยชั่งน้ำหนักตัวกลาง Polypropylene pall ring จนน้ำหนักของตัวกลางคงที่ก่อนเริ่มตรึงเซลล์ (Cell immobilization) เริ่มการตรึงเซลล์โดยนำจุลินทรีย์ SUTSP5 ที่เพาะเลี้ยงในวันที่มีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์สูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ  $1.67 \times 10^9$  CFU/ml ผลจากการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (สิราภรณ์และคณะ, 2553) จากนั้นนำตัวกลาง Polypropylene pall ring ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ใส่ลงไปในช่วงทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient broth) ที่ทำการฆ่าเชื้อไว้แล้วด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (auto clave) และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน สุ่มตัวแทน (Random) ตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring เพื่อชั่งน้ำหนักหลังการตรึงเซลล์ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอยู่กับตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring



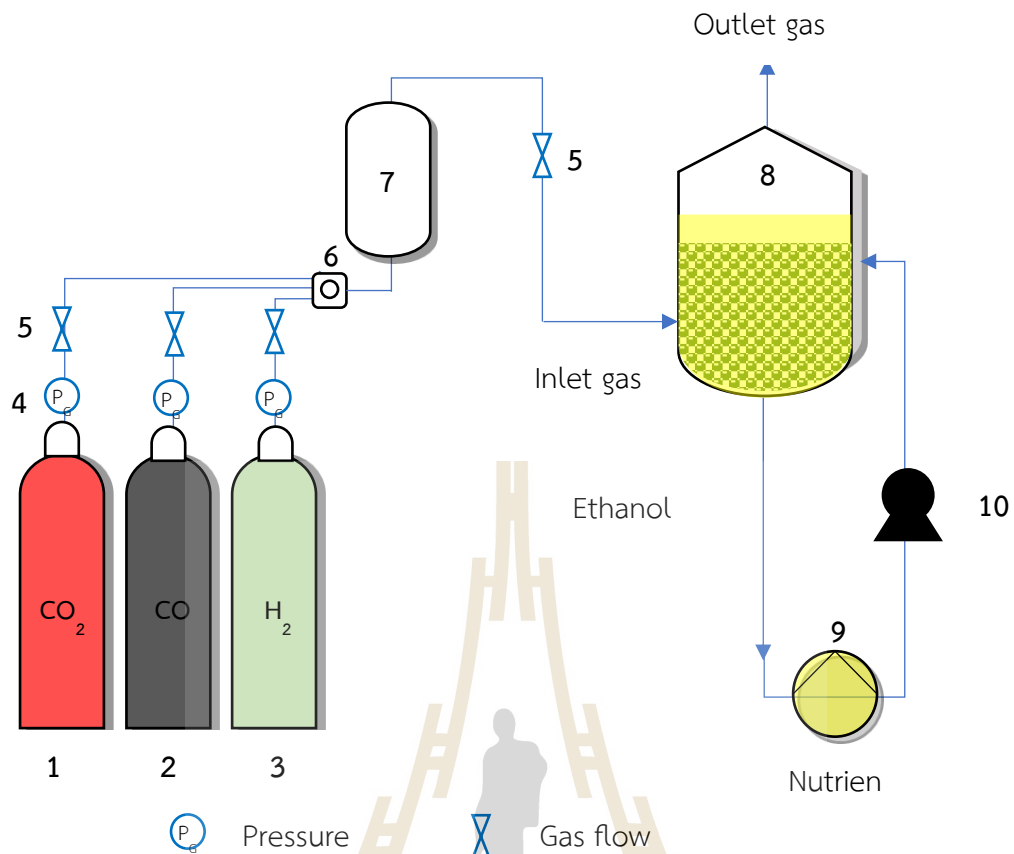
ภาพที่ 3-1 ตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall ring สำหรับให้จุลินทรีย์ยึดเกาะ



ภาพที่ 3-2 การตรึงจุลินทรีย์บนตัวกลาง (Cell immobilization)

#### 3.4.2 ระบบการผลิตเอทานอลแบบฟิกซ์-ฟิล์ม (Continuous fixed-film bioreactor)

ถังปฏิกิริยาของระบบทำจากแก้วซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.15 เมตร และความสูงเท่ากับ 0.30 เมตร โดยมีตัวกลางทำจากวัสดุโพลีโพรไพลีน (Polypropylene) ที่ให้จุลินทรีย์ SUTSP5 ยึดเกาะอยู่ในถังปฏิกิริยา ซึ่งเติมก๊าซที่มีส่วนผสมระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการไหลคงที่ ดังตารางที่ 3-1 และมีถังสำหรับใส่สารอาหารรวมให้ไหลเวียน (Recirculation tank) (ภาพที่ 3-3 และภาพที่ 3-4) ตลอดเวลาขณะเดินระบบ เดินระบบเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเพื่อศึกษาการจำลองระบบอย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 3-3 แบบจำลองระบบการผลิตเอทานอลจากระบบ Continuous fixed-film bioreactor

(1.  $\text{CO}_2$  gas; 2.  $\text{CO}$  gas; 3.  $\text{H}_2$  gas; 4. Regulator; 5. Flow meter; 6. 3-way connector tank; 7. Gas mixing tank; 8. Fixed-film bioreactor; 9. Recirculation tank; 10. Peristaltic pump)



ภาพที่ 3-4 การผลิตเอทานอลจากระบบ Continuous fixed-film bioreactor (FEthaRex system)

ตารางที่ 3-1 สภาวะและตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย

ตัวแปรที่ศึกษา	ค่าที่ใช้ในการทดลอง	
	การทดลองที่ 1	การทดลองที่ 2
ปริมาณก๊าซ CO <sub>2</sub> : CO: H <sub>2</sub> (vol%:vol%:vol%)	15:25:40	30:50:20
อัตราการไหลของก๊าซ (mL/min)	100	100
อัตราการไหลของของเหลว (mL/min)	20	20
ความสูงของตัวกลาง (m)	0.24	0.24
สารอาหารรวมในถังปฏิกรณ์ (L)	2	2
ค่าพีเอชในถังปฏิกรณ์	5-6	5-6
ระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	24, 48	24, 48

### 3.4.3 การวิเคราะห์ผลการศึกษา

วัดอัตราการไหลของก๊าซแต่ละชนิดด้วย Gas Flowmeter วิเคราะห์การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธีเทคนิคการนับโคโลนี (Colony count technique) รวมทั้งจำนวนของจุลินทรีย์ที่เจริญบนตัวกลาง Polypropylene ก่อนและหลังการเดินระบบ สำหรับการวิเคราะห์เอทานอลทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในระบบจากนั้นวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีชนิด Flame Ionization Detector ด้วยการนำตัวอย่างของเหลวที่กลั่นได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติม 0.3% n-propanol เป็น internal standard ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวด Screw cap vial นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยการใช้เครื่อง GC-FID ด้วยวิธี Head space technique โดยสภาวะของ Gas chromatograph จะควบคุมโดยใช้

Column	;	HP-INNOWAX, 30 m, DI 0.25 mm, Film ticks 0.25 $\mu\text{m}$ .
Inlet temperature	;	100 $^{\circ}\text{C}$
Front inlet (Carrier gas)	;	Helium
Flow gas	;	4.1 ml/min
Average velocity	;	64.733 cm/sec
Run time	;	6 min
Mode	;	Splitless mode
Oven initial temperature	:	40 $^{\circ}\text{C}$ 6 minute
Back detector FID	;	250 $^{\circ}\text{C}$
H <sub>2</sub> flow	;	40 ml/min
Air flow	;	300 ml/min
Makeup flow	;	25 ml/min
Const Col + Makeup	;	29.1 ml/min

### การคำนวณ

1) การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบ วิเคราะห์ด้วยวิธีเทคนิคการนับโคโลนี (Colony count technique)

#### การคำนวณ

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี} \times \text{สัดส่วนเจือจาง}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

2) การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

2.1) การสร้างกราฟมาตรฐานจากการหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเอทานอลจากสมการ

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเอทานอล}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายใน}}$$

นำอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลไปเขียนกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

2.2) การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลจากการหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างจากสมการ

$$\text{พื้นที่ใต้กราฟ} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลในตัวอย่าง}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายใน}}$$

นำอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างที่คำนวณได้เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลในกราฟมาตรฐาน



## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ปัจจุบันการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนพลังงานจากฟอสซิลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเกือบทั่วโลก โดยเอทานอลดังกล่าวได้จากการหมักวัตถุดิบที่มีน้ำตาลด้วยยีสต์หรือเรียกว่า “เอทานอลชีวภาพ” (bioethanol) จึงมีการขยายการผลิตเอทานอลเพื่อตอบสนองความต้องการในการใช้ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ได้มีการกำหนดนโยบายเกี่ยวกับการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนเช่นเดียวกัน โดยวัตถุดิบที่ใช้ ได้แก่ อ้อยและมันสำปะหลัง และกำหนดเป้าหมายการใช้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนเพิ่มขึ้นเป็น 9 ล้านลิตรต่อวัน ภายในปี 2564 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557) โดยในแถบเอเชียประเทศไทยนับว่าเป็นตลาดที่สำคัญอันดับ 3 รองจากจีนและอินเดียที่ใช้เอทานอลชีวภาพเพื่อเป็นพลังงานทดแทน (Nguyen, et. al., 2008) อย่างไรก็ตามจากกระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดความต้องการข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง หรือกากน้ำตาล จำนวนมาก เพื่อให้ทันต่อความต้องการในการผลิตเอทานอล (Baker and Zahniser, 2006) จึงเกิดการพัฒนาแนวคิดในการนำก๊าซที่ปล่อยจากกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมหรือในการเผาไหม้ ซึ่งเป็นปัญหาทำให้เกิดมลพิษทางอากาศ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ มาใช้ในการผลิตเอทานอล (Demirbas et al., 2002) นั้น เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเกิดพลังงานทดแทนในรูปของเอทานอลและทำให้ลดมลพิษทางอากาศที่เกิดจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ อีกทางหนึ่ง ซึ่งการศึกษานี้เป็นต่อยอดการพัฒนาความสามารถของ *Petrobacter* sp. SUTSP5 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลด้วยการประยุกต์ใช้ระบบฟิสิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film EthaRex or FEthaRex) ซึ่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบฟิล์มตรึง และประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลมีผลการศึกษา ดังนี้

- 4.1 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (Cell immobilization)
- 4.2 การศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film)

#### 4.1 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ (Cell immobilization)

การผลิตเอทานอลด้วยระบบแบบฟิสิกซ์-ฟิล์มนั้น จุลินทรีย์จะถูกตรึง/ยึดติดกับตัวกลางเพื่อเพิ่มความสามารถในการทำงานของเซลล์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมที่มีความสามารถสูง คือ *Petrobacter* sp. SUTSP5 จากผลการเจริญเติบโต (growth curve) ของจุลินทรีย์ที่ผ่านมา พบว่าจุลินทรีย์นี้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ และสามารถเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้เมื่อมีองค์ประกอบของก๊าซผสมที่มีส่วนของคาร์บอนเป็นสารอาหารหรือสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล (สิราภรณ์และคณะ, 2553; 2556) จากการนำจุลินทรีย์ในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 4 นั่นคือ

1.25 × 10<sup>8</sup> CFU/ml (ตารางที่ 4-1) ดังกล่าวตริงบนผิวตัวกลางตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring พบว่ามีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจากการสุ่ม (Random) จำนวน 5 ซึ้น น้ำหนักตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 0.0031±0.0023 กรัม น้ำหนักของตัวกลางที่เพิ่มขึ้นบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของเซลล์จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะอยู่บนตัวกลาง ทั้งนี้ภายหลังจากการตริงเซลล์ 20 วัน ก่อนเริ่มเดินระบบพบว่ามียังมีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะอยู่บนตัวกลางเท่ากับ 4.75 × 10<sup>7</sup> CFU/ml เช่นเดียวกับจุลินทรีย์แขวนลอยที่มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 4.20 × 10<sup>7</sup> CFU/ml (ตารางที่ 4-1 และ 4-2) การที่มีจุลินทรีย์แขวนลอยในจำนวนใกล้เคียงกับที่ยึดติดกับตัวกลางอาจเกิดจากการที่เซลล์ของจุลินทรีย์มีกระบวนการเกาะ การยึดติด การเจริญ และการหลุดออกจากตัวกลาง (ภาพที่ 4-1) รวมถึงเกิดจากการเจริญของเซลล์ที่อยู่ภายในเซลล์ส่งผลให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในเซลล์ตริงรูปและก๊าซที่เกิดขึ้นนี้ไม่สามารถแพร่ออกสู่ภายนอกชั้นฟิล์มได้ ส่งผลให้เกิดความดันขึ้นภายในเซลล์ ทำให้ชั้นฟิล์มตริงเกิดการแตกและหลุดออกมาทำให้ปริมาณเซลล์อิสระเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน ซึ่งในกระบวนการนี้เซลล์ของจุลินทรีย์มักมีจำนวนที่สมดุลกันในการยึดติด การเจริญ และการหลุดจากตัวกลาง (Escher and Characklis, 1990; Vieira et al., 1993; Gottenbos et al., 1999)

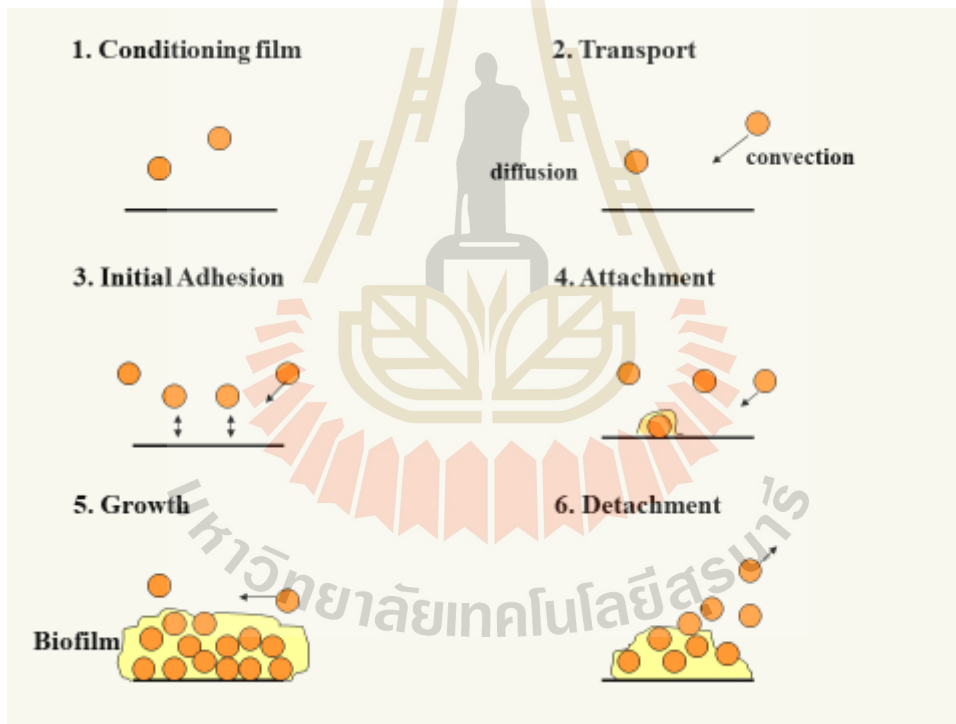
ตารางที่ 4-1 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลาการศึกษา

จุลินทรีย์	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)
จำนวนเซลล์เริ่มต้นก่อนตริงเซลล์	1.25 × 10 <sup>8</sup>
จำนวนเซลล์แขวนลอยหลังตริงเซลล์ 20 วัน ในอาหาร Nutrient broth	4.20 × 10 <sup>7</sup>
จำนวนเซลล์ยึดเกาะบนตัวกลาง PP ring หลังตริงเซลล์ 20 วัน ในอาหาร Nutrient broth	4.75 × 10 <sup>7</sup>

ตารางที่ 4-2 การสุ่ม (Random) ชั่งน้ำหนักตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring  
หลังจากการตรึงเซลล์ (Cell immobilization)

ลำดับที่	น้ำหนักตัวกลาง PP ring ที่เพิ่มขึ้น* (กรัม)
1	0.0031±0.0000
2	0.0030±0.0003
3	0.0014±0.0001
4	0.0010±0.0003
5	0.0069±0.0003
เฉลี่ย (Average)	0.0031±0.0023

หมายเหตุ: \* ผลเฉลี่ย (Average) ที่ได้จากการทดลอง (Mean±SD)



ภาพที่ 4-1 กระบวนการเกิดฟิล์มชีวภาพ (Biofilm formation) (ปรับปรุงจาก Gottenbos et al., 1999)

