



การพัฒนาการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยเชื้อ *Paraclostridium bifermentans* ร่วมกับการใช้
สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการพัฒนาชุดเก็บตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดย
ควบคุมผ่านอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง

วิศวกร มะธิมาปะเข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

การพัฒนาการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยเชื้อ *Paraclostridium bifermentans* ร่วมกับการใช้
สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการพัฒนาชุดเก็บตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดย
ควบคุมผ่านอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง



วิศวกร มะธิมาปะเช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

IMPROVEMENT OF BIOBUTANOL PRODUCTION OF *PARACLOSTRIDIUM BIFERMENTANS*
COMBINED WITH AGRICULTURAL WASTE AS SUBSTRATE AND THE DEVELOPMENT OF
AN AUTO BIOREACTOR SAMPLE COLLECTING SYSTEM CONTROLLED VIA THE INTERNET
OF THINGS.



VISSAVAKAWN MATIMAPA-KAY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER DEGREE OF ENGINEERING
IN BIOENGINEERING
FACULTY OF ENGINEERING
BURAPHA UNIVERSITY

2024

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ วิศวกร มะธิมาปะเช ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ญาณิศา ละอองอุทัย)

(ศาสตราจารย์ ดร.วิทยา เงินแท้)

..... กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ญาณิศา ละอองอุทัย)

.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วชิรา ดาวสุด)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วชิรา ดาวสุด)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ โพธิ์ศรี)

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณยศ คุรุกิจโกศล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวภาพ ของมหาวิทยาลัย
บูรพา

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทวัส แจ่มเอียด)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

64910148: สาขาวิชา: วิศวกรรมชีวภาพ; วศ.ม. (วิศวกรรมชีวภาพ)

คำสำคัญ: วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร/ กระบวนการหมักแบบอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล/ อินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง/ ไมโครคอนโทรลเลอร์

วิศวกร มะธิมาปะเข : การพัฒนาการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยเชื้อ

Paraclostridium bifermentans ร่วมกับการใช้สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการพัฒนาชุดเก็บตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยควบคุมผ่านอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง.

(IMPROVEMENT OF BIOBUTANOL PRODUCTION OF *PARACLOSTRIDIUM BIFERMENTANS* COMBINED WITH AGRICULTURAL WASTE AS SUBSTRATE AND THE DEVELOPMENT OF AN AUTO BIOREACTOR SAMPLE COLLECTING SYSTEM CONTROLLED VIA THE INTERNET OF THINGS.) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ญาณิศา ละอองอุทัย, วชิรา ดาวสุด ปี พ.ศ. 2567.

งานวิจัยฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยเชื้อ

Paraclostridium bifermentans ร่วมกับการใช้สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3

ชนิด คือ ชานอ้อย เปลือกสับปะรด และเปลือกแตงโม และพัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติรวมทั้ง

ระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนเพื่อนำมาใช้งานร่วมกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยควบคุมผ่าน

อินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง พบว่า ชานอ้อยที่ถูกปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มี

ปริมาณลิกนินก่อนและหลังปรับสภาพเท่ากับ $19.78 \pm 0.48\%$ และ $9.44 \pm 0.54\%$ อีกทั้งยังส่งผล

ให้ชานอ้อยเกิดเป็น amorphous cellulose ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ง่าย เมื่อนำเข้าสู่

กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยวิธี steam hydrolysis จำนวน 6 รอบ พบว่า มีปริมาณความเข้มข้นของ

น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.20, 25.32, 22.92, 22.16, 19.00 และ 16.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ใน

ส่วนของการไฮโดรไลซิสเปลือกสับปะรดและเปลือกแตงโม มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์

เท่ากับ 23.74 และ 30.19 กรัมต่อลิตร เมื่อนำไปหมักในขวดรูปชมพู่ เพื่อทดสอบความสามารถใน

การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเชื้อ *Paraclostridium bifermentans* ทั้งสายพันธุ์

ดั้งเดิม และเชื้อกลายพันธุ์รหัส 45-20, 45-21, 60-12, 60-17 และ 60-25 จากน้ำตาลรีดิวซ์ที่

แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด และใช้เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งหมักด้วยน้ำตาลกลูโคสชนิดผงเป็นตัว

ควบคุม ดำเนินการหมักภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความ

เป็นกรด - ต่างระหว่าง 6.5 ถึง 7.5 เวลาในการหมัก 5 วัน พบว่า เชื้อกลายพันธุ์รหัส 45-20 จากการ

หมักด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับปะรด มีความสามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้

สูงที่สุด คือ 4.1989, 19.0010 และ 13.8005 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เท่ากับ 0.2160, 0.9774 และ 0.7099 ตามลำดับ

การพัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติและระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อนำมาใช้งานร่วมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งสองระบบ ทั้งใน ส่วนการเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมงตลอดเวลากการหมัก แจ้งเตือนผู้ใช้งานผ่านระบบ Line notify การบันทึกสภาวะการหมักบน Google sheets ผ่าน IFTTT Platform และการแสดงข้อมูลบน NETPIE2020 อีกทั้งยังสามารถควบคุมให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ตลอดระยะเวลาการหมัก 16 วัน

เมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์รหัส 45-20 เพิ่มขนาดการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 10 ลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างระหว่าง 6.5 ถึง 7.5 เวลาในการหมัก 16 วัน พบว่า ผลิตภัณฑ์ชีวภาพได้ความเข้มข้นสูงที่สุด รองลงมา คือ สารละลายเอทานอล และสารละลายอะซิโตน มีความเข้มข้นเท่ากับ 30.0680, 10.9794 และ 10.2913 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 120, 318 และ 318 มีผลได้ (yield) ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 8.6993, 25.4167 และ 9.2810 ตามลำดับ

64910148: MAJOR: BIOENGINEERING; M.Eng. (BIOENGINEERING)

KEYWORDS: Agricultural Waste/ Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation/ Internet of Thing (IoT)/ Microcontroller

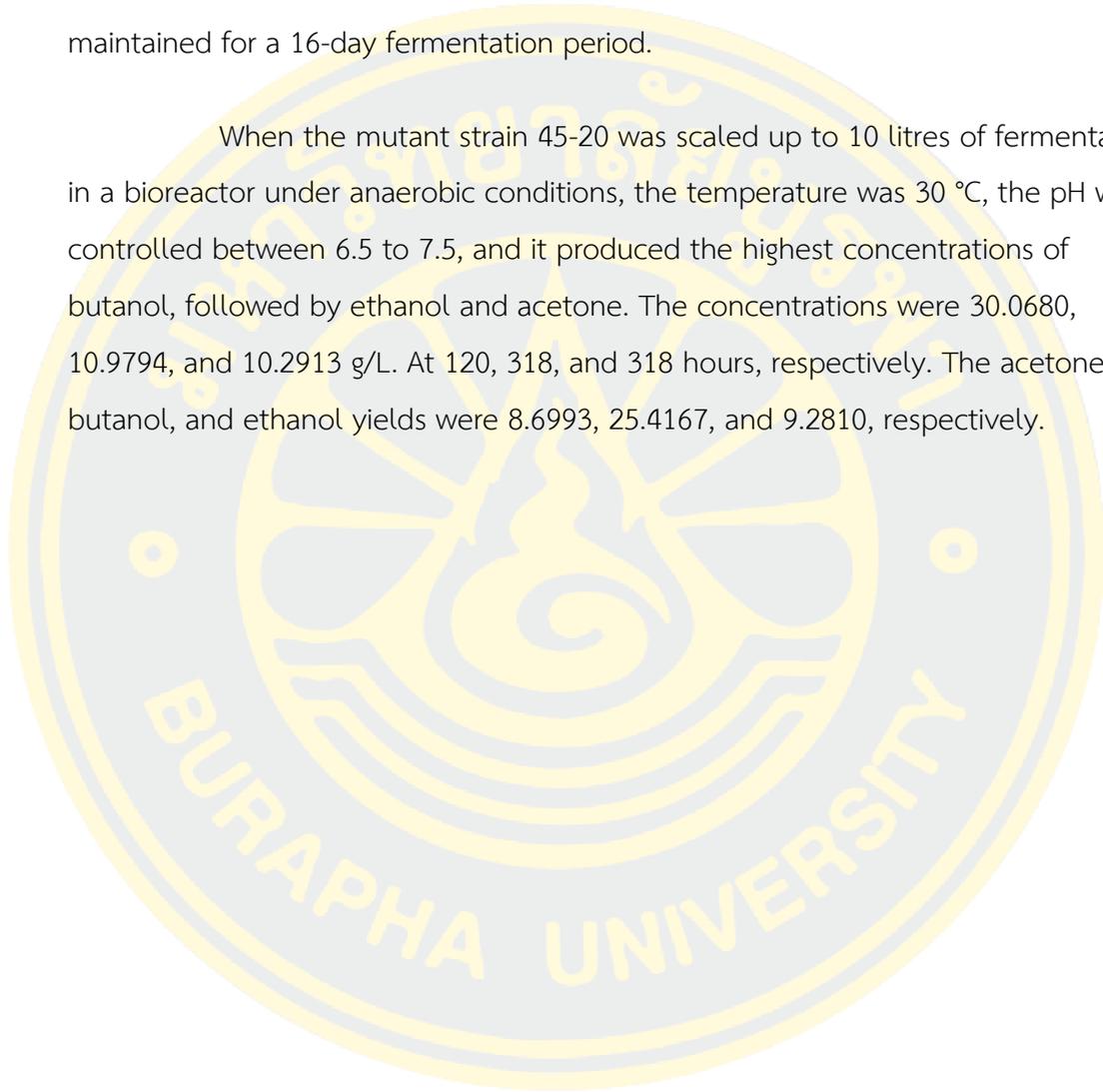
VISSAVAKAWN MATIMAPA-KAY : IMPROVEMENT OF BIOBUTANOL PRODUCTION OF *PARACLOSTRIDIUM BIFERMENTANS* COMBINED WITH AGRICULTURAL WASTE AS SUBSTRATE AND THE DEVELOPMENT OF AN AUTO BIOREACTOR SAMPLE COLLECTING SYSTEM CONTROLLED VIA THE INTERNET OF THINGS.. ADVISORY COMMITTEE: YANISA LAOONG-U-THAI, Ph.D. WACHIRA DAOSUD, Ph.D. 2024.

This research aims to improve biobutanol production of *Paraclostridium bifermentans* combined with agricultural waste (sugarcane bagasse, pineapple peels, and watermelon peels) as substrate, develop an auto bioreactor sample collecting system and develop an anaerobic condition controlling system controlled via the Internet of Things. It was found that treating bagasse with a sodium hydroxide solution reduced the lignin content from $19.78 \pm 0.48\%$ to $9.44 \pm 0.54\%$. This treatment also transformed the bagasse into amorphous cellulose, which can be easily converted to reducing sugar. Using the steam hydrolysis method for 6 cycles, the concentrations of reducing sugar obtained were 23.20, 25.32, 22.92, 22.16, 19.00, and 16.55 g/L, respectively. Hydrolysis of pineapple and watermelon peels yielded reducing sugar concentrations of 23.74 and 30.19 g/L, respectively, when fermented in an Erlenmeyer flask with a working volume of 500 mL by using *Paraclostridium bifermentans* cultures. Wildtype (WT) and mutant strains 45-20, 45-21, 60-12, 60-17, and 60-25 were tested in 5 days under anaerobic conditions, the temperature was 30 °C, and the pH was controlled between 6.5 to 7.5, the results show that mutant strains 45-20. The fermentation of reducing sugars from pineapple peels with the mutant strain produced acetone, butanol and ethanol being 4.1989, 19.0010, and 13.8005 g/L, respectively. The acetone, butanol, and ethanol yields were 0.2160, 0.9774, and 0.7099, respectively.

The development of an automatic sampler and an anaerobic control

system, when used with a bioreactor, proved to be efficient. The systems collect samples every hour during fermentation, notify users through the Line Notify system, record fermentation conditions on Google Sheets via the IFTTT platform, and show these data on NETPIE2020. The anaerobic conditions in the bioreactor were always maintained for a 16-day fermentation period.