#### 4.2 การศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film)

การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากเริ่มแรกที่มีการศึกษาด้วยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถแขวนลอยในระบบ (Suspended cells) มาเป็นระบบฟิกซ์-ฟิล์มนั้นอาจส่งเสริมให้ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้นและมีประสิทธิภาพในการทำงานในระบบมากขึ้น (Qureshi et al., 2005) อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ยังคงต้องทดสอบสภาวะการทำงานของระบบโดยนำสภาวะที่ได้ศึกษาก่อนหน้านี้ (สิริภรณ์และคณะ, 2556) แล้วพบว่าระบบ EthaRex สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 22.4839% โดยปริมาตรคิดเป็นเอทานอลเข้มข้น 177.3980 g/L หรือผลิตได้ถึง 7.1774 g/L/hr. ได้แก่ ปริมาตรก๊าซ CO<sub>2</sub>: CO: H<sub>2</sub> (vol%:vol%:vol%) ใน 2 สภาวะการทดสอบ คือ 15 : 25 : 40 และ 30 : 50 : 20 ตามลำดับ ที่อัตราการไหลของของเหลวไหลเวียนในระบบเท่ากับ 20 มิลลิลิตร/นาที และอัตราการไหลของก๊าซเข้าระบบ 80 มิลลิลิตร/นาที โดยมีจุลินทรีย์ SUTSP5 ปริมาตร 20% เพื่อหาสัดส่วนของก๊าซผสมที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอลที่ดีที่สุด เมื่อทำการเดินระบบการผลิตเอทานอลแบบฟิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film EthaRex or FEthaRex) ต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ที่ก๊าซผสม 15 : 25 : 40 %v ระบบนี้สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 0.3971% v/v และเพิ่มขึ้นเป็น 0.5415 % v/v หรือคิดเป็น 3.1328 และ 4.2727 g/L เมื่อระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 4-3) ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระบบการผลิตที่จุลินทรีย์แขวนลอยอยู่หรือ EthaRex system โดยระบบนั้นไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ ณ สภาวะที่มีก๊าซผสมในปริมาณดังกล่าว (ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID แสดงดังภาคผนวก ข)

ตารางที่ 4-3 ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้จากก๊าซผสม 15:25:40 %v ด้วยระบบ FEthaRex

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเอทานอล				จำนวน เซลล์ (CFU/ml)	ค่า pH
	(%)	M, (mol/L)	(g/L)	(g/L/hr)		
0	ND	ND	ND	ND	4.20 × 10 <sup>7</sup>	7.42
24	0.3971±0.0032	0.1360±0.0011	3.1328±0.0256	0.1305	7.50 × 10 <sup>6</sup>	7.35
48	0.5415±0.0833	0.1855±0.0285	4.2727±0.6570	0.1780	5.50 × 10 <sup>6</sup>	7.09

หมายเหตุ: \* ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการศึกษา (Mean±SD)  
N.D. หมายถึง Not Detected ตรวจไม่พบในการศึกษาครั้งนี้

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซผสมมากขึ้นเป็น 30 : 50 : 20 %v พบว่าระบบ FEthaRex ยังคงสามารถผลิตเอทานอลได้ดีใน 24 ชั่วโมงแรก และผลิตได้ต่อเนื่อง คือพบเอทานอล 0.4820 และ 1.1305% v/v โดยมีอัตราการผลิตอยู่ที่ 0.1585 g/L/hr. และเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นเป็น 0.2132 g/L/hr. (ตารางที่ 4-4) จะเห็นได้ว่าระบบมีความสามารถผลิตเอทานอลได้ต่อเนื่อง (กราฟการวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่อง GC-FID แสดงดังภาคผนวก ค) โดยระบบแบบฟิกซ์-ฟิล์มนี้ส่งเสริมให้เพิ่มความสามารถของระบบในการผลิตได้อย่างต่อเนื่องโดยค่าความเป็นกรดต่างไม่เปลี่ยนแปลงมากนักเมื่อเทียบกับระบบแบบแขวนลอย (ภาพที่ 4-2) ซึ่งจากผลการทดสอบนั้นค่าความเป็นกรดต่างจะลดลงตามความเข้มข้นของก๊าซผสมที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากองค์ประกอบของก๊าซผสมที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เปลี่ยนรูปกลายเป็นกรดคาร์บอนิก (SciMath., 2560) หรืออาจเกิดจากการสะสมของกรดอะซิติกเกิดขึ้นภายในระบบ กรดนี้จะแตกตัวให้โปรตอนซึ่งมีผลต่อการซึมผ่านสารเข้าสู่ภายในเซลล์ส่งผลให้ pH ภายในเซลล์ลดลง (Devi et al., 2010; Galazzo and Bailey, 1990) และอาจทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโต ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีความสำคัญต่อการเกิดเอทานอล (Kundiyan et al., 2010; Mohammadi et al., 2011)

ตารางที่ 4-4 ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้จากก๊าซผสม 30 : 50 : 20 %v ด้วยระบบ FEthaRex

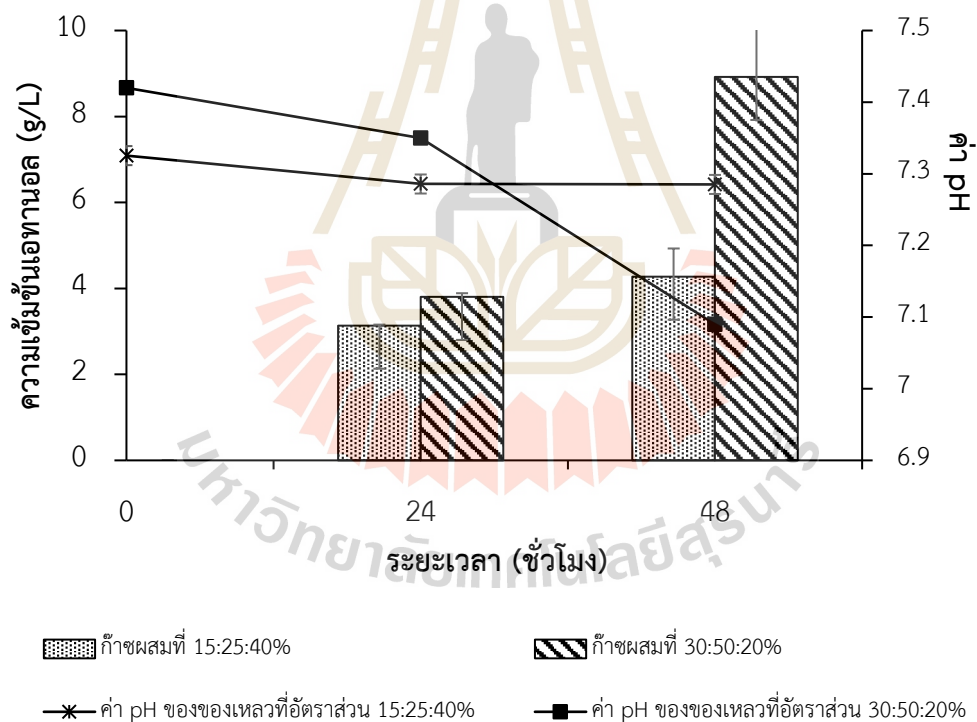
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเอทานอล				จำนวน เซลล์ (CFU/ml)	ค่า pH
	(%)	M, (mol/L)	(g/L)	(g/L/hr)		
0	ND	ND	ND	ND	4.75 × 10 <sup>7</sup>	7.42
24	0.4820±0.0109	0.1651±0.0037	3.8030±0.0858	0.1585	8.45 × 10 <sup>7</sup>	6.43
48	1.1305±0.7463	0.3872±0.2556	8.9193±5.8881	0.3716	1.41 × 10 <sup>8</sup>	6.42

หมายเหตุ: \* ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการศึกษา (Mean±SD)

N.D. หมายถึง Not Detected ตรวจไม่พบในการศึกษาครั้งนี้

อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์จุลินทรีย์เพื่อให้เกิดฟิล์มชีวภาพหรือ biofilm นั้นสามารถเพิ่มมวลของจุลินทรีย์ภายในระบบทำให้เซลล์มีความสามารถในการทำงานดีขึ้น (Qureshi et al., 2005) เช่น การตรึงผิวจุลินทรีย์ *Zymomonas mobilis* ลงบนเวอร์มิคูไลท์ (Vermiculite) ในระบบ ไบโอดีแอคเตอร์ สามารถเพิ่มการผลิตหรือทำให้เกิดเอทานอลมากขึ้นในระบบดังกล่าวเมื่อเทียบ

กับระบบรีแอกเตอร์ธรรมดาที่ปล่อยให้เซลล์จุลินทรีย์ลอยอย่างอิสระ (Bland et al., 1982) นอกจากนี้ จุลินทรีย์ดังกล่าวยังถูกพัฒนาให้ตรึงลงบนผิวของเรซิน (Resin) เพื่อสร้างชั้นของจุลินทรีย์ พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้น (Krug and Daugulis, 1983) หรือแม้กระทั่งการตรึงจุลินทรีย์บนวัสดุชีวภาพที่สกัดจากสาหร่ายทะเลซึ่งปัจจุบันอยู่ในรูปของแอลจีเนต (Alginate) ทำให้เพิ่มการผลิตเอทานอลได้ถึง 10 เท่า (Najafpour et al., 2004) ทั้งนี้วัสดุที่จะนำมาใช้ในการตรึงผิวนั้นต้องเป็นวัสดุที่มีพื้นผิวหยาบและมีความพรุนของพื้นผิว และยังมี การค้นพบว่าวัสดุประเภทพลาสติกก็สามารถในการให้ จุลินทรีย์ยึดเกาะเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ดีกว่าวัสดุที่ทำด้วยแก้วหรือโลหะ (Qureshi et al., 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุที่ทำด้วยโพลีโพรไพลีน (Polypropylene) (Qureshi et al., 2005) ซึ่งจากการ ศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าเมื่อจุลินทรีย์ยึดเกาะบนตัวกลางโพลีโพรไพลีนทำให้ระบบ FEthaRex สามารถ ผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่องเมื่อเทียบกับระบบ EthaRex (สิราภรณ์และคณะ, 2556) ดังนั้นศักยภาพ ในการเกิดเอทานอลของระบบจึงขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และวัสดุที่ใช้ยึดเกาะด้วย



ภาพที่ 4-2 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตจากก๊าซผสมด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

ภายหลังจากการเดินระบบแบบต่อเนื่องด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซผสมมากขึ้นเป็น 30 : 50 : 20 % แล้วพบว่าระบบมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลได้ดี จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณ

เอทานอลที่เกิดขึ้นหลังจากหยุดให้ก๊าซผสม ผลคือระบบ FEthaRex ยังคงสามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นคือ 6.0411%v/v หรือเมื่อคิดเป็นความเข้มข้นเป็นโมลาร์หรือ Molarity (M, mol/L) ของเอทานอลเท่ากับ 1.5021 M ซึ่งมีอัตราการผลิต 1.9860 g/L/hr. ในช่วงเวลาที่ 48 ของการศึกษา (ดังแสดงผลของกราฟการวิเคราะห์หาเอทานอลในภาคผนวก ง) จากนั้นอัตราการผลิตมีแนวโน้มลดลงเป็น 0.3397 g/L/hr. และ 0.430 g/L/hr. ในช่วงเวลาที่ 72 และ 96 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-5) ทั้งนี้อาจเกิดจากความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการหมักของจุลินทรีย์จะถูกยับยั้ง โดยจะเห็นได้ว่าถ้าเอทานอลมีความเข้มข้นสูงขึ้น อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะลดลง ซึ่งจะทำให้อัตราการผลิตลดลงไปด้วย เนื่องจากเอทานอลมีผลทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) และเฮกโซไคเนส (Hexokinase) และมีผลต่อเมมเบรนของเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งอาจมีการทำลายหรือทำให้เมมเบรนเปลี่ยนแปลงไป (พัฒนา, 2552) เมื่อเปอร์เซ็นต์เอทานอลมากกว่า 1% โดยน้ำหนัก จะมีผลทำให้การเจริญเติบโตลดลงและจะหยุดเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8% โดยน้ำหนัก จะเห็นได้ว่าระบบ FEthaRex นี้ยังคงสามารถผลิตเอทานอลได้ตลอดต่อเนื่องถึง 96 ชั่วโมง แม้ว่าไม่มีก๊าซผสมเข้าสู่ระบบก็ตาม ดังนั้นในการศึกษาระบบการผลิตเอทานอลอาจประยุกต์ใช้วิธีการนี้หรือกระบวนการผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะเพื่อเพิ่มความต้านทานความเป็นพิษของเอทานอลซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราในการผลิตเอทานอลได้

ตารางที่ 4-5 ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้หลังจากการหยุดเดินระบบ FEthaRex

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเอทานอล				จำนวน เซลล์ (CFU/ml)	ค่า pH
	(%)	(mol/L)	(g/L)	(g/L/hr)		
24	0.4386±0.0601	0.1502±0.0206	3.4606±0.4743	0.1442	5.25 × 10 <sup>7</sup>	6.85
48	6.0411±0.0359	1.5021±0.0123	47.6641±0.2830	1.9860	1.08 × 10 <sup>8</sup>	7.03
72	3.0996±0.5103	1.3785±0.1748	24.4557±4.0259	0.3397	1.70 × 10 <sup>7</sup>	7.09
96	1.3081±0.3580	0.4480±0.1226	10.3206±2.8245	0.430	1.45 × 10 <sup>7</sup>	7.27

หมายเหตุ: \* ผลการวิเคราะห์ที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการศึกษา (Mean±SD)

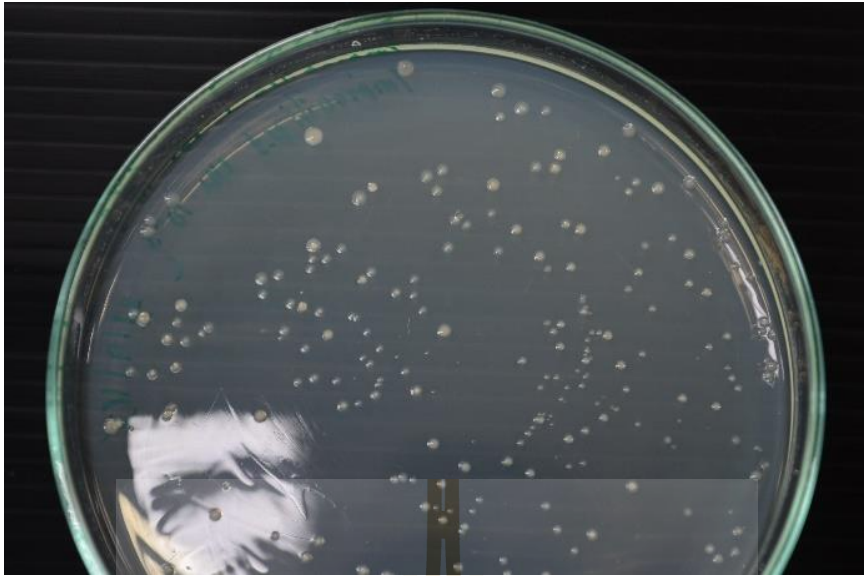
ขณะเดียวกันการศึกษาน้ำหนักและจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะบนตัวกลางพลาสติก หลังจากการเดินระบบดังกล่าวพบว่าน้ำหนักของตัวกลางมีค่าเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 0.0058 กรัม (ตารางที่ 4-6) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักของตัวกลางก่อนการเดินระบบ โดยมีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะอยู่บนตัวกลางเฉลี่ย  $2.23 \times 10^8$  CFU/ml ขณะที่จุลินทรีย์แขวนลอยในระบบประมาณ  $1.45 \times 10^7$  CFU/ml ซึ่งลักษณะของจุลินทรีย์ SUTSP5 ที่ยึดเกาะอยู่บนตัวกลางมีลักษณะของโคโลนีกลมมน ผิวหน้าเรียบมีสีน้ำตาลขุ่นบริเวณกลางของโคโลนี โดยขนาดของโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน มีขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4-3) โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ภายในระบบนี้อาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นจุลินทรีย์ประเภทที่ตรึงผิว (Fixed-film) เกาะบนผิวพื้นวัสดุ และกลุ่มที่สองเป็นจุลินทรีย์ประเภทที่แขวนลอยในระบบ (Suspended cells) (สันทัด, 2552) การมีจุลินทรีย์แขวนลอยเกิดขึ้นในระบบนั้นอาจเกิดจากการหลุดของเซลล์จุลินทรีย์ในสภาวะที่มีก๊าซเกิดขึ้นภายในชั้นของฟิล์มหรือเกิดขึ้นจากสภาวะการขาดแคลนสารอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการส่งเสริมให้การผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่องนั่นเอง จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระบบ FEthaRex นี้ส่งเสริมให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและใช้ก๊าซผสมในรูปของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจนเป็นแหล่งสารอาหารในการผลิตเอทานอลได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

ตารางที่ 4-6 น้ำหนักของตัวกลางพลาสติก Polypropylene pall (PP) ring ที่เพิ่มขึ้นหลังจากการเดินระบบ

ลำดับที่	น้ำหนักตัวกลาง PP ring ก่อนเริ่มเดินระบบ* (กรัม)	น้ำหนักตัวกลาง PP ring หลังเดินระบบ* (กรัม)	น้ำหนักตัวกลาง PP ring ที่เพิ่มขึ้น (กรัม)
1	2.0676±0.0001	2.0727±0.0001	0.0051
2	2.0251±0.0001	2.0323±0.0002	0.0073
3	2.0375±0.0001	2.0412±0.0002	0.0037
4	2.0526±0.0001	2.0557±0.0003	0.0032
5	2.0564±0.0003	2.0683±0.0000	0.0119
6	2.0574±0.0001	2.0611±0.0000	0.0037
7	2.0220±0.0002	2.0308±0.0002	0.0088
8	2.0590±0.0002	2.0652±0.0001	0.0062
9	2.0511±0.0001	2.0552±0.0001	0.0040
10	2.0500±0.0001	2.0536±0.0001	0.0036

หมายเหตุ: \* ค่าที่แสดงเป็นผลเฉลี่ย (Average) ที่ได้จากการทดลอง (Mean±SD)





ภาพที่ 4-3 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ *Petrobacter* sp. SUTSP5



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการต่อยอดจากการพัฒนาความสามารถของจุลินทรีย์ *Petrobacter* sp. SUTSP5 ในการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film EthaRex or FEthaRex) ซึ่งเป็นการพัฒนาต่อยอดจากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ ผลการศึกษาสรุปได้ดังนี้

#### 5.1 การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบ continuous fixed-film bioreactor

ระบบการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์มนั้นพัฒนาจากการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยจุลินทรีย์แขวนลอยในระบบ (Suspended cells) โดยนำสภาวะที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ และเพิ่มการไหลเวียนของสารอาหารภายในระบบที่อัตราการไหลเท่ากับ 20 มิลลิลิตร/นาที พบว่าการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์ม (Fixed-film EthaRex or FEthaRex) ที่อัตราส่วนก๊าซผสมคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และไฮโดรเจน 15 : 25 : 40 %v ระบบนี้สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 0.1305 g/L/hr และเพิ่มขึ้นเป็น 0.1780 g/L/hr เมื่อระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระบบการผลิตที่จุลินทรีย์แขวนลอยอยู่หรือ EthaRex system ที่ได้ทำการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยระบบนั้นไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ ณ สภาวะที่มีก๊าซผสมในปริมาตรดังกล่าว ขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซผสมมากขึ้นเป็น 30 : 50 : 20 %v พบว่าระบบ FEthaRex ยังคงสามารถผลิตได้ต่อเนื่อง โดยมีอัตราการผลิตอยู่ที่ 0.1585 g/L/hr. และเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นเป็น 0.2132 g/L/hr. ที่ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 0.4820 และ 1.1305% v/v ภายหลังจากการเดินระบบแบบต่อเนื่องด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซผสมมากขึ้นเป็น 30 : 50 : 20 %v แล้วพบว่าระบบมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลได้ดี จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นหลังจากหยุดให้ก๊าซผสม ผลคือระบบ FEthaRex ยังคงสามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นคือ 6.0411%v ซึ่งมีอัตราการผลิตสูงสุด 1.9860 g/L/hr. ในช่วงเวลาที่ 48 ของการศึกษา โดยจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย  $10^7$  CFU/ml จากผลการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์มนั้นช่วยส่งเสริมให้ความสามารถในการผลิตของระบบยังคงมีการผลิตได้อย่างต่อเนื่อง รวมถึงการประยุกต์กระบวนการผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะเพื่อเพิ่มความต้านทานความเป็นพิษของเอทานอลซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราในการผลิตเอทานอลได้

## 5.2 พารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมด้วยระบบ continuous fixed-film bioreactor

การผลิตเอทานอลจากก๊าซผสม  $\text{CO}_2:\text{CO}:\text{H}_2$  ด้วยระบบ FEthaRex นั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาถึงพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในส่วนของ การเดินระบบ ได้แก่ อัตราส่วนของก๊าซผสม และอัตราการไหลของของเหลวไหลเวียนในระบบนั้น จากการเดินระบบต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการศึกษา พบว่าที่อัตราส่วนของก๊าซผสม 30 : 50 : 20 %v โดยมีอัตราการไหลของก๊าซเท่ากับ 100 ml/min และอัตราการไหลเวียนของสารอาหารภายในระบบเท่ากับ 20 ml/min นั้น เป็นสภาวะที่เหมาะสมส่งเสริมให้ระบบ FEthaRex สามารถผลิตเอทานอลได้ดี โดยสามารถผลิตเอทานอลเข้มข้น 1.1305%v และมีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.3716 g/L/hr โดยจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย  $10^7$  CFU/ml อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาต่อเนื่องหลังจากการหยุดเดินระบบ FEthaRex พบว่าระบบยังคงมีอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 1.9860 g/L/hr. ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการประยุกต์โดยการนำจุลินทรีย์ฟิล์มตรึงหรือระบบฟิซซ์-ฟิล์ม (FEthaRex) มาใช้ในการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ร่วมกับก๊าซไฮโดรเจน ส่งเสริมให้การผลิต เอทานอลมีประสิทธิภาพดีขึ้น ซึ่งผลจากการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทดแทนได้ต่อไป

## 5.3 ข้อเสนอแนะจากการศึกษาวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมด้วยระบบ FEthaRex เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพของจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้มีข้อเสนอแนะที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยดังนี้

### 1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.1. จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าการให้สารอาหารอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้ระบบสามารถผลิต เอทานอลได้สม่ำเสมอ เนื่องจากการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสารตั้งต้นจะส่งผลต่อค่าความเป็นกรดต่างที่เปลี่ยนแปลงในระบบ และมีผลต่อการผลิต จึงอาจนำหลักการนี้ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลต่อไป

1.2. ควรส่งเสริมให้มีการนำแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และอุตสาหกรรมอื่น ๆ มาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล เพื่อลดการปลดปล่อยมลพิษและเป็นการสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่ากลับคืนสู่ภาคอุตสาหกรรมอีกทางหนึ่ง

## 2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยต่อไป

ในกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง ควรมีการควบคุมอัตราการไหลของสารอาหารไหลเวียนในระบบในอัตราที่เท่ากัน และควบคุมอัตราการไหลออกของสารอาหารไม่ควรสูงไปกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการสูญเสียจุลินทรีย์ออกจากระบบ ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์ในระบบการหมัก

2.1 ควรมีการพัฒนาด้านระบบการผลิต เช่น ระบบที่มีจุลินทรีย์แบบ Fixed-bed หรือ Packed-bed ระบบแบบ Membrane-based หรือใช้ไฟเบอร์เมมเบรน เพื่อให้จุลินทรีย์รวมกลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

2.2 ควรศึกษาชนิดของวัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์รูปแบบอื่น ๆ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการยึดเกาะของเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งจะช่วยให้มีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ภายในระบบเพิ่มขึ้นและส่งผลให้สามารถผลิตเอทานอลได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น



## บรรณานุกรม

- ณัฐพล รัตนมุขย์ (2549). การกำจัดแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยเครื่องกรองชีวภาพ. คณะ  
วิศวกรรมศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร
- สันทัต ศิริอนันต์ไพบุลย์ (2552). ระบบบำบัดน้ำเสีย การเลือกใช้ การออกแบบ การควบคุม และการ  
แก้ปัญหา. สำนักพิมพ์ท็อป. กรุงเทพมหานคร.
- สิราภรณ์ โพธิวิชยานนท์. (2553). การผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซ  
คาร์บอนมอนอกไซด์โดยเชื้อจุลินทรีย์. รายงานการวิจัย รหัสโครงการ SUT6-617-53-12-02.  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สิราภรณ์ โพธิวิชยานนท์. (2556). การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมโดยจุลินทรีย์  
SUTSP1(Development of Ethanol production system from mixed gas by SUTSP1).  
ร่างรายงานการวิจัย รหัสโครงการ SUT10-1002-56-12-09. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- Abrini J, Naveau H, Nyns EJ. 1994. Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic  
bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Archives of  
Microbiology 161(4): 345-351.
- Ahmed A. 2006. Effects of biomass-generated syngas on cell-growth, product distribution  
and enzyme activities of Clostridium carboxidivorans P7. PhD dissertation.  
Oklahoma State University.
- Abrini J., Naveau H., Nyns EJ (1993) Clostridium autoethanogenum sp. Nov., an  
anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch  
Microbiol 161: 345-351.
- Abubackar H.N., Veiga M.C., Kennes C. (2015) Carbon monoxide fermentation to  
ethanol by Clostridium autoethanogenum in a bioreactor with no  
accumulation of acetic acid. Bioresource Technol 186: 122-127.
- Allen T.D., Caldwell M.E., Lawson P.A., Huhnke R.L., and Tanner R.S. (2010)  
Alkalibaculum bacchi gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing  
acetogen isolated from livestock-impacted soil. Int J Syst Evol Microbiol 60:  
2483-9.
- Alterthum F., Ingram LO. (1989) Efficient ethanol production from glucose, lactose, and  
xylose by recombinant Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 55: 1943-1948.

- Antoni D., Zverlov W., Schwarz WH. (2007) Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 23-35.
- Baker A., Zahniser S. (2006) Ethanol reshapes the corn market. *Amber Waves: U.S. Department of Agriculture Economic Research Service*. April: 1-6.
- Barik S., Prieto S., Harrison SB., Clausen EC. (1988) Biological production of alcohols from coal through indirect liquification. *Appl Biochem Biotech* 28: 363-378.
- Bickerstaff G.F. (1997) Immobilization of enzymes and cells. New Jersey: Human Press.
- Bland R.R., Chen H.C., Jewel W.T., Belamy W.D., and Zahi R.K. (1982) Continuous high rate productivity of ethanol by *Zomonas mobilis* in an attached film expanded bed fermenter. *Bio Technol Lett.* 4: 323-328.
- Bredwell M.D., Srivastava P., and Worden R.M. (1999) Reactor design issues for synthesis gas fermentations. *Biotechnol Progr* 15: 834-44.
- Choorit W. and Wisarnwan P. (2007) Effect of temperature on the anaerobic digestion of palm oil mill effluent. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 376-385.
- Cotter J.L. (2006) Ethanol and acetate production from synthesis gas using microbial catalysts. Thesis. Faculty of Graduate, North Carolina State University, North Carolina, USA, 191 pp.
- Cotter J.L., Chinn M.S., and Grunden A.M. (2009) Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. *Enzyme Microb Technol* 44: 281-8.
- Cotter J.L., Chinn M.S., and Grunden A.M. (2009) Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess Biosyst Eng* 2009;32:369-80.
- Datta R. and Zeikus JG. (1985) Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids. *Appl and Environ Microbiol* 49: 522-529.
- Datar RP., Shenkman RM., Cateni BG., Huhnke RL., Lewis RS. (2004) Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnol Bioeng* 86: 587-594.
- Demain AL., Newcomb M., Wu JHD (2005) Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:124-154.

- Demirbas A. (2002) Hydrogen production from biomass by the gasification process. *Energy Sources* 24: 59-68.
- Department of Science Service (2010) Biomass energy. Science and Technology Information Center. Department of Science Service. Ministry of Science and Technology. Online: <http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR5.pdf>
- Devi M.P., Mohan S.V., Mohanakrishna G., and Sarma P. (2010) Regulatory influence of CO<sub>2</sub> supplementation on fermentative hydrogen production process. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35:10701-9.
- Diekert G., Wohlfarth G. (1994) Metabolism of homoacetogens. *Ant van Leeu* 66: 209-221.
- Dien BS., Cotta MA., Jeffries TW. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 258-266.
- Drake H.L., Gossner A.S., Daniel S.L. (2008) Old acetogens, new light. *Ann. NY Acad. Sci.* 1125: 100-128.
- Esquivel-Elizondo S., Delgado A.G., Rittmann B.E., Krajmalnik-Brown R. (2017) The effect of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> on CO metabolism by pure and mixed microbial cultures. *Biotechnol Biofuels* 10: 220.
- Escher, A. and Characklis, W.G. 1990. *Biofilms*. Wiley, New York. p. 445.
- Freeman A., and Lilly M.D. (1998) Effect of processing parameter on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme Microb Tech.* 23: 335- 345.
- Gaddy J.L. (2000) Biological production of ethanol from waste gases with *Clostridium ljungdahlii*. US Patent No. 6,136,577.
- Georgieva TI., Ahring BK. (2007) Evaluation of continuous ethanol fermentation of dilute-acid corn stover hydrolysate using thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 61-68.
- Ghorbani F., Younesi H., Sari A.E., and Najafpour G. (2011) Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renew Energ.* 36: 503-509.

- Gottenbos, B., Van Der Mei, H.C., and Busscher, H.J. 1999. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in enzymology*. Academic Press. California. USA. vol. 310. pp. 523-534.
- Heiskanen H., Virkajärvi I., Viikari L.. (2007) The effect of syngas composition on the growth and product formation of *Butyribacterium methylotrophicum*. *Enzyme Microb Technol* 41: 362–7.
- Hossain ABMS., Salleh A., Boyce AN., Chowdhury P., Naquiuddin M. (2008) Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *Am J Biochem Biotechnol* 4: 250-254.
- Inokuma K., Nakashimada Y., Akahoshi T., Nishio N. (2007) Characterization of enzymes involves in the ethanol production of *Moorella* sp. HUC22-1. *Arch Microbiol* 188: 37-45.
- Kundiyan D.K., Huhnke R.L., Maddipati P., Atiyeh H.K., Wilkins M.R. (2010) Feasibility of incorporating cotton seed extract in *Clostridium* strain P11 fermentation medium during synthesis gas fermentation. *Bioresour Technol*. 101: 9673–80.
- Klasson KT., Ackerson MD., Clausen EC., Gaddy JL. (1992) Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. *Enz Microbiol Technol* 14: 602-608.
- Kopke M., Mihalcea C., Bromley J.C., Simpson S.D. (2011) Fermentative production of ethanol from carbon monoxide. *Curr Opin Biotech* 22: 320-325.
- Kourkoutas K., Bekatorou A., Banat I.M., Marchant R., and Koutinas A.A. (2004) Immobilization technologies and support material suitable in alcohol beverage production : review, *Food Microbiol*. 21: 377-397.
- Laohalidanond K. (2007) The production of synthetic diesel from biomass. *CMU. J Nat Sci* 6:127-139.
- Lilly M., Lambrechts M.G., and Pretorius I.S. (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillate. *Appl Environ Microb*. 66(2): 744-753.
- Liou J.S.C., Balkwill D.L, Drake G.R, and Tanner R.S. (2005) *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2085–91.



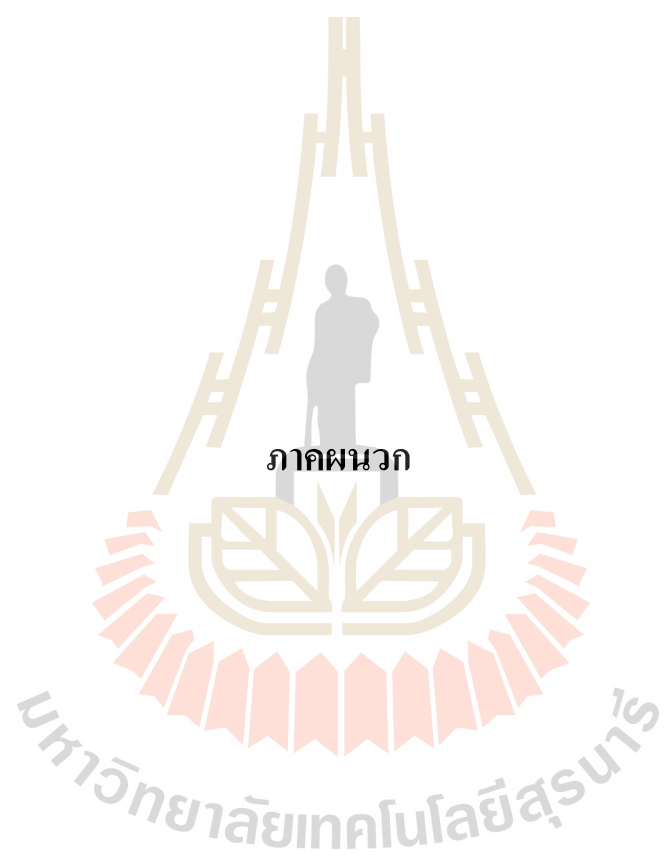
- Liu K., Atiyeh H.K., Tanner R.S., Wilkins M.R., Huhnke R.L. (2012) Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderate alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi*. *Bioresource Technol* 104: 336-341.
- Liu K., Atiyeh H.K., Stevenson B.S., Tanner R.S., Wilkins M.R., and Huhnke R.L. (2014) Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. *Bioresource Technol.* 151: 69-77.
- Ljungdahl LG. (1986) The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Ann Rev Microbiol* 40: 415-450.
- Lynd LR., Weimer P.J., van Zyl WH., Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66: 506-577.
- Mamlouk D and Gullo M. (2013) Acetic acid bacteria : physiology and carbon source oxidation. *Indian J Microbiol* 53(4): 377-384.
- Maddipati P., Atiyeh H.K., Bellmer D.D., Huhnke R.L. (2011) Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource Technol* 102: 6494-6501.
- Mckendryn P. (2002) Energy production from biomass (part 3): gasification technologies. *Biores Technol* 83: 55-63.
- Miller TL. and Wolin MJ. (1974) A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27: 985-987.
- Mohammadi M., Najafpour G.D., Younesi H., Lahijani P., Uzir M.H., and Mohamed A.R. (2011) Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. *Renew Sust Energ Rev* 15: 4255-4273.
- Molitor B., Richter H., Martin M.E., Jensen R.O., Juminaga A., Mihalcea C., and Angenent. (2016) Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases-Turning steel mills into biorefineries. *Bioresource Technol.* 215: 386-396.
- Najafpour G., Younesi H., and Syahidah Ku Ismail K. (2004) Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol.* 92(3): 251-60.
- Natarajan E., Nordin A., Rao AN. (1998) Overview of combustion and gasification of rice husk in fluidized bed reactors. *Biom Bioener* 14: 533-546.