When the mutant strain 45-20 was scaled up to 10 litres of fermentation in a bioreactor under anaerobic conditions, the temperature was 30 °C, the pH was controlled between 6.5 to 7.5, and it produced the highest concentrations of butanol, followed by ethanol and acetone. The concentrations were 30.0680, 10.9794, and 10.2913 g/L. At 120, 318, and 318 hours, respectively. The acetone, butanol, and ethanol yields were 8.6993, 25.4167, and 9.2810, respectively.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีจากคำแนะนำของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ญาณิศา ละอองอุทัย อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และด้วยคำแนะนำจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิศิรา ดาวสุด อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ทั้งสองท่านได้ให้คำปรึกษาในด้านการทำวิทยานิพนธ์ และให้คำปรึกษาในด้านการใช้ชีวิตแก่ข้าพเจ้าอย่างเต็มความสามารถ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถแก้ไขปัญหาในด้านต่าง ๆ ให้ผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดีเสมอมา รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ โพธิ์ศรี อาจารย์ประจำหลักสูตร วิศวกรรมชีวภาพ ที่ได้ให้คำปรึกษา ให้การช่วยเหลือข้าพเจ้าในด้านเครื่องมือวิเคราะห์ในงานวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วิทยา เงินแท้ อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และคณะกรรมการทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ด้านวิชาการ ตลอดจนคำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้าให้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นความกตัญญูแด่ ครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ให้การสนับสนุนทั้งด้านกำลังใจ และเงินทุน ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จในด้านการเรียนเท่าทุกวันนี้ ขอขอบคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนทุนส่งเสริมและยกระดับคุณภาพบัณฑิตศึกษาเพื่อพัฒนาสู่ผู้ช่วยนักวิจัยที่ยั่งยืน (อว 8116/760) และมอบทุนนำเสนองานวิชาการ (ประกาศคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ 032/2567 ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2567 ครั้งที่ 2) ณ สาธารณรัฐประชาชนจีน แก่ข้าพเจ้า ตลอดจนสนับสนุนในด้านสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยฉบับนี้ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพาที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย (ประกาศบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ 0140/2566) และทุนสนับสนุนเข้าร่วมนำเสนอผลงาน ณ สาธารณรัฐประชาชนจีน (ประกาศบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ 0061/2567) แก่ข้าพเจ้า

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอขอบคุณตนเองที่มุ่งมั่น ฝ่าฝืนอุปสรรคในทุกด้านจนประสบความสำเร็จในการศึกษา ขอขอบคุณนายเอกชัย ไกลถิ่น นิสิตปริญญาเอก สาขาชีวสารสนเทศศาสตร์และชีววิทยาเชิงคอมพิวเตอร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนายเมธา เมืองประเสริฐ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้คำแนะนำในการเขียนโปรแกรมในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้และสนับสนุนเรื่องพิมพ์สามมิติแก่ข้าพเจ้า ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

วิศวกร มะธิมาปะเข

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ตัวแปรที่ศึกษา.....	4
ขอบเขตงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
บิวทานอล.....	7
กระบวนการผลิตบิวทานอล.....	8
<i>Paraclostridium bifermentans</i>	11
วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Agricultural waste).....	12
กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis process).....	13
ปัจจัยที่มีต่อการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยแบคทีเรีย <i>P. bifermentans</i>	15
Arduino.....	17
อินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง (Internet of Things; IoT).....	23

ระบบให้บริการแพลตฟอร์ม Network platform for Internet of everything platform; NETPIE 2020	25
บอร์ดไมโครคอนโทรลเลอร์ ESP-WROOM-32.....	27
ชุดทำความเย็นด้วย Peltier thermoelectric cooler	29
Switching power supply (Thailand factomart industrail product, 2018).....	32
หลักการออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ.....	33
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	36
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	39
วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	39
วิธีการทดลอง	40
กระบวนการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)	40
การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	46
กระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ	79
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน	89
ผลการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar).....	89
ผลการพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	94
ผลการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ	100
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงาน	143
บรรณานุกรม.....	145
ภาคผนวก.....	154
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	174

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1-1 ตัวแปรที่ศึกษาในงานวิจัย.....	4
ตารางที่ 2-1 ข้อมูลจำเพาะของบอร์ด Arduino mega 2560 (Vidal-Pardo & Pindado, 2018) .	18
ตารางที่ 2-2 ขาสัญญาณของบอร์ด Arduino mega 2560 และหน้าที่ (Arduino CC, n.d.).....	21
ตารางที่ 2-3 ส่วนประกอบในหน้าต่างโปรแกรม Arduino IDE (ดอนสัน ปงผาบ, 2563).....	23
ตารางที่ 2-4 ข้อมูลจำเพาะบอร์ด ESP32 (AZ-Delivery, n.d.).....	28
ตารางที่ 2-5 ส่วนประกอบของช่องเชื่อมต่อภายในบอร์ด ESP32 (AZ-Delivery, n.d.).....	29
ตารางที่ 2-6 คุณสมบัติจำเพาะของแผ่นเพลทีเยอร์ รุ่น TEC1-12704 (Electric Components datasheet search, n.d.).....	31
ตารางที่ 3-1 องค์ประกอบของ Cooked meat medium broth	79
ตารางที่ 3-2 องค์ประกอบของอาหาร PCM.....	80
ตารางที่ 4-1 ผลของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งใช้น้ำตาลรีตีวซ์จากชานอ้อย.....	104
ตารางที่ 4-2 ผลของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งใช้น้ำตาลรีตีวซ์จากเปลือกสับปะรด.....	112
ตารางที่ 4-3 ผลของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งใช้น้ำตาลรีตีวซ์จากเปลือกแดงโม	120
ตารางที่ 4-4 เปรียบเทียบความเข้มข้นสารละลายบิวทานอลในงานวิจัยอื่นด้วยการหมักแบบกะ ...	136
ตารางที่ 4-5 เปรียบเทียบภาพรวมกระบวนการหมักในขวดทดลองและถึงปฏิกรณ์ชีวภาพของ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ซึ่งหมักด้วยน้ำตาลจากเปลือกสับปะรด	138

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของบิวทานอล (ก.) เอ็น-บิวทานอล (ข.) ไอโซบิวทานอล (Hachuta et al., 2022).....	7
ภาพที่ 2-2 กระบวนการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีการทางเคมี (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2558)	8
ภาพที่ 2-3 กระบวนการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Niemistö, 2014).....	10
ภาพที่ 2-4 สัณฐานของแบคทีเรีย <i>Paraclostridium bifermentans</i> (Vissavakawn, 2024).....	11
ภาพที่ 2-5 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Lucas et al., 2021) .	12
ภาพที่ 2-6 บอร์ด Arduino Mega 2560 (Rapid Electronics Limited, 2012).....	18
ภาพที่ 2-7 ส่วนประกอบในบอร์ด Arduino mega 2560 (Rapid Electronics Limited, 2012)..	19
ภาพที่ 2-8 โปรแกรม Arduino IDE version 2.3.2 (Vissavakawn, 2024).....	22
ภาพที่ 2-9 อินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง (Internet of things; IoT) (Mocrii et al., 2018).....	23
ภาพที่ 2-10 Platform NETPIE2020 (NECTEC, 2017)	25
ภาพที่ 2-11 บอร์ด ESP-32 NodeMCU AZ-Delivery module WLAN Wi-Fi development board with CP2102 (AZ-Delivery, n.d.)	27
ภาพที่ 2-12 ระบบทำความเย็น (ก) องค์ประกอบรวมของชุดทำความเย็น (ข) แผ่นเพลเทียร์รุ่น thermoelectric cooler TEC1-12704 (ค) ชิ้นส่วนในชุดทำความเย็นทั้งหมด	29
ภาพที่ 2-13 ลักษณะการทำงานของแผ่นเพลเทียร์ (Sanjit S. Chavan, 2022).....	31
ภาพที่ 2-14 สวิตซ์เฟาเวอร์ซัพพลาย (ก.) แบบมีฝาครอบ Enclosed และ (ข.) แบบเปลือย Open frame (Thailand factomart industrail product, 2018).....	32
ภาพที่ 2-15 รายละเอียดความหมายตามโมเดลในแต่ละสแตมป์มอเตอร์ (Holding, 2019).....	36
ภาพที่ 3-1 ปริมาณชานอ้อยตั้งแต่ 1 ถึง 9 กรัมต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิลิตร...	42
ภาพที่ 3-2 ปริมาณชานอ้อย 10 กรัม ซึ่งไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพได้.....	42
ภาพที่ 3-3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS	42

ภาพที่ 3-4	ชานอ้อยระหว่างเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพด้วยวิธี Alkaline pretreatment	43
ภาพที่ 3-5	เปลือกผลไม้หลังผ่านกระบวนการปรับสภาพ (ก.) เปลือกแตงโม (ข.) เปลือกสับปะรด..	44
ภาพที่ 3-6	การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน	45
ภาพที่ 3-7	การสกัดหาปริมาณลิกนินในชานอ้อย	46
ภาพที่ 3-8	ลักษณะการหุ้มฉนวนชนิดโพลีเอทิลีนในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ	47
ภาพที่ 3-9	ขนาดแผ่นงานหมุนใส่หลอดเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ.....	49
ภาพที่ 3-10	สัดส่วนและขนาดของกรวยสำหรับใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง	50
ภาพที่ 3-11	การออกแบบขนาดและสัดส่วนเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ	51
ภาพที่ 3-12	ระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	53
ภาพที่ 3-13	อุปกรณ์ภายในกล่องควบคุมและการสั่งการระบบเก็บตัวอย่างอัตโนมัติและควบคุม สถานะไร้ออกซิเจน	54
ภาพที่ 3-14	อุปกรณ์ที่ได้รับกระแสไฟจากสวิตชิงเพาเวอร์ซัพพลายในกล่องควบคุม	55
ภาพที่ 3-15	อุปกรณ์ที่เชื่อมต่อกับบอร์ด Arduino และบอร์ด ESP-32.....	57
ภาพที่ 3-16	ลักษณะการส่งข้อมูลจากบอร์ด Arduino และ บอร์ด ESP-32 ไปยัง NETPIE2020, Google sheets และ Line notify	58
ภาพที่ 3-17	การเชื่อมต่อ Thermocouple เข้ากับโมดูล MAX6675 และบอร์ด Arduino	59
ภาพที่ 3-18	ตัวอย่างชุดคำสั่งการกำหนดพินในโปรแกรม Arduino IDE.....	60
ภาพที่ 3-19	การเชื่อมต่อเซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจนกับบอร์ด Arduino	60
ภาพที่ 3-20	ตัวอย่างชุดคำสั่งการทำงานของเซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	61
ภาพที่ 3-21	ตัวอย่างชุดคำสั่งสำหรับสอบเทียบเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิ.....	62
ภาพที่ 3-22	เซ็นเซอร์วัดก๊าซออกซิเจน DF-Robot Gravity I ² C ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	62
ภาพที่ 3-23	วิธีการสอบเทียบออกซิเจนเซ็นเซอร์.....	62
ภาพที่ 3-24	การตั้งค่า Trigger บน IFTTT ด้วยเงื่อนไข If และ Then (ขั้นตอนที่ 1).....	67
ภาพที่ 3-25	การตั้งค่า Webhook เพื่อรับข้อมูลบน IFTTT (ขั้นตอนที่ 2)	67

ภาพที่ 3-26 การตั้งค่ารูปแบบ Google sheet บน IFTTT (ขั้นตอนที่ 3).....	68
ภาพที่ 3-27 การสั่งงาน เปิด หรือ ปิด การรับส่งข้อมูล บน IFTTT (ขั้นตอนที่ 4)	69
ภาพที่ 3-28 รหัสสำหรับใช้ในการส่งข้อมูลผ่าน IFTTT (ขั้นตอนที่ 5).....	69
ภาพที่ 3-29 Google sheet ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากการ Trigger โดยผู้ใช้งาน (ขั้นตอนที่ 6).....	70
ภาพที่ 3-30 ตัวอย่างชุดคำสั่งสำหรับการส่งข้อมูลไปบันทึกไว้ยัง Google sheets.....	71
ภาพที่ 3-31 หน้าบัญชี Line notify สำหรับการออก Token (ขั้นตอนที่ 1).....	72
ภาพที่ 3-32 ขั้นตอนการขอออก token ของ Line notify (ขั้นตอนที่ 2)	72
ภาพที่ 3-33 การเลือกบัญชีที่ต้องการส่งข้อความถึง และการกำหนดข้อความที่ต้องการแสดงเมื่อเกิดการแจ้งเตือนผ่าน Line notify (ขั้นตอนที่ 3)	73
ภาพที่ 3-34 การเชื่อมต่อระหว่างระบบ Line notify และข้อมูลต้นทาง (ขั้นตอนที่ 4)	74
ภาพที่ 3-35 ตัวอย่างชุดคำสั่งสำหรับการส่งแจ้งเตือนการเก็บตัวอย่างผ่านทาง line notify	74
ภาพที่ 3-36 หน้าเว็บไซต์ NETPIE2020 (ขั้นตอนที่ 1).....	75
ภาพที่ 3-37 การเลือกชนิดข้อมูลที่ต้องการแสดงใน Dashboard ของ NETPIE2020 (ขั้นตอนที่ 2) 76	
ภาพที่ 3-38 การตั้งค่าหน้าวิดเจ็ตของ NETPIE2020 (ขั้นตอนที่ 3).....	77
ภาพที่ 3-39 วิดเจ็ตแสดงสถานะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ และระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติ (ขั้นตอนที่ 4).....	78
ภาพที่ 3-40 ตัวอย่างชุดคำสั่งสำหรับการเชื่อมต่อและส่งข้อมูลไปยัง NETPIE2020 (ขั้นตอนที่ 5) ..	78
ภาพที่ 3-41 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย <i>P. bifementans</i> ด้วยเทคนิค Streak plate	81
ภาพที่ 3-42 แบคทีเรีย <i>P. bifementans</i> ใน Cooked meat medium broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร	83
ภาพที่ 3-43 อาหารเพื่อการหมัก PCM ปริมาตร 450 มิลลิลิตร	84
ภาพที่ 3-44 การหมักเพื่อผลิตบิวทานอลปริมาตร 500 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่	84
ภาพที่ 3-45 ภาพรวมของกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร ทำงานร่วมกับเครื่องเก็บตัวอย่างและระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจน	86