- Nikolic S., Mojovic L., Rakin M., Pejin D. (2009) Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel*. 88: 1602-16-7.
- Nikolic S., Mojovic L., Rakin M., Pejin D., Rakin M., and Vukasinovic. (2010) Production of bioethanol from corn meal hydrolysate by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biomass Bioenerg.* 34: 1449-1456.
- Nuanpeng S., Thanonkeo S., Klanrit P., and Thanonkeo P. (2018) Ethanol production from sweet sorghum by *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 immobilized on alginate-loofah matrices. *Braz J Microbiol.* 372: 11 pp.
- OSHA (2002) OSHA factsheet: Carbon monoxide poisoning. Online:  
<http://www.osha.gov/>
- Phillips JR., Clausen EC., Gaddy JL. (1994) Synthesis gas as substrate for the biological production of fuels and chemicals. *Appl Biochem Biotechnol* 45/46: 145-154.
- Qureshi N., Annous B.A., Ezeji T.C., Karcher P., and Maddox I.S. (2005) Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rate. *Microb Cell Fact.* 4: 24.
- Rajagopalan S., Datar RP., Lewis RS. (2002) Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. *Biom Bioener* 23: 487-493.
- Reed TB. and Jantzen D. (1979) Biomass gasification: principles and technology. *Ener Technol Rev* 67: 27-90.
- Reed G., Nagodawithana TW. (1991) Yeast technology. 2<sup>nd</sup> ed. New York: AVI.
- RFA (2007) Renewable fuels association: statistics. Washington DC. Online 15.05.2007:  
<http://www.ethnolrfa.org/industry/statistics/>
- Roble ND., Ogbonna JC., Tanaka H. (2003) A novel circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrical*) sponge for the bioconversion of raw cassava starch to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 671-678.
- Sakai S., Nakashimada Y., Yoshimoto H., Watanabe S., Okada H., Nishio N. (2004) Ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by a newly isolated thermophilic bacterium. *Biotechnol Lett* 26: 1607-1612.

- Sakai S., Nakashimada Y., Inokuma K., Kita M., Okada H., Nishio N. (2005) Acetate and ethanol production from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> by *Moorella* sp. using a repeated batch culture. *J Biosci Bioeng* 99: 252-258.
- Shakhashiri BZ. (2008) Chemical of the week: Carbon dioxide, CO<sub>2</sub>. Online 6.02.2008: <http://www.scifun.org/>
- Shen H.Y., Moonjai N., Verstrepen K.J., and Delvaux F.R. (2003) Impact of attachment immobilization on yeast physiology and fermentation performance. *Journal of American Society of Brewing Chemists*. 61: 79-87.
- Sim J.H., Kamaruddin A.H., and Long W.S. (2008) Biocatalytic conversion of CO to acetic acid by *Clostridium aceticum* -medium optimization using response surface methodology (RSM). *Biochem Eng* 240: 337-47.
- Stiles AB., Chen F., Harrison JB., Hu X., Storm DA., Yang HX. (1991) Catalytic conversion of synthesis gas to methanol and other oxygenated products. *Ind Eng Chem Res* 30: 811-821.
- Sun X., Atiyeh H.K., Kumar A., Zhang H. (2018) Enhanced ethanol production by *Clostridium ragsdalei* from syngas by incorporating biochar in the fermentation medium. *Bioresour Technol* 247: 291-301.
- Thammanoon S. (2006) พลังงานไฮโดรเจน: พลังงานไฮโดรเจนจากน้ำด้วยแสงอาทิตย์และตัวเร่งปฏิกิริยา. Online: 15.10.2006: <http://www.vcharkarn.com/varticle/420>.
- Vega JL., Clausen EC., Gaddy JL. (1990) Design of bioreactors for coal synthesis gas fermentation. *Resources, Conservation and Recycling* 3: 149-160.
- Vieira, M.J., Melo, L.F., and Pinheiro, M.M. 1993. Biofouling. pp. 7:67.
- VMaster (2006) เชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel): พลังงานจากธรรมชาติ เพื่อธรรมชาติ. Online: 15.08.2006: <http://www.vcharkarn.com/varticle/374/1>.
- Weuster-Botz D (1993) Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* in a fluidized bed reactor. I: Kinetic studies of immobilization in macroporous glass beads. *Appl Microbiol Biotechnol* 39: 679-684.
- Wilkins M.R., and Atiyeh H.K. (2011) Microbial production of ethanol from carbon monoxide. *Curr Opin Biotech* 22: 326-330.

Zeikus JG. (1980) Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 34: 423-464.





ภาคผนวก

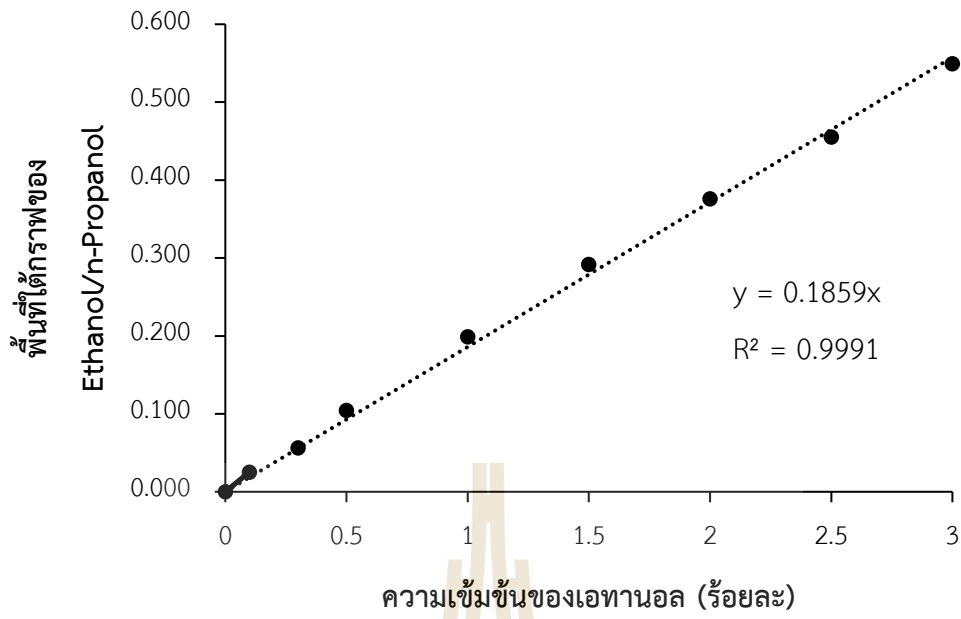
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## ภาคผนวก ก

### การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเอทานอล

การวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography ด้วยดีเทคเตอร์ FID นั้น มีสภาวะของเครื่องดังนี้คือ การวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้คอลัมน์ HP-INNOWax โดยมีอุณหภูมิของ Oven เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และใช้ n-propanol เป็น internal standard สำหรับเทคนิคการฉีดใช้เทคนิค Headspace technique ดังมีผลของสารมาตรฐานเอทานอลดังตารางและกราฟต่อไปนี้

Standard ethanol (%)	พื้นที่ใต้กราฟของ Ethanol/n-propanol
0.0	0.0000
0.1	0.0254
0.3	0.0566
0.5	0.1044
1.0	0.1990
1.5	0.2920
2.0	0.3759
2.5	0.4553
3.0	0.5493

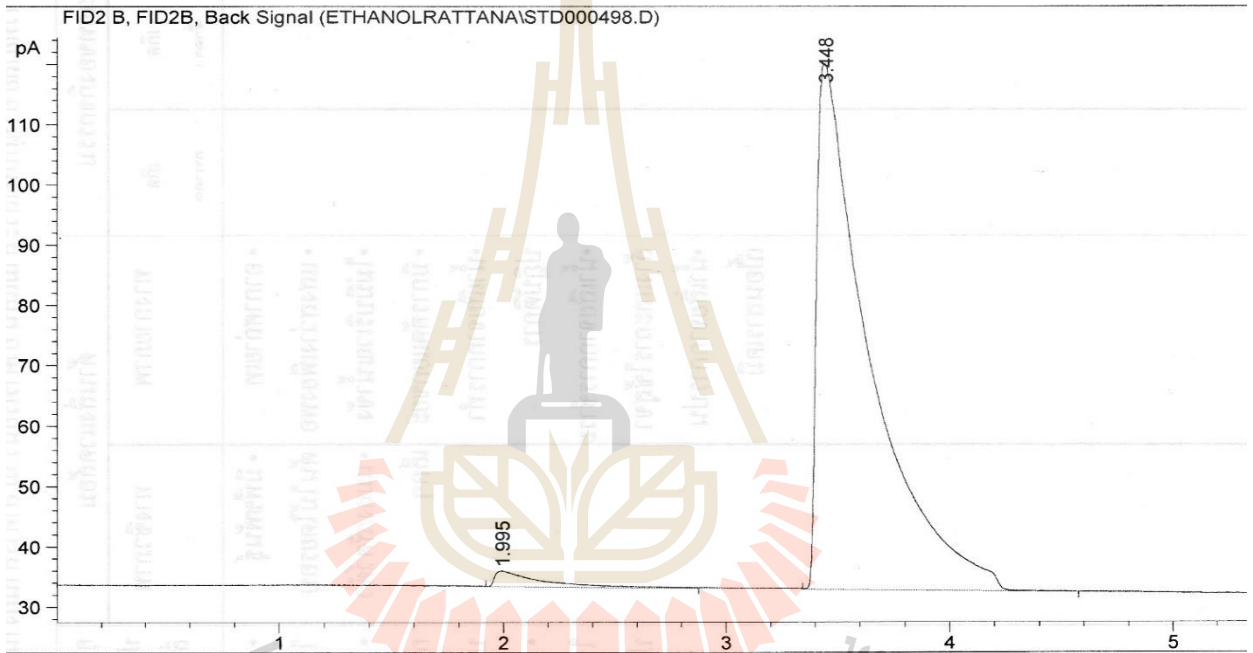


กราฟมาตรฐานเอทานอล

e C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000498.D  
 ame: Std.

```

=====
Operator   : RATTANA 23.08.18
Instrument : Instrument 1                      Location  : -
ction Date : 1/1/2002 6:22:34 AM             Inj Volume : Manually
Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETHO_FID1.M
changed    : 1/1/2002 6:20:51 AM by RATTANA 23.08.18
            (modified after loading)
ysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETHO_FID1.M
changed    : 1/1/2002 6:28:34 AM by RATTANA 23.08.18
            (modified after loading)
od Info    : Test IQ Aug 31, 2009
le Info    : Std 0.1% EtOH + 3% n-propanol Check Liner/Column
  
```



Area Percent Report

```

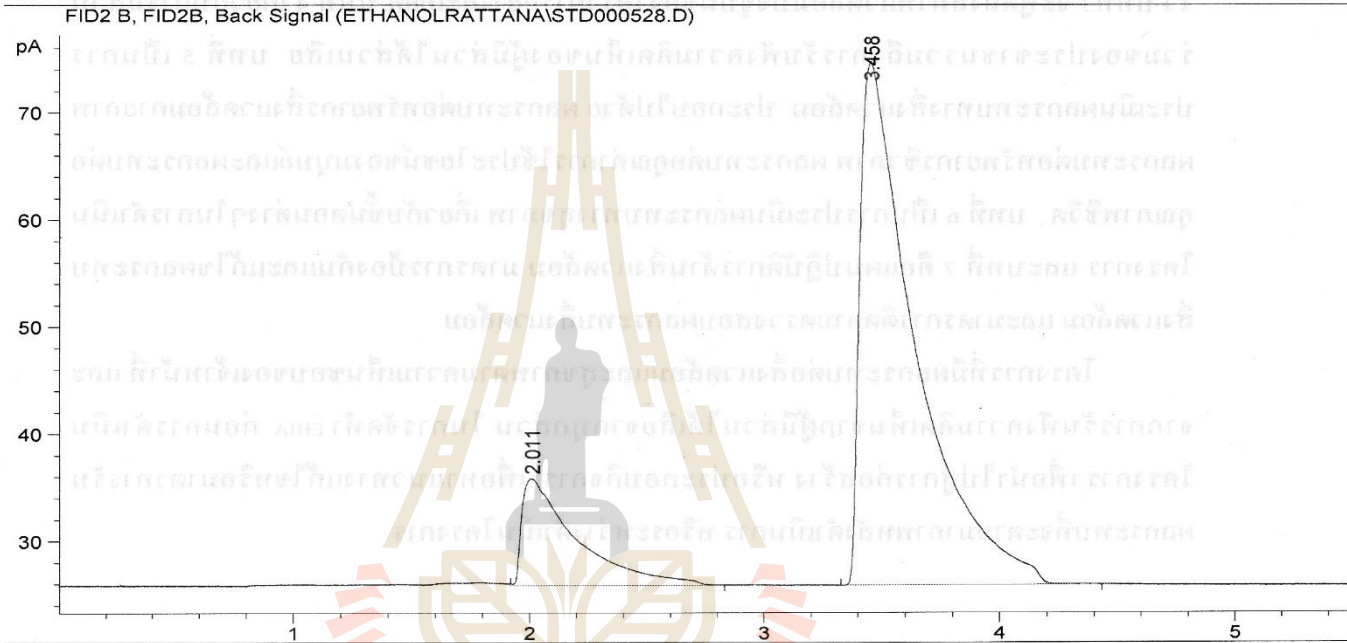
=====
ed By      :          Retention Time
plier:     :          : 1.0000
tion:      :          : 1.0000
Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

al 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1.995	1	VV	38.60515	2.56971	2.64362
3.448	1	VV	1421.70715	87.09814	97.35638
ls :			1460.31231	89.66785	



Operator : RATTANA 24.08.18  
 Instrument : Instrument 1 Location : -  
 ction Date : 1/1/2002 10:39:12 AM Inj Volume : Manually  
 Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETHOH\_FID1.M  
 changed : 1/1/2002 10:37:03 AM by RATTANA 24.08.18  
 (modified after loading)  
 ysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETHOH\_FID1.M  
 changed : 1/1/2002 10:45:12 AM by RATTANA 24.08.18  
 (modified after loading)  
 od Info : Test IQ Aug 31, 2009  
 le Info : Std 1.0% EtOH + 3% n-propanol 24.8.18



=====  
 Area Percent Report  
 =====

ed By : Retention Time  
 iplier: : 1.0000  
 tion: : 1.0000  
 Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

al 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

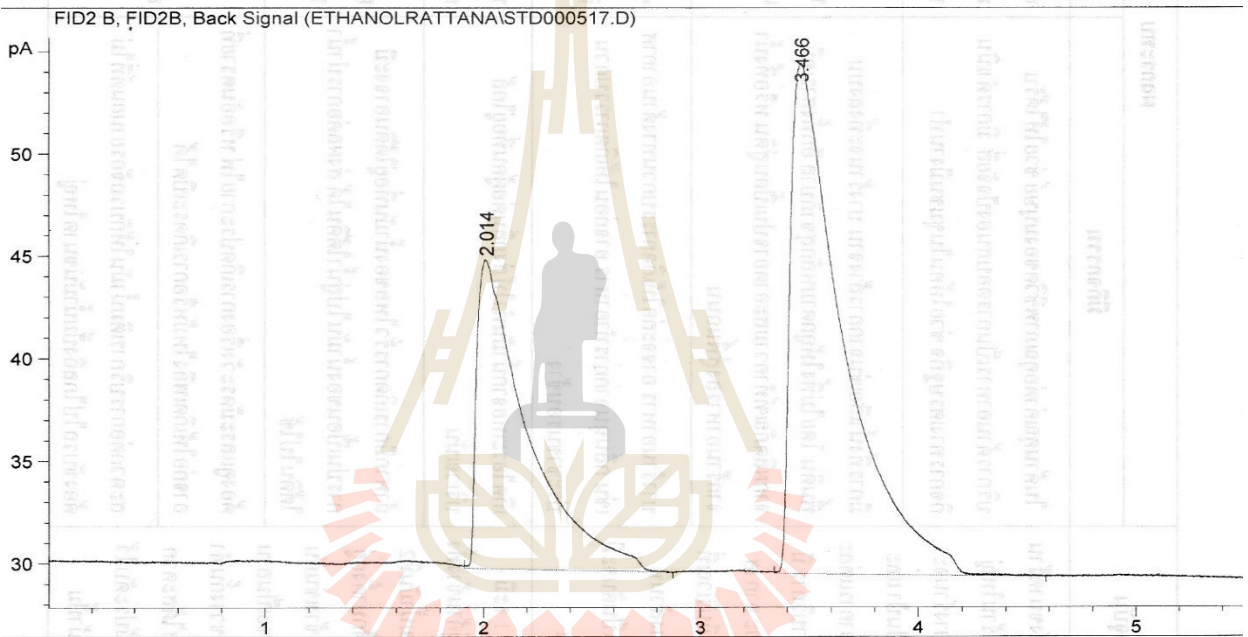
RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
2.011	1	VV	161.65889	9.97569	16.87895
3.458	1	VB	796.09558	48.71226	83.12105

ls : 957.75447 58.68795

nt 1 1/1/2002 10:45:13 AM RATTANA 24.08.18

```

=====
Operator   : RATTANA 24.08.18
Instrument : Instrument 1                      Location  : -
Acq Date  : 1/1/2002 9:10:19 AM            Inj Volume: Manually
Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETH_FID1.M
changed   : 1/1/2002 9:08:51 AM by RATTANA 24.08.18
          : (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETH_FID1.M
changed   : 1/1/2002 9:16:19 AM by RATTANA 24.08.18
          : (modified after loading)
Sample Info : Test IQ Aug 31, 2009
Sample Info : Std 3.0% EtOH + 3% n-propanol 24.8.18
=====
    
```



Area Percent Report

```

=====
Integrated By      : Retention Time
Multiplier:       : 1.0000
Integration:       : 1.0000
Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Sample 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
2.014	1	VV	245.64206	15.05397	36.92654
3.466	1	VV	419.57605	24.92370	63.07346

Sum: 665.21811 39.97767



ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์หาเอทานอล

ส่วนของระบบการผลิตเอทานอล (EthaRex reactor)

ด้วยก๊าซผสมอัตราส่วนร้อยละ 15:25:40 โดยปริมาตร

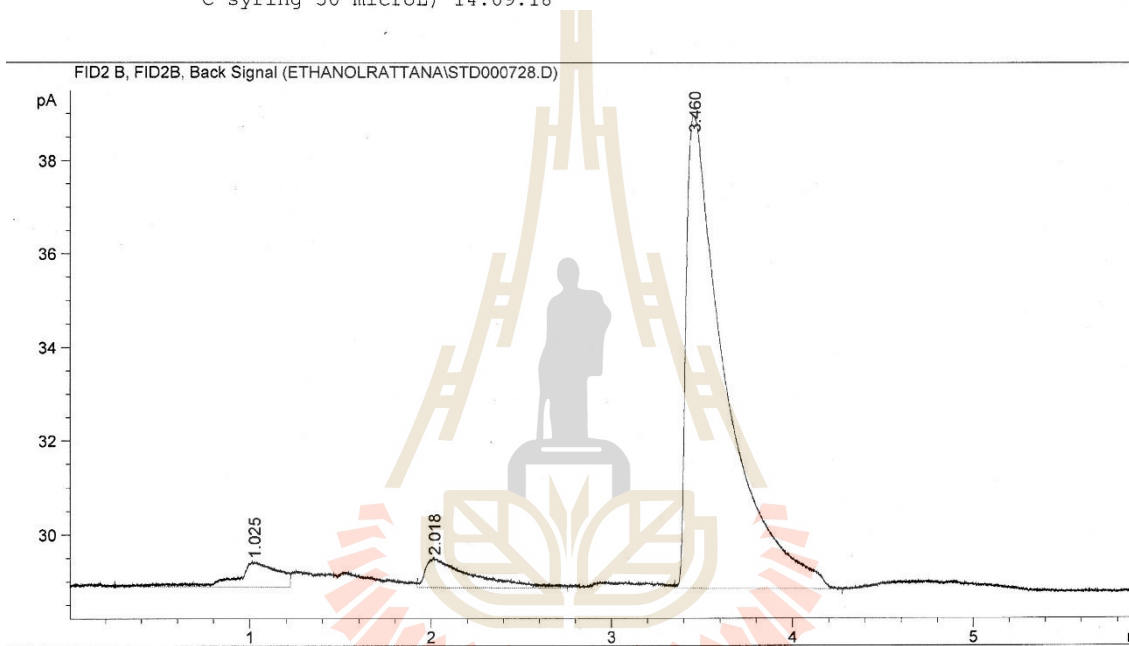
```

=====
q. Operator   : RATTANA 14.09.18
q. Instrument : Instrument 1                Location : -
Injection Date : 1/1/2002 6:09:44 AM      Inj Volume : Manually

q. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
st changed    : 1/1/2002 6:07:53 AM by RATTANA 14.09.18
               (modified after loading)
analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
st changed    : 1/1/2002 6:15:44 AM by RATTANA 14.09.18
               (modified after loading)
Method Info   : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info    : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB 24 hr. disti
                 llate 100 microL + 0.3% n-propanol 100 microL (Temp.38
                 C syring 50 microL) 14.09.18

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Reported By      :      Retention Time
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

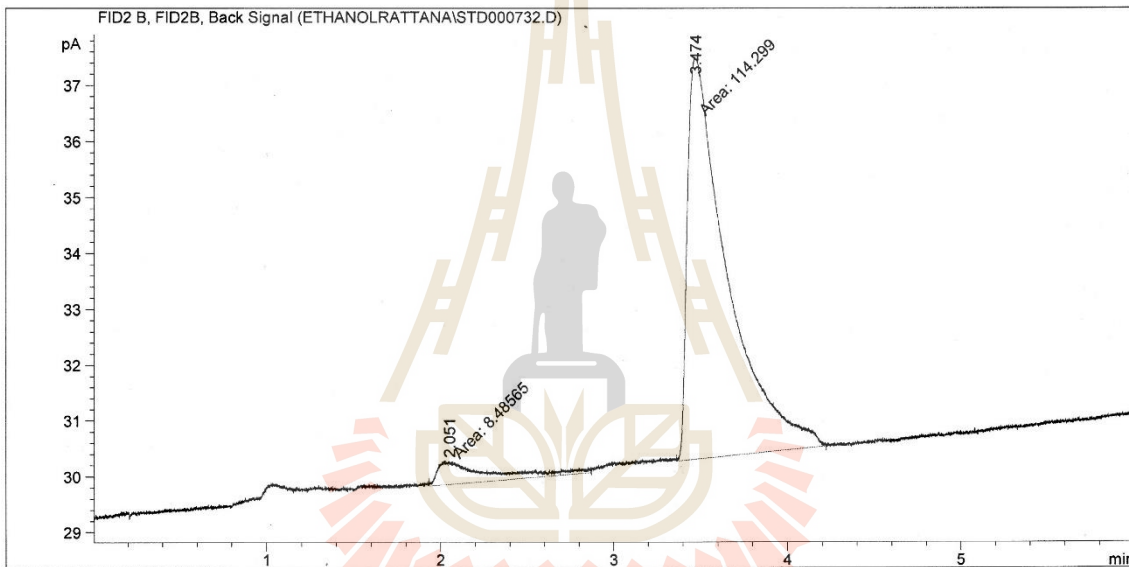
Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.025	1	VV	8.82272	5.06901e-1	5.12767
2	2.018	1	VB	11.16067	6.02542e-1	6.48646

File C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000732.D  
 File Name: Std.

```

=====
Acq. Operator   : RATTANA 14.09.18
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : -
Injection Date  : 1/1/2002 6:47:31 AM   Inj Volume : Manually
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed    : 1/1/2002 6:44:45 AM by RATTANA 14.09.18
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000732.D\DA.M (TOXICOETOH_FID1.M)
Last changed    : 1/1/2002 10:44:33 AM by RATTANA 15.09.18
Method Info     : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info     : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB 24 hr. disti
                  llate 100 microL + 0.3% n-propanol 100 microL (Temp.38
                  C syring 50 microL) 14.09.18
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Retention Time
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

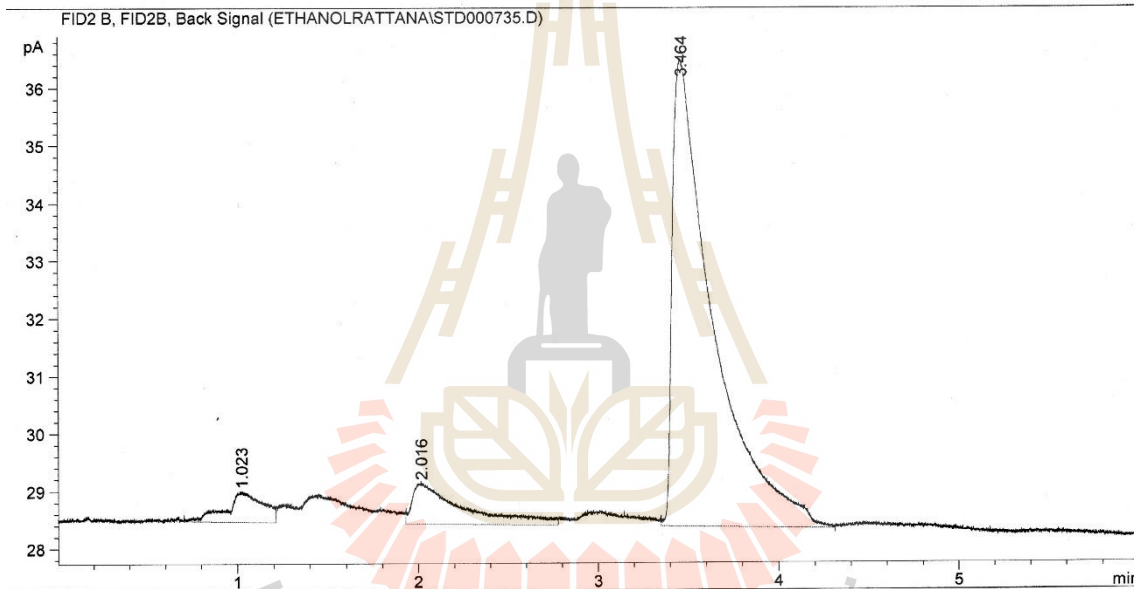
Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.051	1	MM T	8.48565	4.14863e-1	6.91100
2	3.474	1	MM T	114.29905	7.18989	93.08900

File C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000735.D  
Name: Std.

```

=====
. Operator   : RATTANA 15.09.18
. Instrument : Instrument 1          Location : -
. Action Date: 1/1/2002 3:58:26 AM      Inj Volume : Manually
. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
. Changed    : 1/1/2002 3:56:30 AM by RATTANA 15.09.18
              (modified after loading)
. Analysis Method: C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000735.D\DA.M (TOXICOETOH_FID1.M)
. Changed    : 1/1/2002 10:40:24 AM by RATTANA 15.09.18
. Method Info: Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp I. 48 hr
              . distillate 100 microL + 0.3% n-propanol 100 microL (T
              emp.38 C syring 50 microL) 15.09.18
  
```



Area Percent Report

```

=====
RetTime      :      Retention Time
Multiplier   :      1.0000
Integration   :      1.0000
Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.023	1	VV	7.57495	5.08453e-1	5.13103
2	2.016	1	VB	14.06283	6.91681e-1	9.52572
3	3.464	1	VV	125.99226	8.10933	85.34324

Printed 1 1/1/2002 10:40:56 AM RATTANA 15.09.18

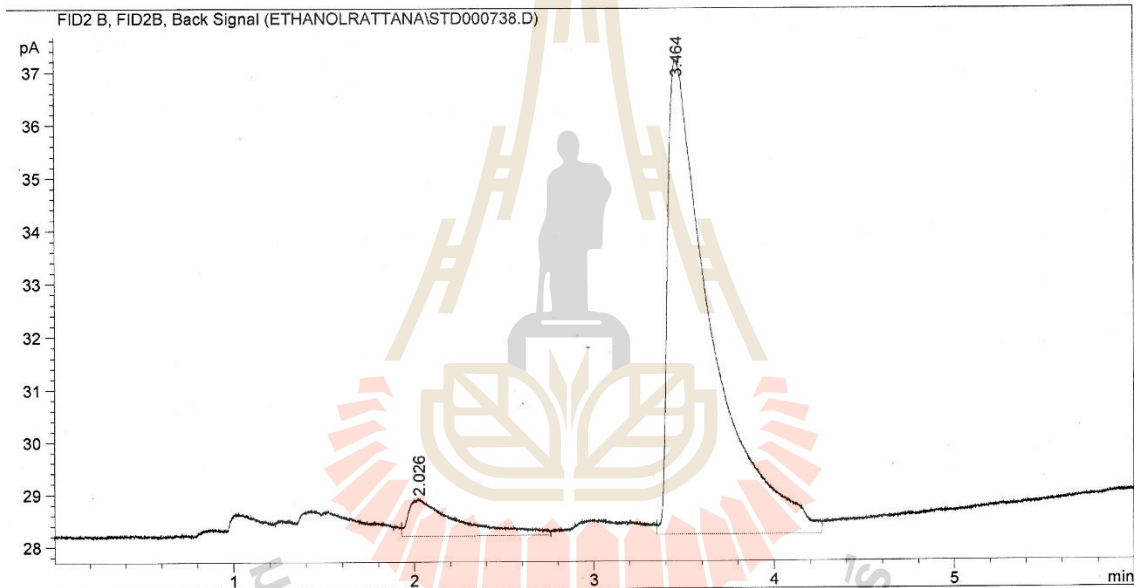
Page 1 of 2

File C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000738.D  
 Name: Std.

```

=====
Operator   : RATTANA 15.09.18
Instrument : Instrument 1
Injection Date : 1/1/2002 4:24:50 AM
Location   : -
Inj Volume : Manually
Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Changed    : 1/1/2002 4:22:17 AM by RATTANA 15.09.18
            (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Changed    : 1/1/2002 4:30:50 AM by RATTANA 15.09.18
            (modified after loading)
Method Info : Test IQ Aug 31, 2009
Sample Info : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp I. 48 hr
            . distillate 100 microL + 0.3% n-propanol 100 microL (T
            emp.38 C syring 50 microL) 15.09.18
=====

```



Area Percent Report

```

=====
RetTime      :      Retention Time
Multiplier:      :      1.0000
Integration:      :      1.0000
Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.026	1	VV	13.47946	6.77492e-1	8.23383
2	3.464	1	VV	150.22884	9.00730	91.76617

Printed 1/1/2002 4:30:51 AM RATTANA 15.09.18



ภาคผนวก ก

ผลการวิเคราะห์หาเอทานอล

ส่วนของระบบการผลิตเอทานอล (EthaRex reactor)

ด้วยก๊าซผสมอัตราส่วนร้อยละ 30:50:20 โดยปริมาตร

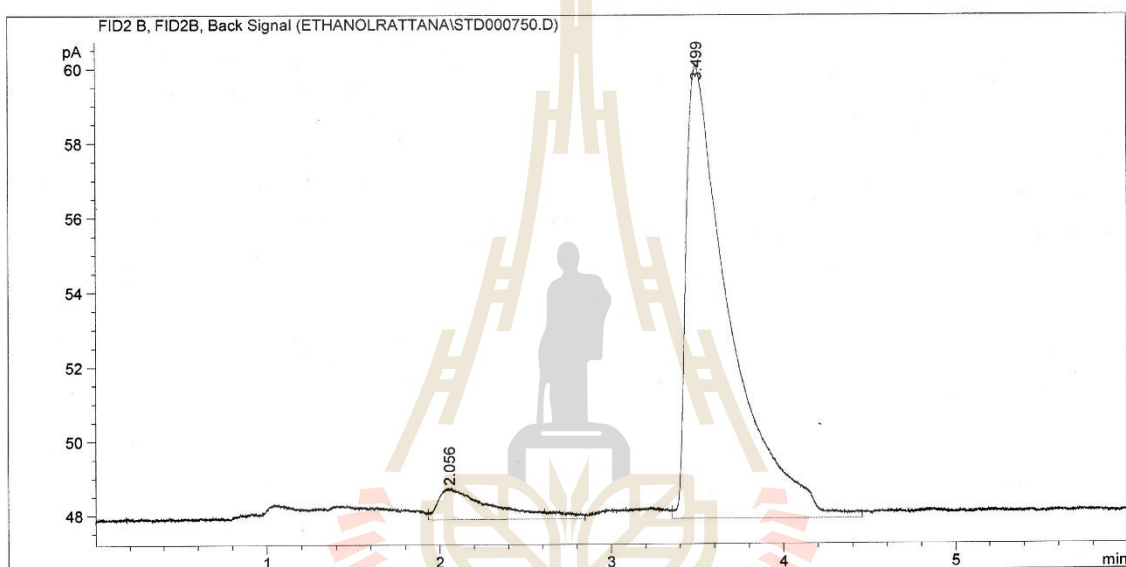


File C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000750.D  
 le Name: Std.

```

=====
Acq. Operator   : RATTANA 16.09.18
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : -
Injection Date  : 1/1/2002 6:58:32 AM   Inj Volume : Manually
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed    : 1/1/2002 6:51:13 AM by RATTANA 16.09.18
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed    : 1/1/2002 7:04:32 AM by RATTANA 16.09.18
                  (modified after loading)
Method Info     : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info     : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp II. 24 h
                  r. 100 microL + 0.3% n-propanol 100 microL (Temp.38 C
                  syring 50 microL) 16.09.18
  
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Retention Time  
 Multiplier: : 1.0000  
 Dilution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.056	1	VV	19.42828	8.15343e-1	8.34375
2	3.499	1	VV	213.42015	12.17846	91.65625

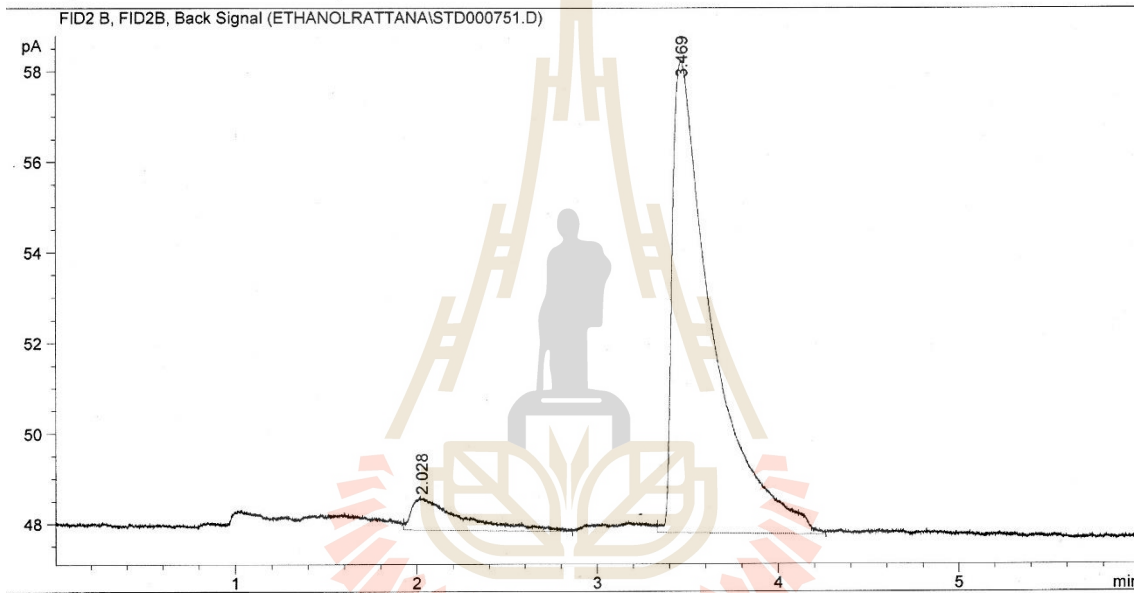
Instrument 1 1/1/2002 7:04:33 AM RATTANA 16.09.18

Page 1 of 2

File C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000751.D  
 Name: Std.