ภาพที่ 4-1 ลักษณะชานอ้อย (ก) ก่อนปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ (ข) หลังปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์	90
ภาพที่ 4-2 ลักษณะชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสรอบที่ 1 ถึง รอบที่ 6	91
ภาพที่ 4-3 ผลได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสชานอ้อยทั้ง 6 ครั้ง.....	92
ภาพที่ 4-4 การคำนวณสมดุลมวลสารในกระบวนการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสชานอ้อย	92
ภาพที่ 4-5 ลักษณะโดยรวมของเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติที่สร้างขึ้นเปรียบเทียบกับที่ถูกต้องแบบ	94
ภาพที่ 4-6 สัดส่วนเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติจากการใช้เทคโนโลยี Light detection and ranging (LiDAR) วัดจากเครื่องเก็บตัวอย่างจริง (ก) สัดส่วนและอุปกรณ์ด้านบนของเครื่อง (ข) ความสูงของขาตั้งและชุดทำความเย็นด้านข้าง (ค) สัดส่วนและอุปกรณ์ด้านในเครื่อง	96
ภาพที่ 4-7 การทดสอบความสามารถในการชะลอการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ก) ก่อนนำตัวอย่างไปเก็บรักษายังตู้ควบคุมอุณหภูมิ (ข) หลังนำตัวอย่างเก็บรักษาไว้ยังตู้ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสีจากอาหาร PCM	97
ภาพที่ 4-8 เครื่องพิมพ์ 3 มิติซึ่งใช้ขึ้นรูปกรวยใส่หลอดเก็บตัวอย่าง	98
ภาพที่ 4-9 ขนาดสัดส่วนจริงของกรวยสำหรับใส่หลอดเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ ..	98
ภาพที่ 4-10 อุปกรณ์ในกล่องควบคุมเครื่องเก็บตัวอย่างและระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน	99
ภาพที่ 4-11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง ความเข้มข้นของน้ำตาลจากชานอ้อย และเวลาการหมักในขวดรูปชมพู่	103
ภาพที่ 4-12 การเปรียบเทียบสารผลิตภัณฑ์อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยในกระบวนการหมัก	105
ภาพที่ 4-13 ผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อย	106
ภาพที่ 4-14 ลักษณะสัณฐานโดยคร่าวหลังย้อมสีด้วยเทคนิค Gram stain แบคทีเรียทุกรหัสหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักด้วยน้ำตาลจากชานอ้อย.....	107
ภาพที่ 4-15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลชานอ้อยที่ถูกใช้ไป ความเข้มข้นของบิวทานอล และผลรวมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก	109

ภาพที่ 4-16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง ความเข้มข้นของน้ำตาลจากเปลือก สับปะรด และเวลาการหมักในขวดรูปชมพู่.....	111
ภาพที่ 4-17 การเปรียบเทียบสารผลิตภัณฑ์อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จาก เปลือกสับปะรดในกระบวนการหมัก.....	113
ภาพที่ 4-18 ผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับปะรด	114
ภาพที่ 4-19 ลักษณะสัญญาณโดยคร่าวหลังย้อมสีด้วยเทคนิค Gram stain แบคทีเรียทุรหัตสหลังเสร็จ สิ้นกระบวนการหมักด้วยน้ำตาลจากเปลือกสับปะรด.....	115
ภาพที่ 4-20 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลจากเปลือกสับปะรดที่ถูกใช้ไป ความ เข้มข้นของบิวทานอล และผลรวมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก	117
ภาพที่ 4-21 การเปรียบเทียบผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแดงโม	119
ภาพที่ 4-22 การเปรียบเทียบสารผลิตภัณฑ์อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จาก เปลือกแดงโมในกระบวนการหมัก	121
ภาพที่ 4-23 ผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแดงโม.....	122
ภาพที่ 4-24 ลักษณะสัญญาณโดยคร่าวหลังย้อมสีด้วยเทคนิคย้อมสีแบคทีเรียของแบคทีเรียทุรหัตส หลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักด้วยน้ำตาลจากเปลือกแดงโม.....	123
ภาพที่ 4-25 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลจากเปลือกแดงโมที่ถูกใช้ไป ความเข้มข้น ของบิวทานอล และผลรวมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก.....	124
ภาพที่ 4-26 ลักษณะอาหารเพื่อการหมัก PCM (ก) ก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 0 (ข) หลังการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 120.....	126
ภาพที่ 4-27 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายบิวทานอล จากแบคทีเรียรหัส 45-20 จากแหล่ง คาร์บอนที่แตกต่างกันในขวดรูปชมพู่.....	128
ภาพที่ 4-28 กระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร	129
ภาพที่ 4-29 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิภายในถังต้มน้ำร้อนและอุณหภูมิในชั้นแจ๊คเก็ตของถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร.....	130
ภาพที่ 4-30 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด – ด่างของสารละลายภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	131

ภาพที่ 4-31 แบคทีเรีย <i>P. bifementans</i> (ก) ชั่วโมงที่ 0 ของกระบวนการหมัก (ข) หลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก	132
ภาพที่ 4-32 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และค่าดูดกลืนแสงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 10 ลิตร	137
ภาพที่ 4-33 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์และเวลาในการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร	137
ภาพที่ 4-34 ผลการสร้าง sheets ผ่าน platform IFTTT เพื่อบันทึกค่าออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	140
ภาพที่ 4-35 ผลการควบคุมปริมาณก๊าซออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	140
ภาพที่ 4-36 ผลการทำงานของชุดทำความเย็นในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ	141
ภาพที่ 4-37 ผลการแจ้งเตือนผู้ใช้งานถึงจำนวนการเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติผ่าน Line notify	142
ภาพที่ ก-1 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	154
ภาพที่ ก-2 กราฟมาตรฐานสารละลายอะซิโตน	154
ภาพที่ ก-3 กราฟมาตรฐานสารละลายบิวทานอล	155
ภาพที่ ก-4 กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอล	155
ภาพที่ ก-5 การส่งแจ้งเตือนการเก็บตัวอย่างผ่าน Line notify	156
ภาพที่ ก-6 ขนาดกรวยจากโปรแกรม AutoCAD (ก) เส้นรอบวงด้านในปากกรวย (ข) เส้นรอบวงด้านนอกปากกรวย (ค) เส้นรอบวงด้านในฐานกรวย (ง) เส้นรอบวงด้านนอกฐานกรวย	157
ภาพที่ ก-7 ตัวอย่างการปรับสภาพชานอ้อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 M	158
ภาพที่ ก-8 การสอบเทียบแลตทดสอบการตรวจวัดก๊าซออกซิเจนของเซ็นเซอร์	158
ภาพที่ ก-9 ผลการตรวจแบคทีเรียด้วยเทคนิค เทคนิคมาลดี-ทอพ เอ็มเอส	173

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

อุตสาหกรรมแบคทีเรียเพลิงชีวภาพและเคมีชีวภาพ (Biofuels and biochemicals) ถูกคาดการณ์ว่าจะเติบโตอย่างรวดเร็วในอนาคต (การนิคมอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย, 2559) ความต้องการด้านแบคทีเรียเพลิงชีวภาพในแต่ละภูมิภาคทั่วโลกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยตลาดไบโอชีวทานอลในเอเชียแปซิฟิกคิดเป็น 44.5% ของตลาดไบโอชีวทานอลทั้งโลก เติบโตเฉลี่ย 7.7% ต่อปี (Karthick & Nanthagopal, 2021) และเนื่องจากเกิดความกังวลต่อการขาดแคลนน้ำมันแบคทีเรียเพลิงฟอสซิล (Fossil based) และปัญหาสิ่งแวดล้อมโลกที่ร้ายแรงขึ้น ข้อดีของแบคทีเรียเพลิงชีวภาพคือ ลดสาเหตุของภาวะโลกร้อน ส่งเสริมเกษตรกรให้มีการจัดการและเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งทางการเกษตร ทั้งยังเป็นการเพิ่มรายได้แก่เกษตรกร นอกจากนี้ยังถือเป็นการสนับสนุนให้เกิดการพัฒนาน้ำมันทดแทนอย่างยั่งยืน เนื่องจากแบคทีเรียเพลิงชีวภาพสามารถสร้างขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง (Mendes & Bordignon, 2020) จากของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณมากในประเทศไทยซึ่งจัดเป็นประเทศอุตสาหกรรมการเกษตร เป็นหนทางในการแก้ปัญหาความยั่งยืนและสร้างมูลค่าต่อเศรษฐกิจของประเทศได้เป็นอย่างมาก

ชานอ้อย ฟางข้าว หรือแม้แต่เศษเปลือกผลไม้ มีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ปริมาณมากและจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกว่า 23 ล้านตันต่อปี ซึ่งไม่ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ จึงสามารถนำมาปรับสภาพ (Pretreatment) และเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ใช้เป็นอาหารสำหรับแบคทีเรียจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นสารแบคทีเรียเพลิงชีวภาพที่มีมูลค่าสูงได้ (Klaithin, Glaopo, & Laoong-u-thai, 2018)

ปัจจุบันสารแบคทีเรียเพลิงชีวภาพที่น่าสนใจ ทดแทนเอทานอลที่ใช้ผสมในน้ำมันก๊าดโซลีน และให้ผลในด้านประสิทธิภาพใกล้เคียงหรือมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เอทานอลผสมในน้ำมันก๊าดโซลีน เช่น การลดการกักต้อนของเครื่องยนต์ ให้ค่าพลังงานที่สูงหรือใกล้เคียงกับการใช้ เอทานอลผสม (Zhen, Wang, & Liu, 2020) คือ บิวทานอล โดยผลิตได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียแบคทีเรียจำพวก *Clostridium spp.* และบางสายพันธุ์สามารถพบได้ในประเทศไทย แบคทีเรียแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถใช้น้ำตาลซึ่งผลิตมาจากลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นได้ (Ibrahim, Ramli, Bahrin, & Abd-Aziz, 2017)

Clostridium spp. ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ชนิดไม่ต้องการออกซิเจน (Obligate anaerobe) สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นอาหารและผลิตบิวทานอล ด้วยกระบวนการหมักทางชีวภาพ (Edwards, Suárez, & McBride, 2013) ข้อดีของการหมักทางชีวภาพภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) คือ ลดต้นทุนในด้านการออกแบบและบำรุงรักษาระบบให้ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ ทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Morris, 1983) แต่เนื่องด้วยการนำแบคทีเรียแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม จำเป็นต้องใช้แบคทีเรียแบคทีเรียจากต่างประเทศ นำเข้ามาผลิตภายในประเทศไทย ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น และจากการศึกษาพบว่า *Clostridium spp.* ที่พบได้ในประเทศไทย มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพได้เช่นเดียวกัน (Klaithin et al., 2018) และกระบวนการหมักทางชีวภาพจำเป็นต้องดำเนินการในถังปฏิกรณ์ เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะในกระบวนการหมักได้เป็นอย่างดี ซึ่งถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นแบบได้ถูกสร้างไว้แล้วจากงานวิจัยของ เอกชัย ไกลถิ่น แต่ยังคงขาดส่วนของระบบการจับเก็บตัวอย่างอัตโนมัติเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ รวมถึงต้องพัฒนาระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์เพื่อทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนที่มีประสิทธิภาพและอำนวยความสะดวกแก่ผู้ใช้งานได้มากยิ่งขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยในด้านการพัฒนากระบวนการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยแบคทีเรีย *Paraclostridium bifermentans* ร่วมกับการใช้สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการพัฒนาชุดเก็บตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยควบคุมผ่านอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง จึงเป็นการนำเอาอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่งมาประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตอบสนองนโยบายไทยแลนด์ 4.0 เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาด้านการขาดแคลนพลังงาน ทั้งยังเป็นพลังงานทางเลือกที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีความยั่งยืน เป็นการเพิ่มมูลค่าแก่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตอบรับต่อแผนพัฒนาทางเศรษฐกิจ (S-curve) ในด้านอุตสาหกรรมแบคทีเรียเพลิงชีวภาพและเคมีชีวภาพ (Biofuels and biochemicals) ตามการพัฒนาเศรษฐกิจแบบองค์รวมใน เศรษฐกิจชีวภาพ เศรษฐกิจหมุนเวียน และเศรษฐกิจสีเขียว (Bio-Circular-Green Economy; BCG Economy) ได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการพัฒนาการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยแบคทีเรีย *Paraclostridium bifermentans* ร่วมกับการใช้สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการพัฒนาชุดเก็บตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยควบคุมผ่านอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง มีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยและเปลือกผลไม้ เพื่อเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ
2. เพื่อพัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติโดยใช้งานร่วมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นแบบ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ด้วยการควบคุมหรือติดตามสถานะการหมัก ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้อย่างทันท่วงที
3. เพื่อพัฒนาระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติเพื่อใช้งานร่วมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นแบบ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับเมื่อสิ้นสุดงานวิจัยฉบับนี้ ทั้งด้านองค์ความรู้ รวมทั้งผลิตภัณฑ์อันเกิดจากงานวิจัย มีดังต่อไปนี้

1. ได้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งนำไปแทนกลูโคสในสูตรอาหารเดิม โดยผลิตจากชานอ้อยและเปลือกผลไม้ ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
2. ได้ระบบเก็บตัวอย่างอัตโนมัติและระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติ ซึ่งสามารถอำนวยความสะดวกแก่ผู้ใช้งานได้
3. ได้บิวทานอลซึ่งเป็นสารแบบที่เรียกเพลิงที่มีมูลค่าสูงและสามารถนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมแบบที่เรียกเพลิงชีวภาพและเคมีชีวภาพได้
4. ผู้ใช้งานสามารถสั่งการ หรือติดตามการทำงานของระบบเก็บตัวอย่าง และระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติผ่านแอปพลิเคชันหรือแพลตฟอร์ม NETPIE 2020 ได้

ตัวแปรที่ศึกษา

ตารางที่ 1-1 ตัวแปรที่ศึกษาในงานวิจัย

ตัวแปร	ข้อศึกษา
ตัวแปรต้น	<ol style="list-style-type: none"> ชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณขานอ้อยที่แตกต่างกันในกระบวนการไฮโดรไลซิส
ตัวแปรตาม	<ol style="list-style-type: none"> น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งได้มาจากแหล่งของวัตถุดิบที่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากกระบวนการไฮโดรไลซิสขานอ้อย ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ซึ่งได้จากกระบวนการหมัก
ตัวแปรควบคุม	<ol style="list-style-type: none"> ระยะเวลาในการหมักในสภาวะไร้ออกซิเจน 16 วัน ควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักแบบ Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) กระบวนการหมักเป็นแบบกะ (Batch fermentation) ค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 5.5 ถึง 6.5 ปริมาตรรวมในการหมักเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตบิวทานอลทั้งสิ้นจำนวน 10 ลิตร ควบคุมการหมักให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยก๊าซไนโตรเจนจากระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติ แหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารหมักความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร การควบคุมอุปกรณ์ต่าง ๆ ผ่านระบบอินเทอร์เน็ทของสรรพสิ่ง ซึ่งถูกติดตั้งเข้ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 1.5M อุณหภูมิในการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสที่ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที

ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยฉบับนี้ประกอบด้วย 3 ส่วนใหญ่ คือ กระบวนการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) จากชานอ้อยและเปลือกผลไม้ ส่วนการพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการสร้างเครื่องเก็บตัวอย่างเพื่อใช้งานร่วมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สร้างระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน และส่วนสุดท้าย คือ กระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ส่วนที่ 1 กระบวนการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ มีขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

1.1 กระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ ชานอ้อย และเปลือกผลไม้ (สับประรด และแตงโม) ด้วยวิธีการทางกลให้มีขนาดเล็กกลวง 0.2 ถึง 2 มิลลิเมตร (Sun & Cheng, 2002) จากนั้นจึงทำการแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง เพื่อทำการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์และนำไปใช้แทนแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) ในสูตรอาหารเพื่อการหมัก Phosphate-Carbonate Medium ดังนี้

ชุดที่ 1 น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อย ซึ่งจำเป็นต้องเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพด้วยวิธี Alkaline pretreatment ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยวิธี Steam hydrolysis

ชุดที่ 2 น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกผลไม้ ซึ่งไม่จำเป็นต้องเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพ แต่สามารถนำเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยวิธี Steam hydrolysis ได้เลย จากนั้นจึงนำน้ำตาลรีดิวซ์จากทั้ง 2 ชุดข้างต้น ใส่อาหารเพื่อการหมักในส่วนถัดไป

1.2 กระบวนการปรับสภาพด้วยวิธี Alkaline pretreatment โดยใช้สารละลายไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1.5M ปริมาณชานอ้อยเท่ากับ 45 กรัม ควบคุมอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนของแข็งล้างด้วยน้ำสะอาดปราศจากไอออน (Deionization water; DI water) จนค่าความเป็นกรด - ด่างเป็นกลาง และนำไปเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยวิธี Steam hydrolysis ที่สภาวะเดียวกันกับกระบวนการปรับสภาพ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการจึงนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และวิเคราะห์ปริมาณกลีซิน

ส่วนที่ 2 การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เนื่องจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นแบบได้ถูกสร้างไว้แล้วจากงานวิจัยเดิม (เอกชัย ไกลถิ่น, 2564) แต่ยังคงขาดระบบการจัดเก็บตัวอย่างอัตโนมัติเพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งในปัจจุบันการเก็บตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ ดำเนินการโดยผู้วิจัยซึ่งต้องติดตามและเก็บตัวอย่างในระยะเวลาที่กำหนดไว้ตลอดระยะเวลาการดำเนินงาน และระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์เพื่อทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนในกระบวนการเริ่มต้นการหมัก หรือในกรณีที่เกิดการรั่วไหลของก๊าซออกซิเจนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งส่งผลกระทบต่อแบคทีเรียในกระบวนการหมักบิวทานอล จึงจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้มีประสิทธิภาพและ

อำนวยความสะดวกแก่ผู้ใช้งานได้ โดยระบบทั้งสองนี้จะถูกควบคุมด้วยบอร์ด Arduino mega 2560 ผ่านระบบอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง

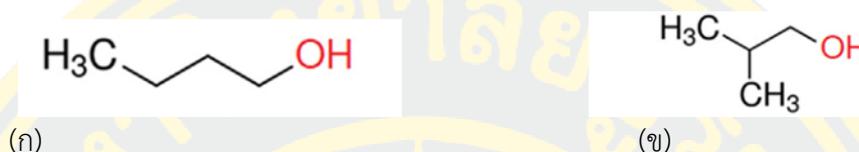
ส่วนที่ 3 กระบวนการหมัก Acetone-Butanol-Ethanol (ABE)

เพื่อผลิตบิวทานอลปริมาตรรวมทั้งสิ้น 10 ลิตร (Working volume) เป็นกระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation) มีระยะเวลาในการหมัก 16 วัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด - ต่างเท่ากับ 6.0 ถึง 6.5 อาหารในการหมักคือ Phosphate Carbonate Medium และมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลที่ได้จากชานอ้อยและเปลือกผลไม้ เพื่อควบคุมกระบวนการหมักให้อยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic) จึงต้องมีการควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยการพ่นก๊าซไนโตรเจนเข้าไปในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมัก เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก จึงทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ซึ่งได้จากกระบวนการหมักด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-FID)

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บิวทานอล



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของบิวทานอล (ก.) เอ็น-บิวทานอล (ข.) ไอโซบิวทานอล (Hachuta et al., 2022)

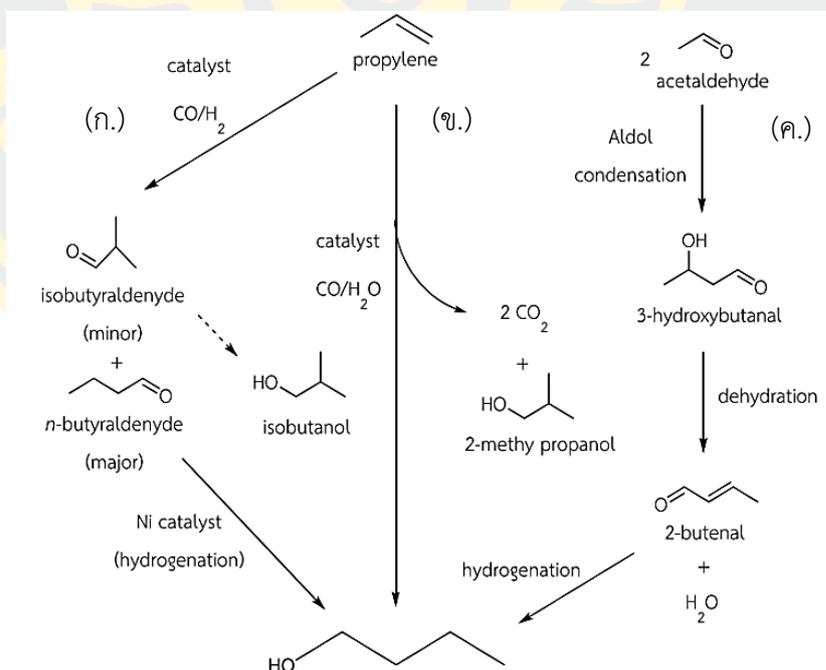
บิวทานอล (1-Butanol, n-Butanol) ดังภาพที่ 2-1 ก. มีชื่อเคมีทั่วไปว่า Butyl alcohol, NBA, Butyric alcohol, Normal primary Butyl alcohol, Methylal propane หรือสามารถเรียกชื่อตาม International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ได้ว่า Butan-1-ol ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 74.12 กรัมต่อโมล มีสูตรทางเคมี คือ C_4H_9OH และ $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-OH$ คือ สูตรโครงสร้างของบิวทานอล ลักษณะของโครงสร้างเป็นเส้นตรง ไอโซเมอร์ของ 1-บิวทานอล คือ ไอโซบิวทานอล, 2-บิวทานอล และ 3-บิวทานอล ดังภาพที่ 1 ข. สูตรทั่วไป คือ $R-OH$ มีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group ; $-OH$) ซึ่งมีสถานะเป็นแอลกอฮอล์เหลว ใส สามารถติดไฟได้ง่ายที่ 35 ถึง 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่เดียวกันเมื่ออุณหภูมิสูงมากถึง 343 ถึง 345 องศาเซลเซียส ก็สามารถลุกติดไฟได้เอง ไม่มีสี (สีใส) มีกลิ่นจำเพาะคล้ายกล้วยหอม ในขณะเดียวกันจะมีกลิ่นของแอลกอฮอล์อย่างชัดเจน (Development & Transfer, 1988) มีความสามารถในการละลายน้ำได้เล็กน้อยที่ 7.7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ มีจุดหลอมเหลวที่ลบ 89.3 องศาเซลเซียส (Mitsubishi Chemical Corporation, n.d.) ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ บิวทานอลถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น นำไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมเรซิน ใช้เป็นตัวทำละลายในเล็กเกอร์ ทินเนอร์ กาว หมึกพิมพ์ หรือแม้แต่ในอุตสาหกรรมเคลือบผิว (Surface coating) โดยในประเทศสหรัฐอเมริกามีการใช้บิวทานอลในอุตสาหกรรมนี้มากถึง 85% ของบิวทานอลที่ผลิตได้ (Ono & Erhard, 2011)

แม้ในหลากหลายอุตสาหกรรมจะนำบิวทานอลไปใช้ทั้ง อุตสาหกรรมการผลิตยาและเคมีภัณฑ์ อุตสาหกรรมการเคลือบผิว อุตสาหกรรมการผลิตรถยนต์ หรือในส่วนของอุตสาหกรรม

แบคทีเรียเพลิง ซึ่งใช้เป็นส่วนผสมของน้ำมันแบคทีเรียเพลิงก๊าซโซลีนแทนเอทานอล แต่บิวทานอลก็มีความอันตรายเช่นเดียวกัน หากมนุษย์สัมผัสกับไอระเหยโดยตรง อาจส่งผลให้ผู้ที่สัมผัสเกิดอาการง่วงซึม และเวียนศีรษะ เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง ดวงตา และระบบทางเดินหายใจ หากบิวทานอลรั่วไหลออกสู่สิ่งแวดล้อมในปริมาณมาก จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ทั้งปลา และแพลงตอน โดยบิวทานอลถูกจัดให้อยู่ในหมวดหมู่ของเหลวไวไฟหมวดหมู่ 3 ความเป็นพิษเฉียบพลัน หมวดหมู่ 4 ระคายเคืองต่อผิวหนัง หมวดหมู่ 2 และเป็นพิษต่ออวัยวะจำเพาะเจาะจงเมื่อสัมผัสครั้งเดียว และหมวดหมู่ 3 หากเกิดอัคคีภัยสารดับไฟที่เหมาะสม (Extinguishing media) ได้แก่ สเปรย์น้ำ ผงเคมีแห้ง หรือโฟมทนแอลกอฮอล์ ความสามารถในการคงอยู่หรือสลายตัวของสาร (Persistence/degradability) บิวทานอลสามารถสลายได้เองในธรรมชาติ และมีการสะสมในสิ่งมีชีวิต (Bio-accumulation) ในปริมาณที่ต่ำ (Asia Pacific Petrochemical Co., 2018)