```

=====
. Operator   : RATTANA 16.09.18
. Instrument : Instrument 1           Location : -
. Injection Date : 1/1/2002 7:11:33 AM      Inj Volume : Manually
. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
. changed    : 1/1/2002 7:04:33 AM by RATTANA 16.09.18
              (modified after loading)
. Lysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
. changed    : 1/1/2002 7:17:32 AM by RATTANA 16.09.18
              (modified after loading)
. Method Info : Test IQ Aug 31, 2009
. Sample Info : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp II. 24 h
              r. 100 microL + 0.3% n-propanol 100 microL (Temp.38 C
              syring 50 microL) 16.09.18
=====
  
```



Area Percent Report

```

=====
Integrated By      :      Retention Time
Multiplier:       :      1.0000
Integration:       :      1.0000
Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
  
```

Channel 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

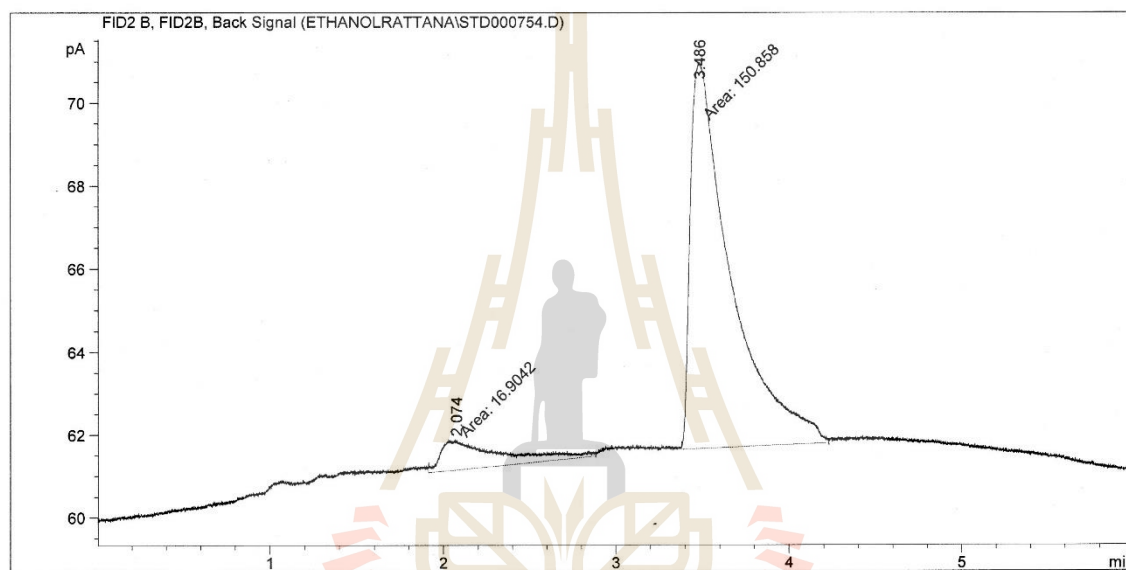
Peak	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.028	1	VV	14.05571	6.95552e-1	8.10299
2	3.469	1	VV	159.40744	10.42846	91.89701

a File C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000754.D  
 ple Name: Std.

```

=====
Acq. Operator   : RATTANA 17.09.18
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : -
Injection Date  : 1/1/2002 6:59:31 AM   Inj Volume : Manually
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed    : 1/1/2002 6:55:56 AM by RATTANA 16.09.18
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000754.D\DA.M (TOXICOETOH_FID1.M)
Last changed    : 1/1/2002 7:41:11 AM by RATTANA 17.09.18
Method Info     : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info     : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp II. 48 h
                  r. 100 microL + 0.3% n-propanol 100 microL (Temp.38 C
                  syring 50 microL) 17.09.18
  
```



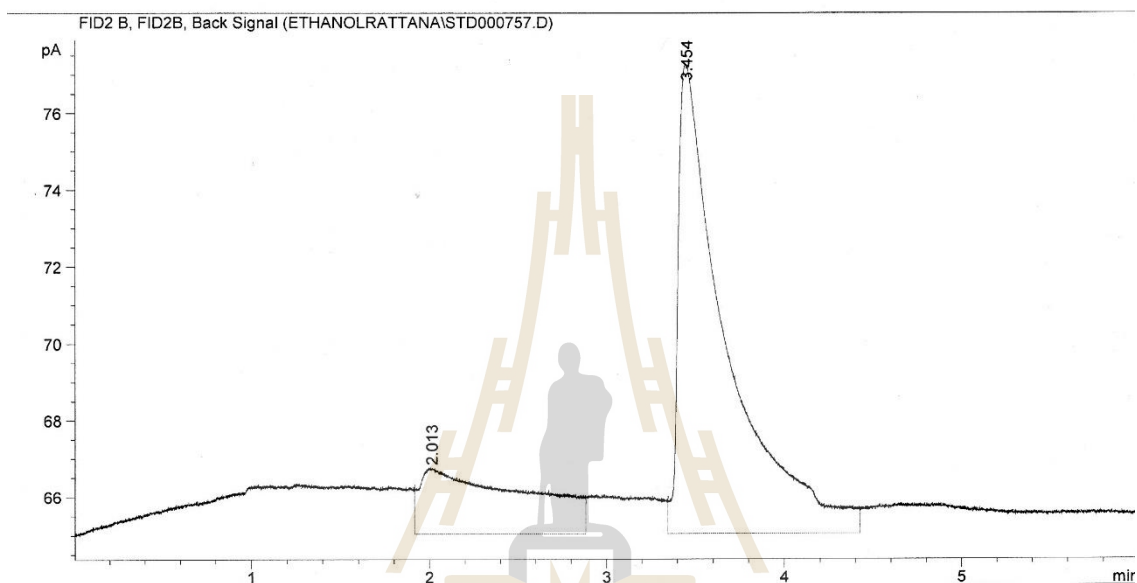
=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Retention Time  
 Multiplier: : 1.0000  
 Dilution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.074	1	MM T	16.90416	7.26056e-1	10.07624
2	3.486	1	MM T	150.85844	9.29140	89.92376

q. Operator : RATTANA 17.09.18  
 q. Instrument : Instrument 1 Location : -  
 Injection Date : 1/1/2002 7:24:42 AM Inj Volume : Manually  
 q. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH\_FID1.M  
 Method changed : 1/1/2002 7:22:56 AM by RATTANA 17.09.18  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000757.D\DA.M (TOXICOETOH\_FID1.M)  
 Method changed : 1/1/2002 7:47:26 AM by RATTANA 17.09.18  
 Method Info : Test IQ Aug 31, 2009  
 Sample Info : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp II. 48 h  
 r. 100 microL + 0.3% n-propanol 100 microL (Temp.38 C  
 syring 50 microL) 17.09.18



=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Retention Time  
 Multiplier: : 1.0000  
 Resolution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.013	1	VV	70.46726	1.69338	23.56211
2	3.454	1	VV	228.60304	12.23640	76.43789



ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์หาเอทานอล

ส่วนของระบบการผลิตเอทานอล (EthaRex reactor)

ด้วยก๊าซผสมอัตราส่วนร้อยละ 30:50:20 โดยปริมาตร

ด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

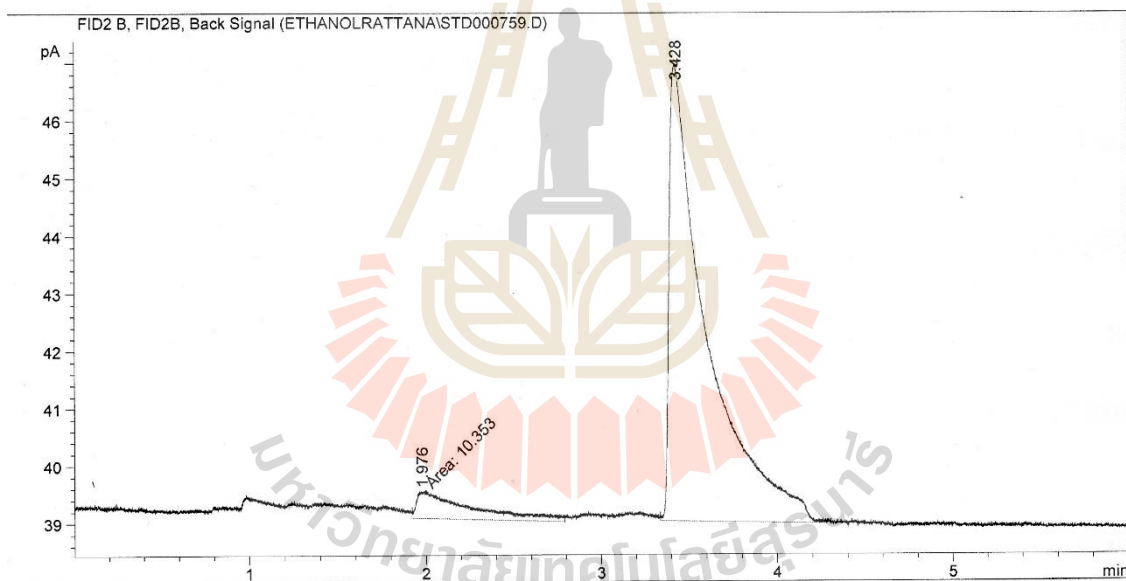
file C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000759.D  
Name: Std.

```

=====
q. Operator   : RATTANA 18.09.18
q. Instrument : Instrument 1
Injection Date: 1/1/2002 4:22:39 AM
Location      : -
Inj Volume   : Manually

q. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
st changed    : 1/1/2002 3:00:54 AM by RATTANA 17.09.18
               (modified after loading)
Analysis Method: C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000759.D\DA.M (TOXICOETOH_FID1.M)
st changed    : 1/1/2002 12:15:33 AM by RATTANA 21.09.18
Method Info   : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info   : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp III (sem
               i-feed batch). 24 hr. 100 microL + 0.3% n-propanol 100
               microL (Temp.38 C syring 50 microL) 18.09.18
  
```



=====  
Area Percent Report  
=====

```

Reported By      :      Retention Time
Multiplier:      :      1.0000
Dilution:        :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

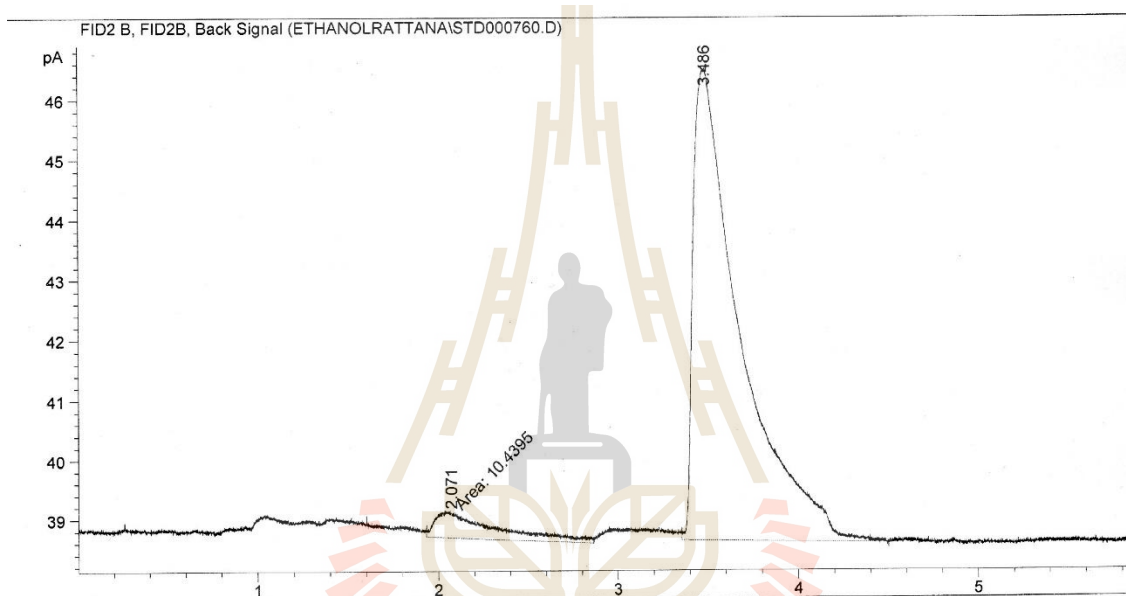
Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.976	1	MM T	10.35303	4.72139e-1	8.20974
2	3.428	1	VV	115.75371	7.87871	91.79026

file C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000760.D  
Name: Std.

```

=====
q. Operator   : RATTANA 18.09.18
q. Instrument : Instrument 1           Location : -
Injection Date : 1/1/2002 4:31:05 AM      Inj Volume : Manually
q. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
st changed   : 1/1/2002 4:28:40 AM by RATTANA 18.09.18
              (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000760.D\DA.M (TOXICOETOH_FID1.M)
st changed   : 1/1/2002 12:20:13 AM by RATTANA 21.09.18
Method Info  : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info  : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp III (sem
              i-feed batch). 24 hr. 100 microL + 0.3% n-propanol 100
              microL (Temp.38 C syring 50 microL) 18.09.18
  
```



=====  
Area Percent Report  
=====

Reported By : Retention Time  
Multiplier: 1.0000  
Dilution: 1.0000  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.071	1	MM T	10.43953	4.18468e-1	6.85851
2	3.486	1	VV	141.77315	7.84864	93.14149

Document 1 1/1/2002 12:21:57 AM RATTANA 21.09.18

Page 1 of 2

Sample Name: Std.

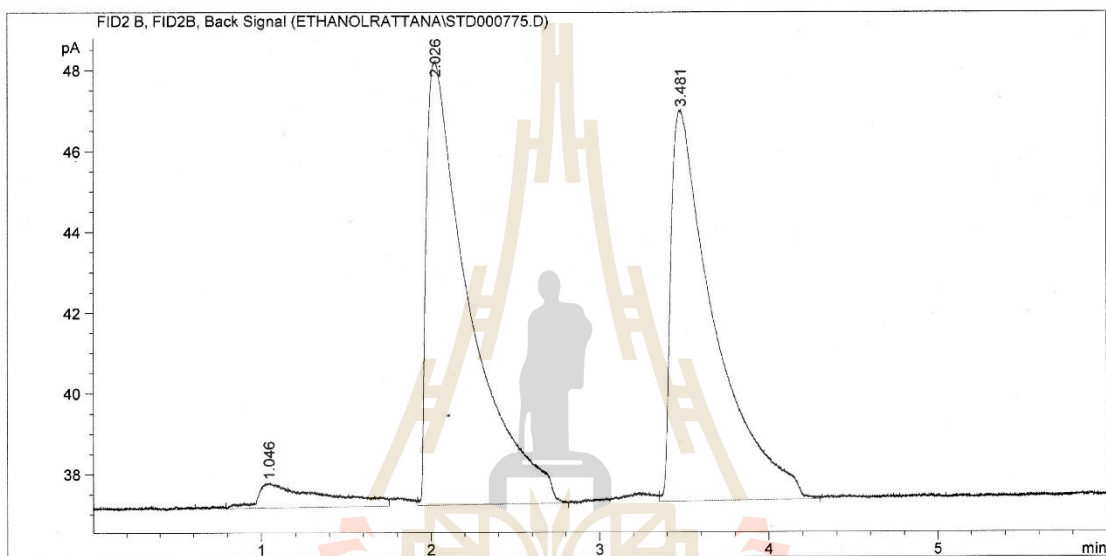
```

=====
Acq. Operator   : RATTANA 19.09.18
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : -
Injection Date  : 1/1/2002 4:00:42 AM
                                           Inj Volume : Manually

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed    : 1/1/2002 3:57:34 AM by RATTANA 19.09.18
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed    : 1/1/2002 4:06:42 AM by RATTANA 19.09.18
                  (modified after loading)
Method Info     : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info     : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp III (sem
                  i-feed batch). 48 hr. 100 microL + 0.3% n-propanol 100
                  microL (Temp.38 C syring 50 microL) 19.09.18
=====

```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Retention Time
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.046	1	VV	16.50094	6.00240e-1	4.29963
2	2.026	1	VV	194.66330	10.98214	50.72314