กระบวนการผลิตบิวทานอล

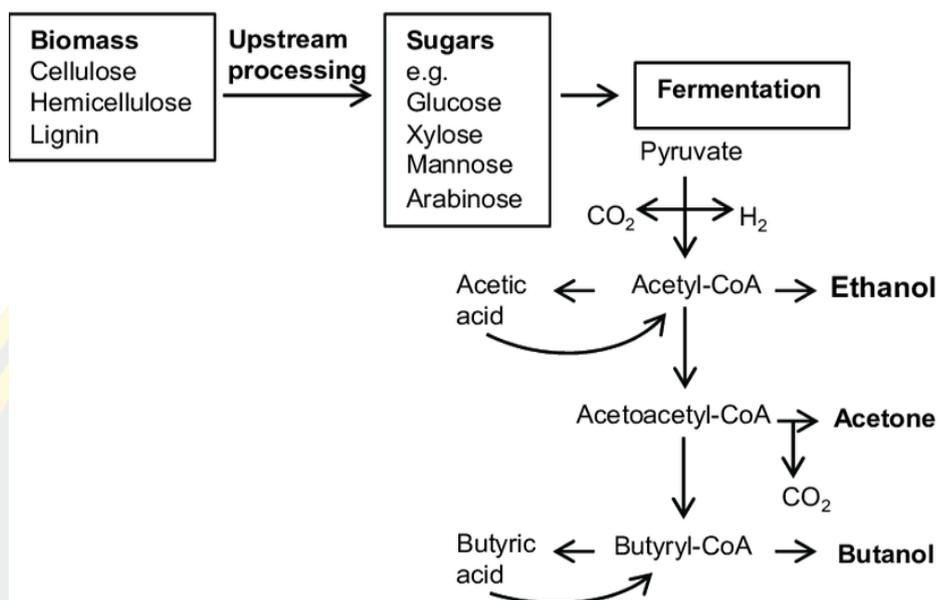
1. กระบวนการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีการทางเคมี



ภาพที่ 2-2 กระบวนการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีการทางเคมี (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2558)

บิวทานอลสามารถผลิตได้ด้วย 3 วิธี ดังภาพที่ 2-2 คือ (ก.) กระบวนการโอเอ็กซ์โอ (OXO process) เริ่มต้นด้วยโพรพรีลีน (Propylene) ซึ่งมีการเติมตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) คือ คาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) และไฮโดรเจน (H_2) เกิดเป็นสารที่เรียกว่า Isobutyraldehyde ซึ่งการเติมสารทั้งสองชนิดนี้เป็นการเติมเข้าไปเพื่อให้อะตอมของออกซิเจนเข้าไปแทนที่อะตอมของไฮโดรเจนบนโครงสร้างของโพรพรีลีน ส่งผลให้มีหมู่คาร์บอนิลเกิดขึ้น นอกจากนั้นยังสามารถเกิดเป็น n-Butyraldehyde หรือเกิดเป็นไอโซบิวทานอล ซึ่งเกิดจาก Isobutyraldehyde เกิดการจับกับอะตอมของไฮโดรเจนที่เกิดจากก๊าซไฮโดรเจนในตำแหน่งของหมู่คาร์บอนิลทำให้เกิดเป็นหมู่ไฮดรอกซิลขึ้น จากนั้นจึงเติมตัวเร่งปฏิกิริยาคือ นิกเกิล (Ni) เพื่อให้เกิดกระบวนการดีไฮโดรจีเนชันในการเติมอะตอมของไฮโดรเจนเข้าไปยังโครงสร้างของ Isobutyraldehyde และ n-Butyraldehyde จึงเป็น n-Butanol ในส่วน (ข.) เป็นกระบวนการที่สามารถผลิตบิวทานอลได้โดยตรงผ่านการผลิตบิวทานอลด้วยกระบวนการ Reppe เพียงแค่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างคาร์บอนมอนอกไซด์ โพรพรีลีน และน้ำ (H_2O) ส่งผลให้ได้ เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) โดยตรง ผลพลอยได้จากกระบวนการนี้ คือ $2CO_2$ และ 2-Methy propanol แต่ข้อเสียของกระบวนการ Reppe คือ ต้องอาศัยอุณหภูมิและความดันที่ค่อนข้างต่ำ รวมถึงต้องใช้เทคโนโลยีและเงินทุนในการผลิตสูงจึงไม่เป็นที่นิยมที่จะนำมาผลิตและใช้ในเชิงพาณิชย์หรืออุตสาหกรรม ส่วนกระบวนการผลิต (ค.) กระบวนการผลิตบิวทานอลด้วยอะเซทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้ผ่านกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation แบ่งออกได้ 3 ขั้นตอนย่อย คือ ขั้นตอน Aldol condensation เป็นกระบวนการสร้างพันธะคาร์บอน-คาร์บอน (C-C) เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลดีไฮด์และคีโตน ส่งผลให้ได้ 3-Hydroxybutanal (Acetaldol) เป็นสารประกอบอินทรีย์ ผ่านกระบวนการ Dehydration เป็นการดึงเอาน้ำออกผลที่ได้คือ ไดน้ำ และ 2-Butenal (Crotonaldehyde) และในขั้นตอนสุดท้ายเป็นขั้นตอนของการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) เพื่อให้ไปจับกับออกซิเจนส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น n-Butanol เช่นเดียวกัน

2. กระบวนการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ



ภาพที่ 2-3 กระบวนการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีการทางชีวภาพ (Niemistö, 2014)

ปี ค.ศ.1861 กระบวนการหมักโดยใช้แบคทีเรียจุลินทรีย์ ถูกค้นพบโดยนักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศสซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ หลุยส์ ปาสเตอร์ (Louis Pasteur) ต่อมาประธานาธิบดี ไคม์ วิชมานน์ (Chaim Weizmann) สามารถนำแบคทีเรียชนิดหนึ่งมาใช้ในกระบวนการหมักแบบเดียวกันกับ หลุยส์ ปาสเตอร์ ได้ ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มีชื่อว่า *Clostridium acetobutylicum* ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 สารจำพวกบิวทานอล และอะซิโตนมีความต้องการเป็นจำนวนมาก และความต้องการอะซิโตนลดลงอย่างรวดเร็วหลังสิ้นสุดยุคสงคราม ในทางตรงกันข้ามความต้องการบิวทานอลไม่ได้ลดลงไปด้วย แต่กลับเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากสามารถนำไปใช้ได้หลากหลายด้านในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยมีโรงงานหลายแห่งที่ถูกก่อตั้งขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในสหภาพโซเวียต จีน ญี่ปุ่น แอฟริกาใต้ หรือประเทศอียิปต์ (Ndaba, Chiyanzu, & Marx, 2015)

กระบวนการหมักทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียตระกูล *Clostridia* ซึ่งมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นอาหารและผลิตแอลกอฮอล์ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ โดยน้ำตาลที่ได้นั้น มาจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าวสาลี เศษเปลือกผลไม้ชนิดต่าง ๆ หากวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มีปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมจะยิ่งส่งผลให้ระยะเวลาในการหมักน้อยลงเท่านั้น เนื่องด้วยแบคทีเรีย *Clostridium spp.* สามารถนำน้ำตาลไปใช้เป็นอาหารได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม หากเป็นวัสดุที่มีส่วนประกอบของแป้งอยู่ก็จะเป็นการเพิ่มระยะเวลาในการหมักให้นานขึ้น เนื่องด้วยแบคทีเรีย

Clostridium spp. ต้องเปลี่ยนแปลงที่มีอยู่ให้กลายเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงสามารถนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้เป็นอาหาร และผลิตแอลกอฮอล์ออกมา (Dharmaraja et al., 2020) ดังภาพที่ 2-3

Paraclostridium bifermentans



ภาพที่ 2-4 สัณฐานของแบคทีเรีย *Paraclostridium bifermentans* (Vissavakawn, 2024)

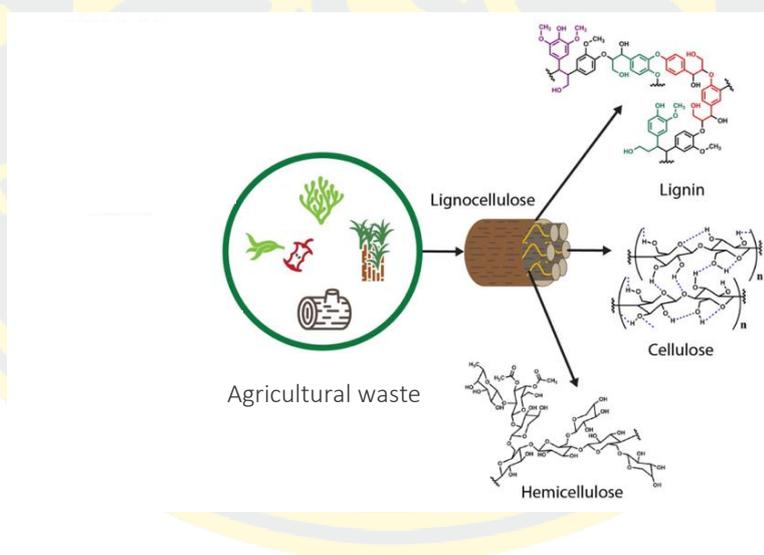
แบคทีเรีย *Paraclostridium bifermentans* (*P. bifermentans*) หรือสามารถเรียกทั่วไปอีกชื่อหนึ่งได้ว่า *Clostridium bifermentans* (*C. bifermentans*) (Kutsuna et al., 2019) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) ลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรง (Rod shape) ดังภาพที่ 2-4 จัดอยู่ในไฟลัม (Phylum) Bacillota ชั้น (Class) Clostridia ตระกูล (Order) Eubacteriales วงศ์ (Family) Clostridiaceae โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เป็นแบคทีเรียกลุ่มไม่ใช้ออกซิเจน มีความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ (Endospore) และพบแบคทีเรีย *P. bifermentans* ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายแตกต่างกันออกไป เช่น ในแหล่งน้ำที่เกิดการเน่าเสีย ตะกอนเลน หรือในดิน (Zhao et al., 2022)

Clostridium spp. ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่กินของเน่าเปื่อย เช่น ซากพืช ซากสัตว์ หรืออินทรีย์วัตถุอื่นใดในดินที่กำลังเน่าเปื่อยเป็นอาหาร (Saprophytes) ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในดินหรือแหล่งน้ำเน่าเสีย ข้อดีของการย่อยสลายสิ่งที่เน่าเปื่อยของ *Clostridium spp.* คือทำให้ได้ฮิวมัส นอกเหนือจากการช่วยสร้างฮิวมัส *Clostridium spp.* ยังมีความสามารถใน

การตรึงไนโตรเจนได้บางส่วนในดินอีกด้วย (Lawson & Rainey, 2016) ซึ่งมีความสำคัญในดินและระบบนิเวศเป็นอย่างมาก เนื่องจากดินฮิวมัสเป็นอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ ช่วยกักเก็บธาตุอาหารพืช เป็นต้น (Makhinova & Makhinov, 2020)

การนำแบคทีเรีย *Clostridium spp.* ไปใช้ประโยชน์ โดยส่วนใหญ่เป็นไปในกระบวนการหมักแบบ ABE ในอุตสาหกรรมเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ เนื่องจาก *Clostridium spp.* มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นอาหารและสร้างสารผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์ออกมา (Y. Du, Zou, Zhang, Ye, & Yang, 2020) อีกนัยหนึ่งแบคทีเรีย *Clostridium spp.* บางสายพันธุ์มีความอันตรายเช่นกัน เนื่องจากหากเข้าสู่ลำไส้ของมนุษย์มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Food poisoning) ผู้ที่รับประทานอาหารซึ่งปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดนี้จะมีอาการท้องร่วงภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง ถึง 22 ชั่วโมง แต่จะไม่มีอาการอาเจียนแต่อย่างใด (Shinha & Hadi, 2015)

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Agricultural waste)



ภาพที่ 2-5 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Lucas et al., 2021)

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือของเสียทางการเกษตรซึ่งเกิดจากการดำเนินการใด ๆ ทั้งสิ้นของการทำการเกษตร รวมไปถึงมูลสัตว์ และของเสียอื่นจากฟาร์ม วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ มีส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลส ดังภาพที่ 2-5 อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งลิกโนเซลลูโลสหมายถึง ซิวมวลอินทรีย์ มีองค์ประกอบเป็น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ส่วนมากพบในผนังเซลล์พืช และมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น ชานอ้อย มีส่วนประกอบ

ของเซลลูโลส 22% ถึง 32% เฮมิเซลลูโลส 22% ถึง 32 % และลิกนิน 17% ถึง 32% ตามลำดับ ส่วนฟางข้าว (Rice straw) มีส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน อยู่ที่ 32.10%, 24.0%, และ 18.0% ตามลำดับ

กระบวนการปรับสภาพสำหรับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีส่วนประกอบของเซลลูโลส อยู่สูง สามารถทำได้ 5 วิธีหลัก คือ

1. กระบวนการปรับสภาพทางกล (Mechanical pretreatment) เป็นการปรับสภาพของวัสดุนั้น ๆ ด้วยการทำให้มีขนาดเล็กลงด้วยการหั่น บด สับ หรือทุบ การปรับสภาพด้วยวิธีนี้เป็น การเพิ่มพื้นที่ผิวให้เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสถูกย่อยสลายได้ง่ายเมื่อเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิส

2. กระบวนการปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment) เป็นการปรับสภาพด้วยการเพิ่มอุณหภูมิที่ 826.85 องศาเซลเซียส วิธีการปรับสภาพทางกายภาพที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ Thermogravimetric treatment หรือใช้การแผ่รังสีด้วยคลื่นไมโครเวฟ

3. กระบวนการปรับสภาพทางเคมีกายภาพ (Physicochemical pretreatment) วิธีการนี้เป็นการใช้ 2 วิธีการร่วมกันคือวิธีการทางเคมีและทางกายภาพ ยกตัวอย่าง เช่น Steam explosion หรือ Sulfur dioxide explosion ใช้อุณหภูมิที่ตั้งแต่ 160 ถึง 260 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิ 0.69 ถึง 4.83 เมกะปาสคาล ที่มีไอน้ำอิ่มตัวเป็นระยะเวลาหลายวินาทีถึง 2 หรือ 3 นาที ก่อนถูกปรับความดันให้กลับมาสู่ความดันปกติ ซึ่งมีการเติมโซเดียมคาร์บอเนตในกระบวนการด้วย

4. กระบวนการปรับสภาพทางเคมี (Chemical pretreatment) วิธีการนี้ใช้ตัวออกซิไดซ์เป็นกรด ต่าง หรือเกลือ ซึ่งสามารถดำเนินการได้ในความดันและอุณหภูมิปกติ ยกตัวอย่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) กระบวนการปรับสภาพทางเคมีด้วยกรดเข้มข้นมีข้อดีคือ ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลจากเฮมิเซลลูโลสในปริมาณที่สูง และผลพลอยได้ในกระบวนการนี้สามารถละลายสิ่งเจือปนจำพวกโลหะหนักซึ่งอาจติดมากับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้หลุดออกไปได้ (Mosier et al., 2005) แต่ก็มีข้อเสียคือ มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูงอีกทั้งสิ่งที่เหลือจากกระบวนการนี้ยังถือว่ามีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

5. กระบวนการปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological pretreatment) การปรับสภาพด้วยวิธีนี้ต้องใช้จุลินทรีย์ในกระบวนการปรับสภาพ รวมถึงอาศัยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ถือว่าต้องใช้เวลาในการปรับสภาพค่อนข้างนาน

กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis process)

กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis reaction) หรือเรียกอีกชื่อว่า แซ็กคาริฟิเคชัน (Saccharification) มาจากคำในภาษากรีก 2 คำรวมเข้าด้วยกัน คือ ไฮโดร (Hydro-) มีความหมาย

ว่า น้ำ และคำว่า ไลซิส (-lysis) หมายถึง การสลายตัว เมื่อรวมกันคำว่า ไฮโดรไลซิส จึงมีความหมายว่า กระบวนการสลายตัวด้วยน้ำ ในกระบวนการไฮโดรไลซิส โมเลกุลของน้ำจะเข้าไปจับกับโมเลกุลของสารตั้งต้น (Substance) ซึ่งจะได้รับไอออนบวกของไฮโดรเจน (H^+) ในขณะเดียวกันอีกหนึ่งโมเลกุลของน้ำจะเข้าไปจับกับโมเลกุลของสารตั้งต้นกลายเป็นหมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) ซึ่งกระบวนการไฮโดรไลซิสจะทำเพื่อเป็นการสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ให้ได้โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตออกเป็นโมเลกุลของน้ำตาล หรือเมื่อนำซูโครส (Sucrose) ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส ผลที่ได้คือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) และน้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) (Sarker et al., 2021) ซึ่งกระบวนการไฮโดรไลซิส สามารถทำได้ดังนี้

1. การไฮโดรไลซิสด้วยด่าง (Alkaline peroxide hydrolysis: AlkH) กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยด่างโดยส่วนใหญ่ใช้สารเคมีจำพวก แคลเซียมออกไซด์ (CaO), แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$), โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) หรือโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ซึ่งถือได้ว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินและหมู่อะซิติล (Acetyl group) อีกทั้งกระบวนการการไฮโดรไลซิสด้วยด่างเหมาะสมสำหรับพืชประเภทล้มลุก (Herbaceous crops) หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมากกว่าเศษชีวมวลจำพวกไม้เนื่องจากส่วนมากเศษชีวมวลจำพวกไม้มีส่วนประกอบของลิกนินเป็นจำนวนมาก หลักการทำงานของกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง คือ สารละลายด่าง เกิดกระบวนการแตกตัวเกิดเป็นไอออนของไฮดรอกซิล (OH^-) ไปตัดพันธะไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) ในตำแหน่งระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ที่เชื่อมระหว่างสายของเซลลูโลสเข้าด้วยกัน ส่งผลให้สายเซลลูโลสแต่ละสายแยกออกจากกัน ได้เซลลูโลสสายเดี่ยวเรียงต่อกันเป็นสายยาว จากนั้นจึงตัดที่ตำแหน่ง Ether bridge ของเซลลูโลสสายเดี่ยว ในท้ายที่สุดส่งผลให้ได้เป็นโมเลกุลเดี่ยว (Monomer) ของน้ำตาลกลูโคส (Devi, Dhaka, & Singh, 2016)

2. การไฮโดรไลซิสด้วยกรด (Acidic hydrolysis: Ach) ในกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยวิธีนี้สามารถอธิบายได้โดยเกี่ยวข้องกับทฤษฎีของเบรินสเตด-ลาวรี (Brønsted-Lowry acid) ซึ่งกล่าวไว้ว่า กรดมีคุณสมบัติในการให้โปรตอน (Proton donor) และเบสมีคุณสมบัติในการรับโปรตอน (Proton acceptor) ซึ่งมาจากกรด (Y. Wang et al., 2020) เช่นเดียวกัน เมื่อเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดอะซิติค (CH_3COOH) และมีน้ำซึ่งเติมเข้าสู่กระบวนการในสมการที่มีทิศทางไปข้างหน้า น้ำจะกลายเป็นตัวรับโปรตอน (H^+) ซึ่งเรียกว่า เบสเบรินสเตด (Brønsted Base) โดยโปรตอนที่ได้นั้นได้มาจากกรดอะซิติค ตรงกับทฤษฎีของเบรินสเตด-ลาวรี และในปฏิกิริยาย้อนกลับอะซิเตทไอออน (CH_3COO^-) ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิส จะหายไปเป็นเบสเบรินสเตดเนื่องด้วยรับโปรตอนมาจากไฮโดรเนียมไอออน (H_3O^+) ซึ่งเป็นกรดเบรินสเตด (William, 2016) หรือโดยปกติการไฮโดรไลซิสด้วยกรดจะนิยมใช้กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) หรือกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เพื่อสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (Branco, Serafim, & Xavier, 2018)

3. การไฮโดรไลซิสด้วยเกลือ (Salt hydrolysis: SaH) สามารถทำได้เช่นกัน แต่ไม่ได้รับความนิยมนักทั้งในอดีตและปัจจุบัน เช่น เมื่อละลายโซเดียมอะซิเตท ($C_2H_3NaO_2$) ในน้ำจะทำให้เกิดโซเดียม (Na^+) ซึ่งมีประจุบวก และอะซิเตทซึ่งมีประจุลบ โดยอะซิเตทจะไปรวมตัวกับไฮโดรเจน และได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดอะซิติก (Sen Gupta, 2017)

4. การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis: EnzH) กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยวิธีเช่นนี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงในการดำเนินการในแต่ละครั้ง ดังนั้นโดยส่วนมากจึงนิยมใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหารที่มีมูลค่า เช่น การผลิตนมพร่องมันเนย (Low fat milk) ข้อดีคือ สามารถดำเนินการได้ภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 4.5 ถึง 5.5 และใช้อุณหภูมิเพียง 50 ถึง 60 องศาเซลเซียสเท่านั้น แต่ข้อเสียของการใช้เอนไซม์ในกระบวนการไฮโดรไลซิสคือ เอนไซม์เองมีราคาค่อนข้างสูง ส่วนมากจึงถูกนำไปใช้เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า (Branco et al., 2018) เช่น การสลายโปรตีนซึ่งจัดอยู่ในรูปของพอลิเพปไทด์ (Polypeptide) ให้กลายเป็นกรดอะมิโนด้วยการเติมโปรตีเอส (Proteases) ลงในกระบวนการ

ปัจจัยที่มีต่อการผลิตชีวภาพด้วยแบคทีเรีย *P. bif fermentans*

กระบวนการผลิตชีวภาพ มีหลากหลายปัจจัยที่เป็นส่วนสำคัญในการผลิต ซึ่งล้วนแล้วแต่ส่งผลต่อผลผลิตรวมในกระบวนการหมักทั้งสิ้น ดังต่อไปนี้

1. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ในกระบวนการหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนถือว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากเนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่าง จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการทำงานของเอนไซม์ของแบคทีเรีย อีกทั้งแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มก็มีความสามารถในการอาศัยหรือเจริญเติบโตอยู่ในแต่ละช่วงค่าความเป็นกรด - ด่างที่แตกต่างกันออกไป (Suranane, 2018) ในระยะแรกเรียกว่า ช่วงของการสร้างกรด (Acidogenesis phase) แบคทีเรียจะสร้างกรดออกมาเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์ Butanol dehydrogenase (Klaithin et al., 2018) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตชีวภาพทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องมีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเพื่อให้การทำงานของเอนไซม์ Butanol dehydrogenase มีประสิทธิภาพ เหมาะสมต่อการทำงานตลอดกระบวนการหมัก (Wetzel & McBride, 2020)

2. อุณหภูมิ (Temperature)

แบคทีเรีย *Clostridium spp.* สามารถพบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ในตะกอนเลน หรือพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในดินหรือแหล่งน้ำที่เน่าเสียส่งผลให้ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียตระกูล *Clostridium spp.* คือระหว่าง 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส

(Suranane, 2018) ช่วงอุณหภูมิดังกล่าวนี้เป็นอุณหภูมิปกติทั่วไปในธรรมชาติหรือแม้แต่ในร่างกายมนุษย์เอง โดยแบคทีเรีย *Clostridium spp.* สายพันธุ์ดั้งเดิมจะมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้ดีมากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งหากนำแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมไปทำการกลายพันธุ์ อาจส่งผลให้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสไม่ใช่ช่วงอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการผลิตบิวทานอลก็เป็นได้ และทั้งนี้ทั้งนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของพันธุกรรมของแบคทีเรียที่แตกต่างกันออกไป เช่น *C. saccharoperbutylacetonicum* มีความสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุดที่ 12 มิลลิกรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Loyarkat, Cheirsilp, & Umsakul, 2013)

3. ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก (Concentration of substrate)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงสารอาหาร (Metabolism) ของแบคทีเรียแบคทีเรียเพื่อนำไปผลิตเป็นสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นในกระบวนการหมักด้วยเช่นเดียวกัน เช่น หากสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเป็นน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง (160 กรัมต่อลิตร) จะส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรีย *C. beijerinckii* BA101 (Ezeji, Qureshi, & Blaschek, 2003) หรือแม้แตความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำกว่า 20 กรัมต่อลิตร จะส่งผลให้ในกระบวนการหมักแบบ ABE สามารถพบกรดในผลิตภัณฑ์ได้เล็กน้อย โดยความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมกระบวนการผลิตบิวทานอลของแบคทีเรียให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Lee et al., 2008)

4. ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ (Solvent concentration)

ในกระบวนการหมักแบบ ABE ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งถือว่ามีความเป็นพิษกับเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมัก เช่น ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ 1.1% (120 มิลลิโมลาร์) อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* จะลดลงมากถึง 50% และหากความเข้มข้นของบิวทานอลเพิ่มสูงขึ้นถึง 1.5% (165 มิลลิโมลาร์) อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Baer, Blaschek, & Smith, 1987) ถึงอย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ของแบคทีเรียตระกูล *Clostridium spp.* ให้มีความทนทานต่อบิวทานอลมากยิ่งขึ้น

5. ออกซิเจน (Oxygen)

เนื่องด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium spp.* ถูกจัดให้เป็นแบคทีเรียชนิดไม่ต้องการออกซิเจน (Obligate anaerobe) เมื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักหากแบคทีเรียชนิดนี้สัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณเพียงเล็กน้อยเป็นระยะเวลาอันอาจส่งผลต่อทำให้กระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ของแบคทีเรียลดลงไปจนถึงขั้นหยุดการทำงานและแบคทีเรียตายได้ในที่สุด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการจนถึงขั้นตอนการสิ้นสุดกระบวนการหมัก หาก

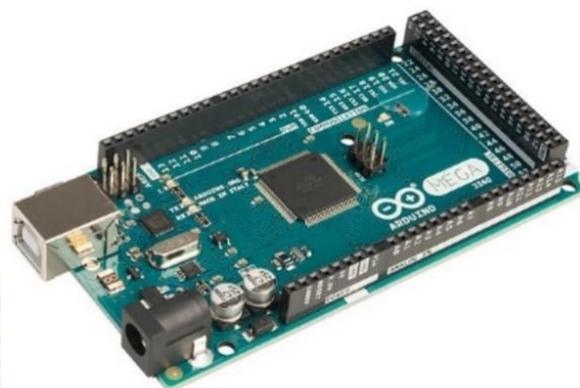
พบว่าเมื่อออกซิเจนรั่วไหลเข้าสู่กระบวนการหมักจำเป็นต้องทำการไล่ออกซิเจนออกจากระบบอย่างรวดเร็วด้วยก๊าซชนิดอื่น เช่น ก๊าซไนโตรเจน (Klaithin et al., 2018)

Arduino

Arduino เป็นชื่อโครงการหนึ่งซึ่งเริ่มดำเนินการมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 2005 ภายใต้ชื่อบริษัท Arduino LLC และมีบริษัท Arduino SRL เป็นผู้ผลิตบอร์ดประกอบ เพื่อจำหน่ายอย่างเป็นทางการโดยทั่วไป หากต้องการให้การทำงานของ Arduino สมบูรณ์แบบต้องประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ฮาร์ดแวร์ (บอร์ด Arduino Mega 2560) และซอฟต์แวร์ (โปรแกรม Arduino IDE) ดังนี้

1. บอร์ด Arduino Mega 2560

บอร์ด Arduino มีต้นกำเนิดมาจากประเทศอิตาลี โดยชื่อ Arduino อ่านว่า อา-ดู-อิ-โน้ หรือ อา-ดู-ย-โน้ ในภาษาอิตาลีมีความหมายว่า เพื่อนแท้ และบอร์ดเองก็มีหลากหลายรุ่น ซึ่งในแต่ละรุ่นมีราคาที่แตกต่างกันออกไปตามแต่คุณสมบัติของตัวบอร์ด เช่น Arduino mega 2560 ดังภาพที่ 2-6 มีความสามารถในด้านการนำมาใช้ควบคุมหุ่นยนต์ที่มีความซับซ้อนของชุดคำสั่งในระดับหนึ่ง แต่ไม่มากนัก หรือใช้ในงานร่วมกับเซ็นเซอร์พื้นฐานหลากหลายชนิดพร้อมกัน เช่น วัดอุณหภูมิ วัดระยะทาง ความชื้น ความเข้มของแสง มีความสามารถในการควบคุมอุปกรณ์มากกว่า 1 ชนิดพร้อมกัน หรือแม้แต่สามารถนำไปใช้งานด้าน 3D printing และบอร์ด Arduino mega 2560 มีหน่วยประมวลผลชื่อว่า ATmega2560 จัดว่าเป็นไมโครคอนโทรลเลอร์ (Microcontroller) ชนิดหนึ่งในตระกูล AVR ตัวบอร์ด Arduino mega 2560 มีลักษณะเป็นแบบเปิด (open source) จึงไม่มีลิขสิทธิ์เข้ามาเกี่ยวข้องแต่อย่างใด สามารถนำไปใช้งานได้ในทุกด้าน เนื่องจากความสามารถของบอร์ดมีความซับซ้อนกว่าบอร์ด Arduino UNO R3 ดังนั้น ผู้ใช้งานบอร์ด Arduino mega 2560 จึงจำเป็นต้องมีความรู้ด้านองค์ประกอบภายในบอร์ดระดับปานกลาง แต่ผู้ใช้อีกยังสามารถเลือกเสียบต่อช่องสัญญาณได้ด้วยตนเองจากขา I/O ที่อยู่บนตัวบอร์ด หรือจะนำไปต่อกับบอร์ดเสริม (Arduino shield) หลากหลายประเภท ยกตัวอย่าง เช่น Arduino relay shield หรือ Arduino GPRS shield แล้วทำการเขียนชุดคำสั่งเพื่อพัฒนาต่อยอดโปรแกรมนั้นได้โดยตรง (Kondaveeti, Kumaravelu, Vanambathina, Mathe, & Vappangi, 2021) ซึ่งข้อมูลจำเพาะของบอร์ด Arduino mega 2560 ดังตารางที่ 2-1



ภาพที่ 2-6 บอร์ด Arduino Mega 2560 (Rapid Electronics Limited, 2012)

ตารางที่ 2-1 ข้อมูลจำเพาะของบอร์ด Arduino mega 2560 (Vidal-Pardo & Pindado, 2018)

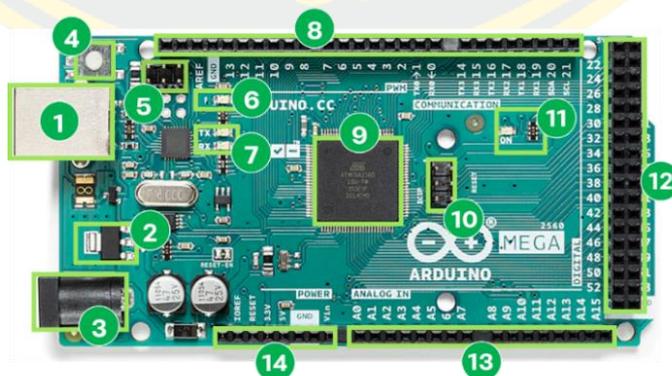
รายละเอียด	ข้อมูลจำเพาะ
ไมโครคอนโทรลเลอร์	ATmega2560
แหล่งจ่ายไฟฟ้า	5 โวลต์
รองรับการจ่ายแรงดันไฟฟ้าที่แนะนำ	7 ถึง 12 โวลต์
รองรับการจ่ายแรงดันไฟฟ้าที่จำกัด	6 ถึง 20 โวลต์
Digital I/O pins	54 ขา (output แบบ PWM 15 port)
Analogue Input port	16 ขา
DC Current per I/O pin	20 มิลลิแอมป์
DC Current for 3.3V pin	50 มิลลิแอมป์
Flash Memory	256 กิโลไบต์ และ 8 กิโลไบต์ สำหรับ อัปโหลดข้อมูลแบบความเร็วสูง
SRAM	8 กิโลไบต์
EEPROM	4 กิโลไบต์
Clock Speed	16 เมกะเฮิร์ตซ์
Size	53.3x101.52 มิลลิเมตร
LED Built-in	13

เนื่องจากบอร์ด Arduino mega 2560 มีขนาดปานกลาง ราคาไม่แพงมากนัก มีช่องเชื่อมต่อจำนวนมาก และหาซื้อได้ค่อนข้างง่าย ทั้งยังถูกออกแบบมาให้สะดวกแก่การใช้งาน รองรับ

แพลตฟอร์มระบบปฏิบัติการทั้งในส่วนองระบบปฏิบัติการ Windows, Macintosh OSX และ Linux โดยตัวอย่างของการนำเอา Arduino ไปประยุกต์หลากหลายด้าน เช่น ด้านอำนวยความสะดวก นำไปประยุกต์ใช้เพื่อบันทึกข้อมูลดิจิทัลมิเตอร์ไฟฟ้า ควบคุมเครื่องใช้ไฟฟ้าภายในบ้านผ่านอินเทอร์เน็ตทั้งการสั่งให้เปิด-ปิดไฟภายในบ้านหรือร้วบ้านแบบอัตโนมัติ ด้านความปลอดภัยสามารถนำไปใช้งานร่วมกับเซ็นเซอร์ตรวจจับการรั่วไหลของก๊าซ หรือแม้แต่ในด้านการเกษตรก็มีการนำไปใช้ เช่น ตรวจวัดค่าความชื้นในดิน ตรวจวัดอุณหภูมิภายในโรงเรือน หรือตรวจวัดค่าความเป็นกรด - ด่างในแหล่งน้ำ (McLean, Pasulka, & Bockmon, 2021)

ปัจจุบันบอร์ด Arduino มีหลากหลายประเภท สามารถจำแนกออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ประเภทที่ 1. บอร์ดระดับเริ่มต้น โดยในระดับนี้จะมีบอร์ด Arduino UNO R3, Nano และ LEONARDO ซึ่งบอร์ดจำพวกนี้เหมาะแก่ผู้เริ่มต้นการใช้งานเนื่องด้วยความไม่ซับซ้อนของตัวบอร์ดเอง และมีราคาถูก ประเภทที่ 2. บอร์ดสำหรับผู้ใช้งานที่มีทักษะปานกลางและมีประสบการณ์ในด้าน การเขียนชุดคำสั่งต่าง ๆ มาพอสมควรซึ่งบอร์ดในกลุ่มนี้ จะมีคุณสมบัติที่ดีและสูงกว่าบอร์ดชนิดแรกในด้านของหน่วยประมวลผล ความเร็วของการทำงานรวมทั้งมีหน่วยความจำที่สูงขึ้น ได้แก่ บอร์ด Arduino mega และ DUE และประเภทที่ 3. บอร์ดสำหรับผู้ใช้งานด้านอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง บอร์ดกลุ่มนี้มีความสามารถในการเชื่อมต่อกับอินเทอร์เน็ตได้อย่างง่ายโดยที่ในตัวบอร์ดจะมีส่วนของโมดูลสำหรับการเชื่อมต่อสัญญาณ Wi-Fi มาให้ในบอร์ดหรือหากผู้ใช้งานต้องการนำสายแลน (LAN) เชื่อมต่อกับบอร์ดก็สามารถทำได้เช่นเดียวกัน เช่น Arduino YUN (จิราวุธ วารินทร์, 2563)

เพื่อให้เข้าใจและสามารถใช้งานบอร์ด Arduino mega 2560 ได้อย่างถูกต้องจึงจำเป็นต้องเข้าใจในส่วนององค์ประกอบและสัญลักษณ์บนบอร์ด Arduino mega 2560 ดังภาพที่ 2-7 และตารางที่ 2-2



ภาพที่ 2-7 ส่วนประกอบในบอร์ด Arduino mega 2560 (Rapid Electronics Limited, 2012)

หมายเลข 1 USB port ใช้สำหรับเชื่อมต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์เพื่ออัปโหลดโปรแกรมเข้าสู่ MCU และใช้สำหรับการจ่ายไฟเพื่อเลี้ยงบอร์ด Arduino Mega 2560 ในรูปแบบอนุกรม USART0

หมายเลข 2 I/C voltage ใช้สำหรับปรับระดับแรงดันไฟฟ้าให้แก่บอร์ดทดลอง

หมายเลข 3 Power jack ใช้เป็นช่องเชื่อมต่อกระแสไฟจาก adapter ซึ่งจะใช้เป็นกระแสไฟขนาด 9 ถึง 12 โวลต์แบบ DC

หมายเลข 4 Reset button ใช้สำหรับการรีเซ็ตบอร์ด โดยผู้ใช้งานสามารถกดปุ่มนี้ได้เมื่อต้องการให้บอร์ดเริ่มต้นการทำงานใหม่ หรือในกรณีที่บอร์ดมีอาการค้างหรือทำงานผิดพลาด

หมายเลข 5 ICSP port สำหรับ USB interface แบบ 16U2 ซึ่งเป็นพอร์ตที่ใช้ในการเชื่อมต่อโปรแกรม Visual com port

หมายเลข 6 LED pin 13 ไฟแสดงสถานะการณ้เชื่อมต่อกับช่อง I/O pin 13 ของบอร์ด

หมายเลข 7 LED status Rx/Tx ไฟแสดงสถานะ จะแสดงก็ต่อเมื่อมีการเชื่อมต่อ เพื่อบ่งบอกว่า บอร์ด Arduino mega 2560 ยังคงทำงานอยู่ในขณะนั้น

หมายเลข 8 Digital pins ซึ่งหมายเลข 2 ถึง 13 จะเป็นขาการเชื่อมต่อแบบ Digital input และ Tx/Rx ตั้งแต่ 14 ถึง 19 จะเป็น port การเชื่อมต่อแบบอนุกรม USART0 ถึง USART3

หมายเลข 9 MCU: ATmega2560 เป็น microcontroller ประมวลผล ซึ่งอยู่บนบอร์ด Arduino mega 2560 เมื่อมีการเขียนชุดคำสั่งลงไป คำสั่งนี้จะถูกอัปโหลดและทำงานภายใน microcontroller ตัวนี้

หมายเลข 10 ICSP for ATmega2560 ใช้เชื่อมต่อแบบ MISO, VCC, SCK, และ GND

หมายเลข 11 LED status ไฟนี้จะติดขึ้นเพื่อบ่งบอกว่า มีไฟจ่ายเลี้ยงวงจรภายในบอร์ดอยู่

หมายเลข 12 Digital port เป็นขาสำหรับการเชื่อมต่อดิจิทัลอินพุตหรือเอาต์พุต ตั้งแต่ขาที่ 22 ถึง 52

หมายเลข 13 Analogue port ช่องต่อสัญญาณอนาล็อก ความละเอียด 10 บิต โดยมีจำนวนช่องทั้งหมด 16 ช่อง ตั้งแต่ A0 ถึง A15