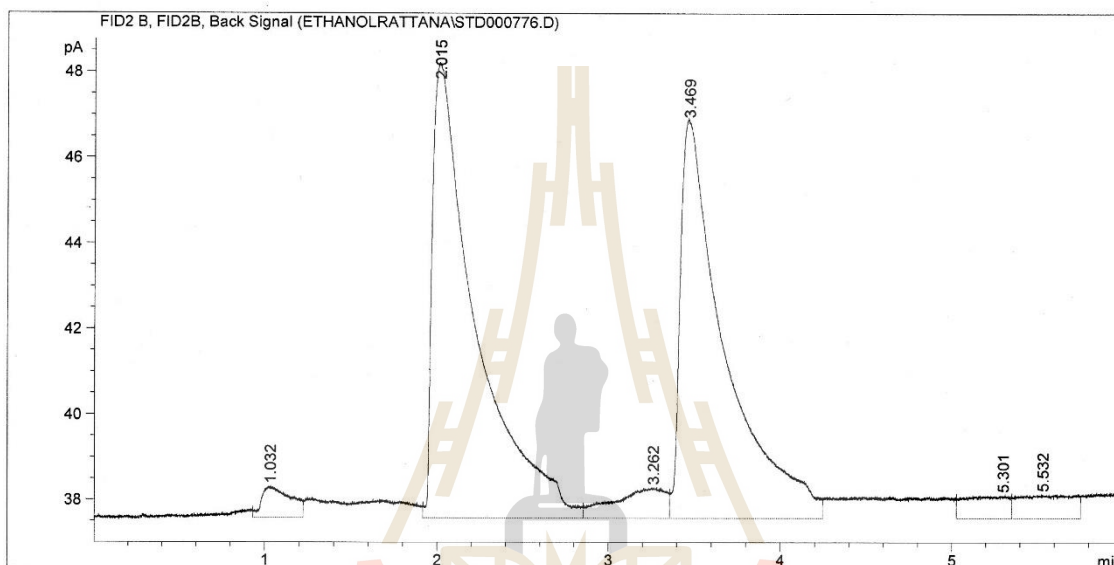
```

=====
Acq. Operator   : RATTANA 19.09.18
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date  : 1/1/2002 4:08:52 AM
Location       : -
Inj Volume     : Manually

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed   : 1/1/2002 4:06:43 AM by RATTANA 19.09.18
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed   : 1/1/2002 4:14:50 AM by RATTANA 19.09.18
                (modified after loading)
Method Info    : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info    : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp III (sem
                i-feed batch). 48 hr. 100 microL + 0.3% n-propanol 100
                microL (Temp.38 C syring 50 microL) 19.09.18

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Retention Time
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.032	1	VV	8.56381	7.02012e-1	2.15097
2	2.015	1	VV	186.12910	10.63980	46.74996

ument 1 1/1/2002 4:14:51 AM RATTANA 19.09.18

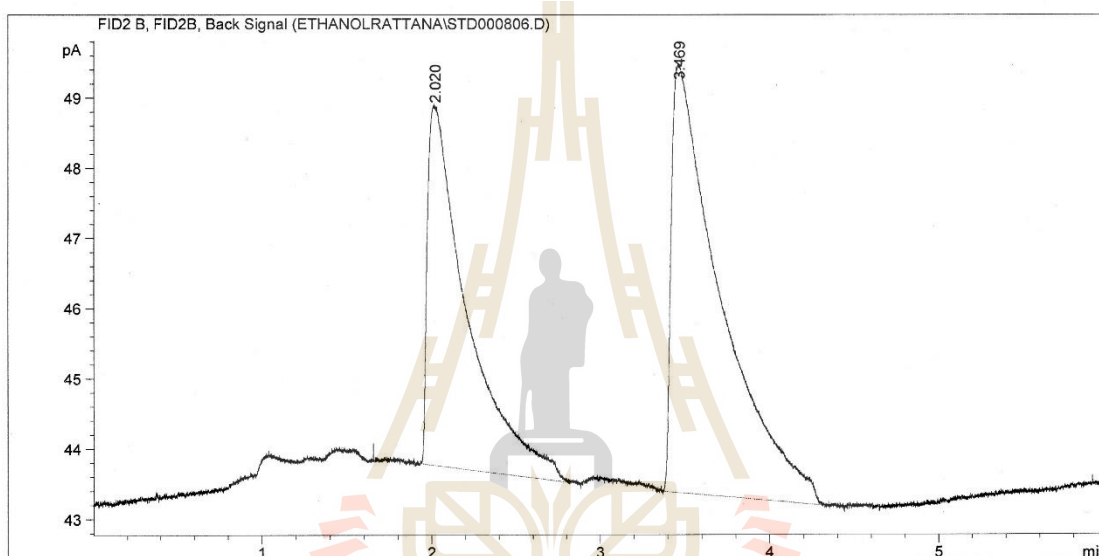
Page 1 of 2

File C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000806.D  
 Sample Name: Std.

```

=====
Acq. Operator   : RATTANA 20.09.18
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : -
Injection Date  : 1/1/2002 6:59:37 AM
                                           Inj Volume : Manually
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed    : 1/1/2002 6:58:14 AM by RATTANA 20.09.18
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed    : 1/1/2002 7:05:37 AM by RATTANA 20.09.18
                  (modified after loading)
Method Info     : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info     : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp III (sem
                  i-feed batch). 72 hr. 100 microL + 0.3% n-propanol 100
                  microL (Temp.38 C syring 50 microL) 20.09.18
  
```



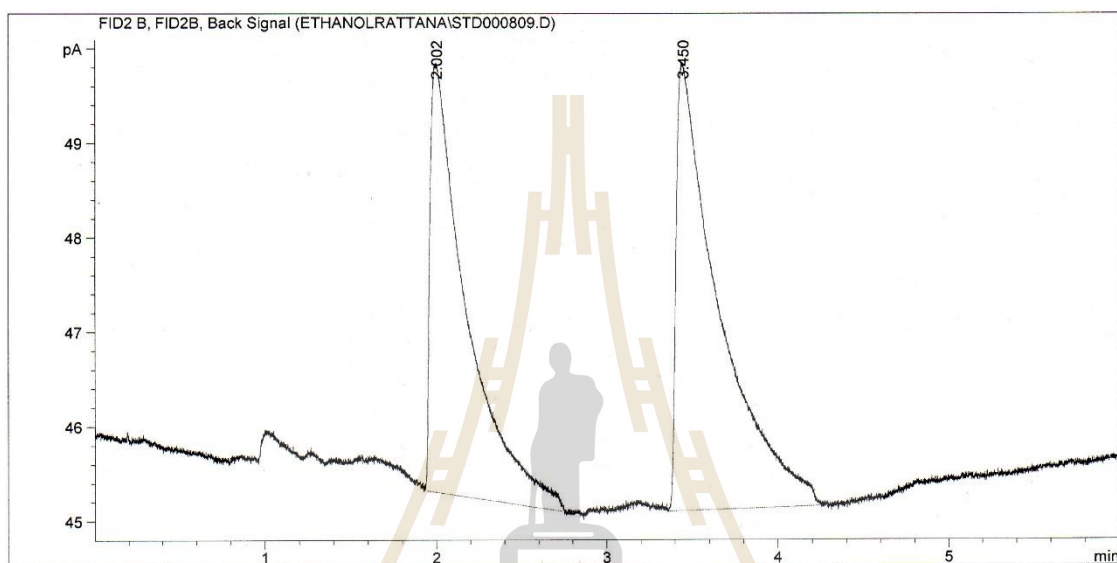
=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Retention Time  
 Multiplier: : 1.0000  
 Dilution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.020	1	BV	83.37836	5.11154	40.51545
2	3.469	1	VV	122.41562	6.08070	59.48455

Acq. Operator : RATTANA 20.09.18  
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : -  
 Injection Date : 1/1/2002 7:32:45 AM Inj Volume : Manually  
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH\_FID1.M  
 Last changed : 1/1/2002 7:31:06 AM by RATTANA 20.09.18  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH\_FID1.M  
 Last changed : 1/1/2002 7:38:45 AM by RATTANA 20.09.18  
 (modified after loading)  
 Method Info : Test IQ Aug 31, 2009  
 Sample Info : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp III (sem  
 i-fed batch). 72 hr. 100 microL + 0.3% n-propanol 100  
 microL (Temp.38 C syring 50 microL) 20.09.18



=====  
 Area Percent Report  
 =====

Sorted By : Retention Time  
 Multiplier: : 1.0000  
 Dilution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

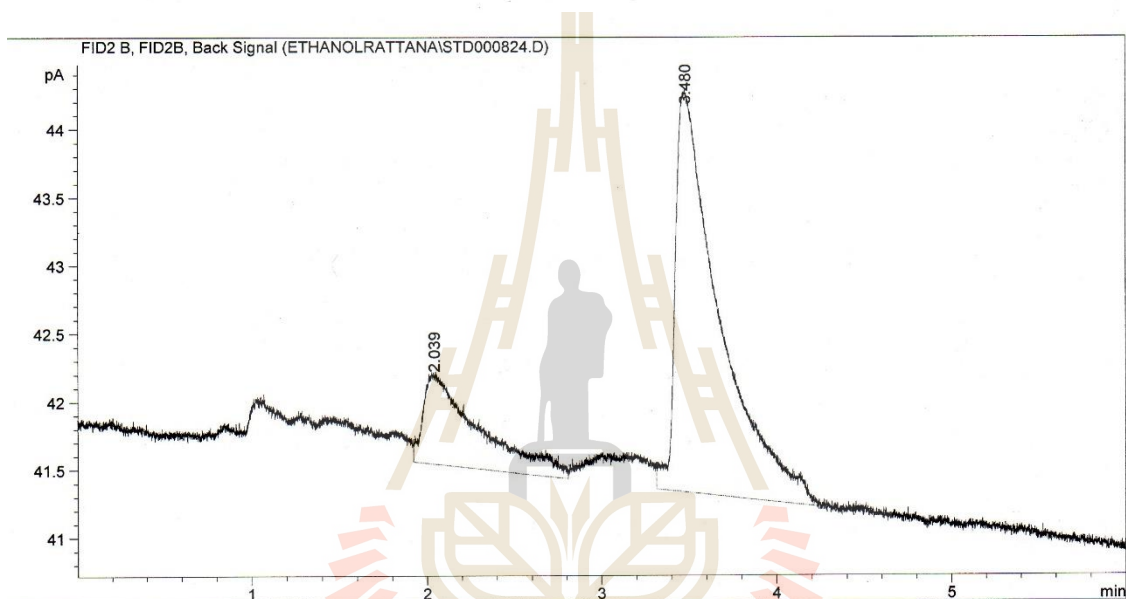
Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.002	1	VV	66.78910	4.52076	44.91132
2	3.450	1	VV	81.92419	4.71113	55.08868

File C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000824.D  
 Name: Std.

```

=====
Op. Operator   : RATTANA 21.09.18
Op. Instrument : Instrument 1           Location : -
Injection Date : 1/1/2002 4:35:35 AM   Inj Volume : Manually
Op. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed  : 1/1/2002 4:28:51 AM by RATTANA 21.09.18
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
Last changed  : 1/1/2002 4:41:35 AM by RATTANA 21.09.18
                (modified after loading)
Method Info   : Test IQ Aug 31, 2009

Sample Info   : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp III (sem
                i-feed batch). 96 hr. 100 microL + 0.3% n-propanol 100
                microL (Temp.38 C syring 50 microL) 21.09.18
  
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

Reported By : Retention Time  
 Multiplier: : 1.0000  
 Dilution: : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.039	1	VV	14.91923	6.46251e-1	22.49413
2	3.480	1	VB	51.40576	2.93127	77.50587

Document 1 1/1/2002 4:41:36 AM RATTANA 21.09.18

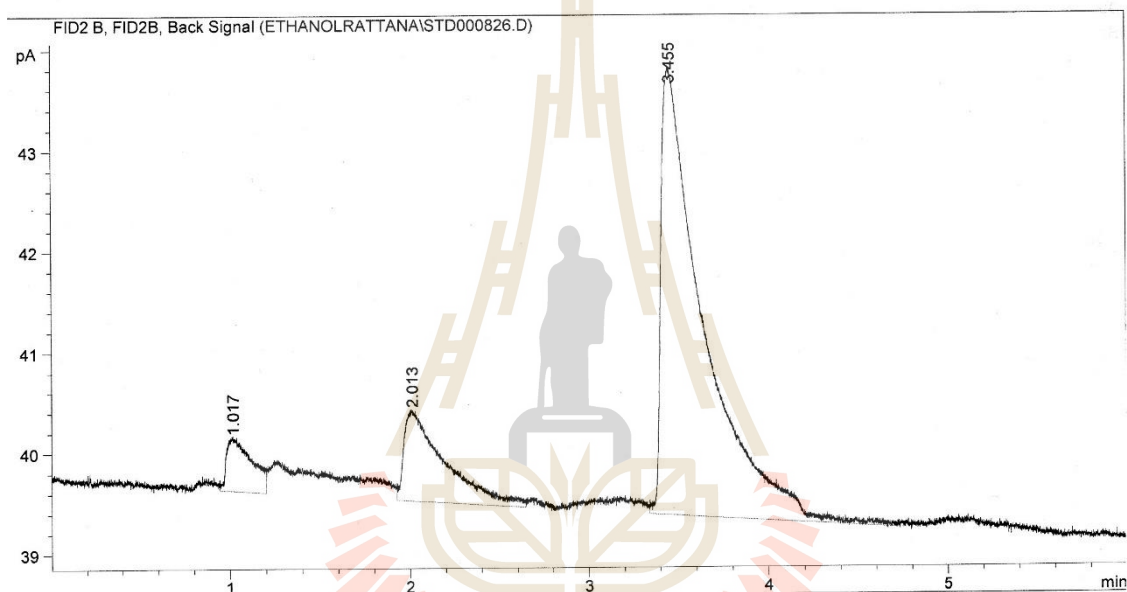
Page 1 of 2

e C:\CHEM32\1\DATA\ETHANOLRATTANA\STD000826.D  
 ame: Std.

```

=====
Operator   : RATTANA 21.09.18
Instrument : Instrument 1                Location  : -
Acq Date  : 1/1/2002 4:50:40 AM        Inj Volume: Manually
Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
changed   : 1/1/2002 4:49:18 AM by RATTANA 21.09.18
           (modified after loading)
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\TOXICOETOH_FID1.M
changed   : 1/1/2002 4:56:40 AM by RATTANA 21.09.18
           (modified after loading)
Mod Info  : Test IQ Aug 31, 2009

File Info : Fixed-film. Petrobacter sp. CO2, CO, H2 NB exp III (sem
           i-feed batch). 96 hr. 100 microL + 0.3% n-propanol 100
           microL (Temp.38 C syring 50 microL) 21.09.18
  
```



Area Percent Report

```

=====
Created By      : Retention Time
Multiplier:    : 1.0000
Integration:    : 1.0000
Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID2 B, FID2B, Back Signal

RetTime	Sig	Type	Area	Height	Area
[min]			[pA*s]	[pA]	%
1.017	1	VV	5.22160	5.13804e-1	5.68289
2.013	1	VV	14.20874	8.83186e-1	15.46398

Printed 1/1/2002 4:56:40 AM RATTANA 21.09.18

Page 1 of 2

## ประวัติคณะผู้วิจัย

### ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

#### หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว สิริภรณ์ โพธิวิชยานนท์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Siraporn Potivichayanon

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. ที่อยู่หน่วยงาน

สาขาวิชานาฏยสิ่งแวดล้อม สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-4422-3936 โทรสาร 0-4422-3920 E-mail: [siraporn@sut.ac.th](mailto:siraporn@sut.ac.th),

[possi12@yahoo.com](mailto:possi12@yahoo.com)

4. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2558 Certificate of International Program in Integrated Water Management training course, in the framework of the International program in Environmental Science, Saxion University of Applied Sciences, Deventer, the Netherlands.

Supported by Netherlands Fellowship Programmes (NFP)

พ.ศ. 2551 Certificate of International Training Program in Ecological Alternatives in Sanitation, Stockholm Environment Institute, Sweden

พ.ศ. 2548 Ph.D. (Biology) International Program, Faculty of Science, Mahidol University

พ.ศ. 2541 วท.บ. (สาธารณสุขศาสตร์) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Odor treatment, Biodegradation and Bioremediation, Ecological sanitation

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ :

6.1 หัวหน้าโครงการวิจัย:

เรื่องที่ 1 Removal of hydrogen sulfide by fixed-film bioscrubber

เรื่องที่ 2 การย่อยสลายไซยาไนด์ด้วยจุลินทรีย์

เรื่องที่ 3 Water management and sanitation in a community

เรื่องที่ 4 การประเมินความเสี่ยงของการนำน้ำเสียจากชุมชนขนาดเล็กที่ผ่านบำบัดแล้วมาใช้ในการเพาะปลูก ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2551 (งบเร่งด่วน

งบเร่งด่วน

- เรื่องที่ 5 การพัฒนาความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการกำจัดกลิ่นในรูปของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยใช้ระบบฟิสิกซ์-ฟิล์มไบโอสครับเบอร์
- เรื่องที่ 6 การผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์โดยเชื้อจุลินทรีย์
- เรื่องที่ 7 การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมี และชีวภาพในบริเวณพื้นที่ปกป้องพันธุกรรมพืช  
อพ.สธ. เขื่อนน้ำพุง จังหวัดสกลนคร
- เรื่องที่ 8 การพัฒนาความสามารถของระบบฟิสิกซ์-ฟิล์มไบโอสครับเบอร์
- เรื่องที่ 9 การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมโดยจุลินทรีย์ SUTSP1
- เรื่องที่ 9 การกำจัดไฮยาไนด์จากน้ำเสียอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์รวมกลุ่มร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบฟิสิกซ์-ฟิล์มเอสปีอาร์
- เรื่องที่ 10 การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิสิกซ์-ฟิล์มไบโอรีแอกเตอร์แบบต่อเนื่อง
- เรื่องที่ 11 Health risk assessment of tap water quality: a case study in the international housing, Deventer, The Netherlands
- 6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :
- เรื่องที่ 1 Removal of hydrogen sulfide by fixed-film bioscrubber. (ผู้วิจัยหลัก)  
แหล่งทุน Asian Development Bank (ADB)
- เรื่องที่ 2 Optimization of bioscrubber system for hydrogen sulfide removal. (ผู้ช่วยวิจัย)  
แหล่งทุน Asian Development Bank (ADB)
- เรื่องที่ 3 การประเมินห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบตามแนวทางปฏิบัติที่ดีที่สุดของห้องปฏิบัติการ: กรณีการชะแคะเมียมและตะกั่วจากภาชนะเซรามิก  
ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี: ภายใต้โครงการการพัฒนารอบนโยบายการเพิ่มศักยภาพห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เพื่อการเสริมสร้างความเข้มแข็งของอุตสาหกรรมของประเทศไทยในการรับรองผลกระทบจากการประกาศใช้ระเบียบว่าด้วยสารเคมี (REACH) ของสหภาพยุโรป (ผู้ร่วมวิจัย)  
แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
- เรื่องที่ 4 Water management and sanitation in a community (ผู้วิจัยหลัก)  
แหล่งทุน ภายใต้ความร่วมมือ การแนะนำและปรึกษาของ Swedish International Development Cooperation Agency (Sida) ในโปรแกรม International

- Training Programme (ITP) in Ecological Alternatives in Sanitation  
โดย Stockholm Environment Institute (SEI)
- เรื่องที่ 5 การประเมินความเสี่ยงของการนำน้ำเสียจากชุมชนขนาดเล็กที่ผ่านบำบัด  
แล้วมาใช้ในการเพาะปลูก
- แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2551 (งบ  
เร่งด่วน)
- เรื่องที่ 6 การย่อยสลายไฮยาไนด์ด้วยจุลินทรีย์
- แหล่งทุน เงินอุดหนุนการวิจัยเพื่อสนับสนุนการสร้างและพัฒนา นักวิจัยรุ่นใหม่  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550
- เรื่องที่ 7 การพัฒนาความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการกำจัดกลิ่นในรูปของก๊าซ  
ไฮโดรเจนไฮยาไนด์โดยใช้ระบบฟิกส์-ฟิล์มไบโอสครับเบอร์
- แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2553
- เรื่องที่ 8 การผลิตเอทานอลจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซ  
คาร์บอนมอนอกไซด์โดยเชื้อจุลินทรีย์
- แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2553
- เรื่องที่ 9 การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมี และชีวภาพในบริเวณพื้นที่ปกปัก  
พันธุกรรมพืช อพ.สธ. เขื่อนน้ำพุง จังหวัดสกลนคร
- แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555
- เรื่องที่ 10 Health risk assessment of tap water quality: a case study in the  
international housing, Deventer, The Netherlands
- แหล่งทุน Netherlands Fellowship Programmes (NFP) 2014-2015
- เรื่องที่ 11 การพัฒนาความสามารถของระบบฟิกส์-ฟิล์มไบโอสครับเบอร์ (Fixed-film  
bioscrubber capacity development)
- แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2554
- เรื่องที่ 12 การพัฒนาความสามารถของจุลินทรีย์รวมกลุ่มในการย่อยสลาย  
ไฮโอไฮยาเนตและโลหะไฮยาไนด์
- แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555
- เรื่องที่ 13 การกำจัดไฮยาไนด์จากน้ำเสียอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์รวมกลุ่ม  
ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบฟิกส์-ฟิล์มเอสปีอาร์
- แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556
- เรื่องที่ 14 การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมโดยจุลินทรีย์ SUTSP1
- แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556



- เรื่องที่ 15 การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิกซ์-ฟิล์มไบโอรีแอกเตอร์  
แบบต่อเนื่อง  
แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2557

#### งานตีพิมพ์เผยแพร่และประชุมวิชาการ

- Potivichayanon S, Pokethitiyook P, Kruatrachue M. 2006. Hydrogen sulfide removal by a novel fixed-film bioscrubber system. *Process Biochem* 41: 708-715.
- Potivichayanon S and Chuersuwan N. 2009. Greywater management and reuse for plant irrigation: A case study of Ban Laloommoa Village in Thailand. *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Science and Technology*. Chania, Crete, Greece. P.745-752.
- Potivichayanon S and Kitleartpornpairat R. 2010. Biodegradation of cyanide by a novel cyanide-degrading bacterium. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 66: 1376-1379.
- Potivichayanon S, Sungmon T, Chaikongmao W, Kamvanin S. 2011. Enhancement of biogas production from bakery waste by *Pseudomonas aeruginosa*. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 80: 529-532.
- Potivichayanon S and Phaisanthia K. 2013. Ethanol production from carbon-rich gases by a new mixed culture of bacteria. *Proceeding of International Conference on Engineering and Applied Science*. Tokyo, Japan. P.1304-1309.
- Phaisanthia K, Potivichayanon S, Chuersuwan N, Meevasana K. 2013. Removal of heavy metals from electroplating wastewater by cassava peel waste. (Best Paper Award). *Proceeding of International Conference on Environmental Protection and Renewable Energy*. Pataya, Thailand. P.125-130.
- Potivichayanon S and Kitleartpornpairat R. 2014. Degradation of cyanide to ammonia and nitrate by mixed culture of *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 and *Pseudomonas monteilii* SUTS 2. *Proceeding of the European Conference on Sustainability, Energy & the Environment*. Brighton, United Kingdom. P. 251-264.
- Supromin N, Potivichayanon S, Toensakes R. 2015. Degradation of metal cyanide from real electroplating wastewater by mixed culture of SUTS 1 and SUTS 2. (Best Paper Award). *3<sup>rd</sup> International conference on biological, chemical & environmental sciences (BCES-2015)*. Kuala Lumpur, Malaysia. 3: 75-80.

- Bunsort M, Potivichayanon S, Pentamwa P. 2015. Hydrogen cyanide and hydrogen sulfide gases removal by dual fixed-film bioscrubbers system. *KKU Science Journal* 43(4): 775-787.
- Potivichayanon S, Supromin N, Toensakes R. 2017. Degradation of a mixed microbial culture for thiocyanate and metal cyanide degradation. *3Biotech* 7:1-11.
- Potivichayanon, S., Toensakes, R. (2018). Bio-ethanol productivity by mixed culture of SUTSP1 and SUTSP5. *Exploring microorganisms: Recent advances in applied microbiology. Biomicroworld2017 conference. 18-20 October 2017. Madrid, Spain.*
- Toensakes, R., Potivichayanon, S., Tittabutr, P., and Vao-Soongnern. (2018). Isolation and identification of biodegradable plastic polyhydroxyalkanoate-producing strains by utilizing cassava pulp as a substrate. *Exploring microorganisms: Recent advances in applied microbiology. Biomicroworld2017 conference. 18-20 October 2017. Madrid, Spain.*

#### บทความวิชาการ

- สิริภรณ์ โพธิ์วิชยานนท์ 2553. รู้หรือไม่ว่า น้ำเสียจากครัวเรือนที่ผ่านการบำบัดแล้วนำมาใช้ในการเพาะปลูกพืชได้ดี วารสารอนามัยสิ่งแวดล้อม ปีที่ 12 ฉบับที่ 3 เมษายน-มิถุนายน 2553 หน้า 67-71.

## ผู้ร่วมงานวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว รุจิรัตน์ กิจเลิศพรไพโรจน์  
(ภาษาอังกฤษ) Miss Rujirat Kitleartpornpaioat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3409700127347
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail  
ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ 0-4422-3936 โทรสาร 0-4422-3920 E-mail: rujirata@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา  
พ.ศ. 2551 สาธารณสุขศาสตรบัณฑิต (อาชีวอนามัยและความปลอดภัย)  
มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช  
พ.ศ. 2545 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยบูรพา  
พ.ศ. 2540 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยบูรพา
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ  
Biodegradation, Water analysis, Industrial hygiene
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุ  
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วม  
วิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
  - 7.1. หัวหน้าโครงการวิจัย : -
  - 7.2. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :
    - เรื่องที่ 1 Biodegradation of Malachite green by Activated sludge. (ผู้วิจัยหลัก)  
แหล่งทุน Asian Development Bank (ADB)
    - เรื่องที่ 2 การประเมินความเสี่ยงของการนำน้ำเสียจากชุมชนขนาดเล็กที่ผ่านบำบัดแล้ว  
มาใช้ในการเพาะปลูก (ผู้ช่วยวิจัย)  
แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2551 (งบ  
เร่งด่วน)
    - เรื่องที่ 3 การย่อยสลายไซยาไนด์ด้วยจุลินทรีย์ (ผู้ช่วยวิจัย)  
แหล่งทุน เงินอุดหนุนการวิจัยเพื่อสนับสนุนการสร้างและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**งานตีพิมพ์เผยแพร่**

- Potivichayanon S and Kitleartpornpaioat R. 2010. Biodegradation of cyanide by a novel cyanide-degrading bacterium. Proceedings of ICEESD 2010 International Conference on Energy, Environment, Sustainable Development in World Academy of Science, Engineering and Technology. Paris, France. 66: 606-609.



## ประวัติผู้ช่วยโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวรัตนา เทินสะเกษ

(ภาษาอังกฤษ) Miss Rattana Toensakes

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 1 3001 00101 xx x

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยวิจัย

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขานาอมัยสิ่งแวดล้อม สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-4422-3963 E-mail : [rattana.t58@gmail.com](mailto:rattana.t58@gmail.com)

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2556-ปัจจุบัน กำลังศึกษา วท.ม. (มลพิษสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พ.ศ. 2553 วท.บ. (อนามัยสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพ

ในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละ  
ข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

6.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว :

เรื่องที่ 1 การศึกษาคุณภาพน้ำทางกายภาพ เคมี และชีวภาพในบริเวณพื้นที่ปกปัก  
พันธุกรรมพืช อพ.สธ. เขื่อนน้ำพุง จังหวัดสกลนคร (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555

เรื่องที่ 2 การพัฒนาความสามารถของระบบฟิกส์-ฟิล์มไบโอสครับเบอร์ (Fixed-film  
bioscrubber capacity development) (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2554

เรื่องที่ 3 การพัฒนาความสามารถของจุลินทรีย์รวมกลุ่มในการย่อยสลาย  
ไฮโอไซยานตและโลหะไซยาไนด์ (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555

เรื่องที่ 4 การกำจัดไซยาไนด์จากน้ำเสียอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์รวมกลุ่ม  
ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบฟิกส์-ฟิล์มเอสปีอาร์ (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556

เรื่องที่ 5 การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลจากก๊าซผสมโดยจุลินทรีย์ SUTSP1 (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556

เรื่องที่ 6 การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟิกส์-ฟิล์มไบโอรีแอกเตอร์

แบบต่อเนื่อง (ผู้ช่วยวิจัย)  
 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2557

#### งานตีพิมพ์เผยแพร่

- Moungnak N, Chimmair J, Toensakes R, Katramee A, Manatsakan S, Sukton B, Wongklom T, Chuersuwana N. 2014. Estimating daily exposure factors among Thai s' students : A case in an university in Northeastern Thailand. International conference on public health among the greater Mekhong sub-regional countries. Khon kean, Thailand. 6 : 197.
- Supromin N, Potivichayanon S, Toensakes R. 2015. Degradation of metal cyanide from real electroplating wastewater by mixed culture of SUTS 1 and SUTS 2. 3<sup>rd</sup> International conference on biological, chemical & environmental sciences (BCES-2015). Kuala Lumpur, Malaysia. 3: 75-80.
- Toensakes R, Potivichayanon S, Supromin N. 2015. Screening and identification of biodegradable plastic polyhydroxyalkanoate-producing strains by rapid viable-colonies straining method. The 41<sup>th</sup> congress on science and technology of Thailand (STT41). Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Katramee A, Toensakes R, Potivichayanon S. 2015. Biodegradation of oil and grease from synthetic wastewater by local isolation lipid degrading microorganism. The 41<sup>th</sup> congress on science and technology of Thailand (STT41). Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Potivichayanon S, Supromin N, Toensakes R. 2017. Degradation of a mixed microbial culture for thiocyanate and metal cyanide degradation. 3Biotech 7:1-11.
- Toensakes, R., Potivichayanon, S., Tittabutr, P., and Vao-Soongnern. (2018). Isolation and identification of biodegradable plastic polyhydroxyalkanoate-producing strains by utilizing cassava pulp as a substrate. Exploring microorganisms: Recent advances in applied microbiology. Biomicroworld2017 conference. 18-20 October 2017. Madrid, Spain.

## ประวัติผู้ช่วยโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวนุชจลี สุพรหมอินทร์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Nootjalee Supromin

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 1 4205 00060 xx x

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยวิจัย

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขานาโนสิ่งแวดลอม สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-4422-3963 E-mail: [Nootjalee\\_nat@hotmail.com](mailto:Nootjalee_nat@hotmail.com)

## 5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2559 วท.ม. (มลพิษสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พ.ศ. 2555 วท.บ. (อนาณัยสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## 6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพ

ในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละ  
ข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

## 6.1 งานวิจัยที่สำเร็จแล้ว :

เรื่องที่ 1 การพัฒนาความสามารถของจุลินทรีย์รวมกลุ่มในการย่อยสลาย  
ไฮโดรคาร์บอนและโลหะไฮยาไนต์ (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555

เรื่องที่ 2 การพัฒนาความสามารถของระบบฟิสิกซ์-ฟิล์มไบโอสครับเบอร์ (Fixed-film  
bioscrubber capacity development) (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2554

เรื่องที่ 3 การกำจัดไฮยาไนต์จากน้ำเสียอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์รวมกลุ่ม  
ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบฟิสิกซ์-ฟิล์มเอสปีอาร์ (ผู้ช่วยวิจัย)

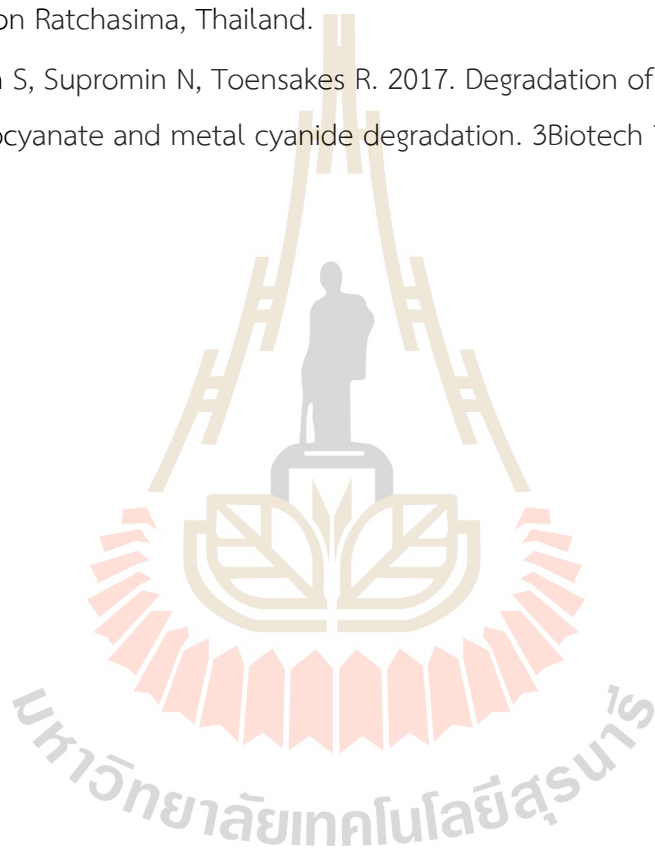
แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556

เรื่องที่ 4 การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลจากกากผสมโดยจุลินทรีย์ SUTSP1 (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556

**งานตีพิมพ์เผยแพร่**

- Supromin N. , Potivichayanon S, Toensakes R. 2015. Degradation of metal cyanide from real electroplating wastewater by mixed culture of SUTS 1 and SUTS 2. 3<sup>rd</sup> International conference on biological, chemical & environmental sciences (BCES-2015). Kuala Lumpur, Malaysia. 3: 75-80.
- Toensakes R, Potivichayanon S, Supromin N. 2015. Screening and identification of biodegradable plastic polyhydroxyalkanoate- producing strains by rapid viable-colonies straining method. The 41<sup>th</sup> congress on science and technology of Thailand (STT41). Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Potivichayanon S, Supromin N, Toensakes R. 2017. Degradation of a mixed microbial culture for thiocyanate and metal cyanide degradation. 3Biotech 7:1-11.





## ประวัติผู้ช่วยโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวเกษกนก แซ่อึ้ง

(ภาษาอังกฤษ) Miss Ketkanok Saeuang

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 1 3002 00153 xx x

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยวิจัย

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขานาอมัยสิ่งแวดล้อม สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-4422-3963 E-mail: yai\_jj@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2558-ปัจจุบัน วท.ม. (มลพิษสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พ.ศ. 2557

วท.บ. (อนามัยสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพ

ในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละ  
ข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

6.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว :

เรื่องที่ 1 การกำจัดไซยาไนด์จากน้ำเสียอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์รวมกลุ่ม  
ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบฟลักซ์-ฟิล์มเอสปีอาร์ (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556

เรื่องที่ 2 การพัฒนาระบบการผลิตเอทานอลจากกากผสมโดยจุลินทรีย์ SUTSP1 (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2556

เรื่องที่ 3 การพัฒนาการผลิตเอทานอลด้วยระบบฟลักซ์-ฟิล์มไบโอรีแอกเตอร์  
แบบต่อเนื่อง (ผู้ช่วยวิจัย)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2557