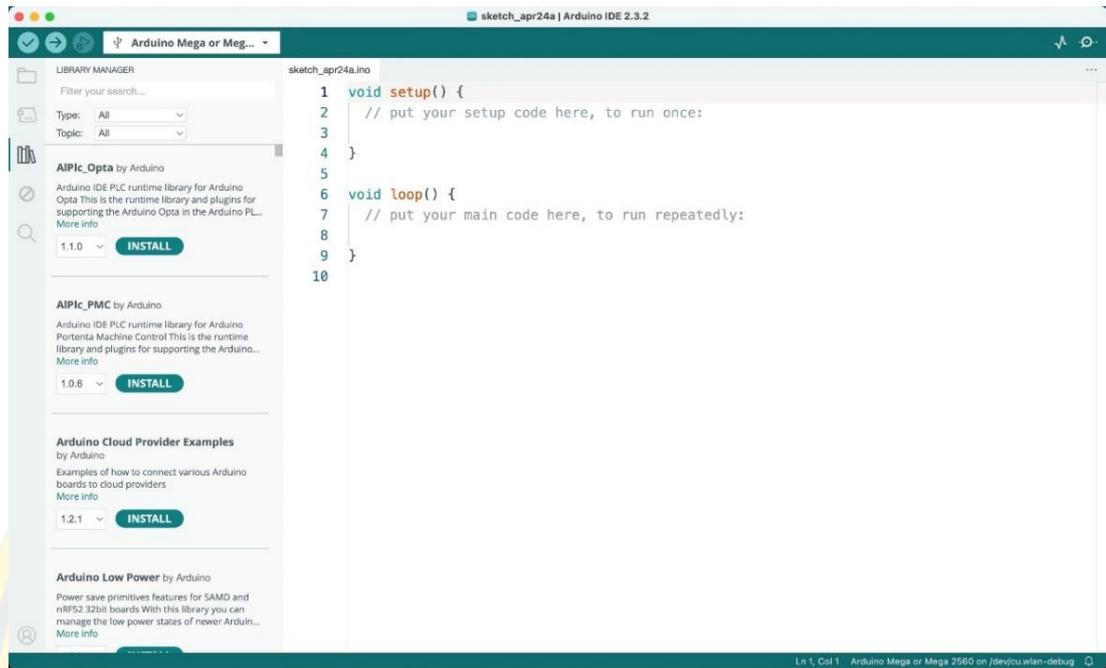
หมายเลข 14 Output voltage เป็นขาสำหรับต่อเพื่อจ่ายไฟไปยังอุปกรณ์อื่นภายนอกบอร์ด (+3.3 และ +5 โวลต์ และขาต่อ GND จำนวน 2 ช่อง)

ตารางที่ 2-2 ขาสัญญาณของบอร์ด Arduino mega 2560 และหน้าที่ (Arduino CC, n.d.)

ขาสัญญาณ	หน้าที่
3V3	ขาสัญญาณแรงดันไฟฟ้า 3.3 โวลต์
5 โวลต์	ขาสัญญาณแรงดันไฟฟ้า 5 โวลต์
GND	ขากราวด์จำนวน 2 ช่อง
Vin	ขาแรงดันไฟฟ้าอินพุตที่ป้อนให้บอร์ด (Power jack)
A0 ถึง A15	ขาสัญญาณอนาล็อกอินพุต มีจำนวน 16 ขา คือ A0 ถึง A15
SDA20	ขาสัญญาณข้อมูล
SCL21	ขาสัญญาณนาฬิกาใช้ในการติดต่อสื่อสารแบบ I ² C เช่น การเชื่อมต่อกับจอแสดงผลแอลซีดีในบอร์ดซึ่งมีอยู่ 2 จุด
Rx	ขาสัญญาณสำหรับรับข้อมูลของการสื่อสารพอร์ตอนุกรม
Tx	ขาสัญญาณสำหรับส่งข้อมูลของการสื่อสารพอร์ตอนุกรม
2 ถึง 13	ขาสัญญาณดิจิทัลอินพุตหรือเอาต์พุต

2. โปรแกรม Arduino IDE

ซอฟต์แวร์สำหรับการพัฒนาบอร์ด Arduino คือ โปรแกรม Arduino® integrated development environment หรือสามารถเรียกโดยย่อได้ว่า โปรแกรม arduino (IDE) เป็นเครื่องมือสำหรับส่วนของการเขียนคำสั่งซึ่งมีการใช้งานร่วมกับบอร์ด Arduino ในรูปแบบของ Open source ทั้งในส่วนของฮาร์ดแวร์และซอฟต์แวร์ ซึ่งการเขียนชุดคำสั่งในโปรแกรมจะใช้ภาษา C หรือ C++ ดังภาพที่ 2-8 ซึ่งในส่วนของ IDE จะเป็นส่วนเสริมของระบบพัฒนาโดยทำหน้าที่ในการช่วยเหลือนักพัฒนาในการเขียนชุดคำสั่งเพื่อให้เกิดความถูกต้องมากที่สุด ส่วนของหน้าต่างการใช้งานสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนด้วยกันคือ 1. ไฟล์ในส่วนของหัวโปรแกรม 2. Void setup() ส่วนนี้เป็นส่วนของการกำหนดค่าและเก็บฟังก์ชันที่ทำงานครั้งเดียว และส่วนที่ 3. Void loop() เป็นส่วนของตัวโปรแกรมโดยเมื่อทำงานครบแล้วจะวนกลับมาทำซ้ำใหม่ตั้งแต่ต้นซึ่งสามารถอธิบายได้ดังตารางที่ 2-3 และโปรแกรม arduino IDE สามารถทำการติดตั้งได้ทั้งในระบบปฏิบัติการแบบ Windows, Macintosh OSX และ ระบบปฏิบัติการ Linux (ดอนสัน ปงผาบ, 2563)

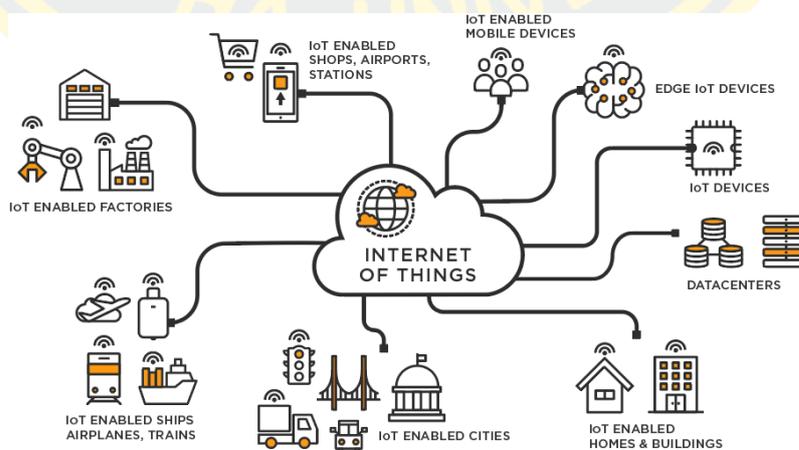


ภาพที่ 2-8 โปรแกรม Arduino IDE version 2.3.2 (Vissavakawn, 2024)

ตารางที่ 2-3 ส่วนประกอบในหน้าต่างโปรแกรม Arduino IDE (ดอนสัน ปงผาบ, 2563)

ส่วนประกอบ	หน้าที่
ไฟล์หัวโปรแกรม	เมื่อมีการเรียกใช้งาน ไลบรารี จะทำการประกาศในหัวข้อ เช่น <code>#include <Servo.h></code> ซึ่งมีความหมายว่า เป็นการเรียกใช้งานไลบรารี Servo.h เพื่อใช้งานเกี่ยวกับเซอร์โวมอเตอร์
Void setup()	เป็นการกำหนดค่าเริ่มต้นของตัวโปรแกรม เช่น การกำหนดขาสัญญาณ การกำหนดอัตราการสื่อสารแบบอนุกรม หรือเป็นการกำหนดขาอินพุต/เอาต์พุต โดยในส่วนนี้เป็นฟังก์ชันที่ทำงานแบบครั้งเดียว
Void loop()	เป็นส่วนของโปรแกรมหลักที่ทำงานตลอดเวลาหรือวนลูปทำงานตลอดไปแบบทำงานครบแล้วจะวนกลับมาทำซ้ำใหม่ตั้งแต่ต้น ในส่วนนี้อยู่ระหว่างเครื่องหายปีกกาเปิด ไปจนถึง ปีกกาปิด และโปรแกรมจะหยุดทำงานก็ต่อเมื่อปิดสวิทช์ภายในฟังก์ชัน void loop() ประกอบไปด้วยตัวแปร ชุดคำสั่ง และฟังก์ชันต่าง ๆ โดยการเขียนโปรแกรมตามการใช้ภาษาของ arduino (Arduino programming Language) ซึ่งอ้างอิงตามภาษา C หรือ C++

อินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง (Internet of Things; IoT)



ภาพที่ 2-9 อินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง (Internet of things; IoT) (Mocrii et al., 2018)

Internet of things หรือเรียกโดยย่อว่า IoT บางครั้งเรียกว่า M2M ซึ่งย่อมาจาก machine to machine หรือในภาษาไทยเรียกว่า อินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง หรืออินเทอร์เน็ตแห่งสรรพสิ่ง ซึ่งถูกพัฒนาในปี ค.ศ. 1999 ณ มหาวิทยาลัย Massachusetts Institute of Technology ประเทศสหรัฐอเมริกาหรือรู้จักโดยย่อว่า MIT จากผู้พัฒนาที่มีชื่อว่า Kevin Ashton และนิยามของคำว่า IoT ในภาษาไทยมีความหมายว่า การที่อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ต่าง ๆ มีความสามารถในการเชื่อมโยงหรือสามารถรับส่งข้อมูลถึงกันระหว่างอุปกรณ์ได้ด้วยระบบอินเทอร์เน็ต และการเชื่อมโยงนี้ช่วยทำให้มนุษย์สามารถสั่งการควบคุมการใช้งานอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ต่าง ๆ ผ่านทางเครือข่ายอินเทอร์เน็ตได้ แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า IoT จะมีประโยชน์เป็นอย่างมากสำหรับมนุษย์ในเรื่องของการอำนวยความสะดวกในชีวิตประจำวัน แต่ก็มีความเสี่ยงในด้านของความปลอดภัยเช่นกัน เนื่องจากหากระบบรักษาความปลอดภัยของเครือข่ายอินเทอร์เน็ตหรืออุปกรณ์นั้น ไม่ได้มาตรฐานหรือไม่สูงมากพอ จะส่งผลให้ผู้ไม่หวังดีเข้ามาจัดการกับข้อมูลของผู้ใช้งานในระบบนั้น ในทางไม่พึงประสงค์ ซึ่งถือว่าเป็นสิ่งที่ผู้พัฒนาระบบเองจะต้องคำนึงถึงเป็นอันดับแรกเพื่อป้องกันการโจรกรรมข้อมูลทางโลกออนไลน์ ตัวแปรสำคัญอีกอย่างหนึ่งสำหรับระบบ IoT ที่ใช้ในการสื่อสารของอุปกรณ์ ไม่เพียงอาศัยเครือข่ายอินเทอร์เน็ตแต่ยังต้องอาศัย Sensor node จำนวนมากซึ่งจะส่งผลให้เกิด A wireless sensor network (WSN) แก่อุปกรณ์อื่นเชื่อมต่อเข้าด้วยกันได้ และความสามารถของ WSNs มีความสามารถตรวจจับ physical phenomena ในเครือข่ายได้ด้วย เช่น แสง ความดัน อุณหภูมิ เพื่อทำการส่งค่าไปยังอุปกรณ์ในระบบให้เกิดการทำงานหรือสิ่งงานอื่นต่อไป (มหศักดิ์ เกตุฉ่ำ, ม.ป.ป.)

การประยุกต์ใช้งานด้าน IoT ในชีวิตประจำวัน มีมากมายเนื่องจากความสามารถในการเชื่อมต่ออุปกรณ์ที่หลากหลายร่วมกับเครือข่ายอินเทอร์เน็ตดังภาพที่ 2-9 ซึ่งจุดนี้เองเป็นการเปิดโอกาสให้ผู้ใช้งานนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวางและหลากหลาย ความสามารถในการเชื่อมต่อและตรวจวัดข้อมูลจากหลายแหล่ง เช่น การวัดอุณหภูมิ วัดความชื้น วัดความเข้มแสง หรือวัดระยะทาง ส่วนนี้เองส่งผลให้สามารถนำข้อมูลจากหลากหลายส่วนไปวิเคราะห์และแสดงผลในรูปแบบกราฟิกเพื่อช่วยในการตัดสินใจ หากนาระบบรวมผนวกเข้ากับระบบ Big data ทำให้เกิดการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีความซับซ้อนมากได้เป็นอย่างมาก และทันเหตุการณ์ (Real-time) โดยตัวอย่างของการประยุกต์ใช้งานด้าน IoT เช่น

1. ประยุกต์ใช้ด้าน Smart home หรือเรียกว่า บ้านอัจฉริยะ เป็นการนำเอาเทคโนโลยีมาสั่งการควบคุมอุปกรณ์เครื่องใช้ไฟฟ้าภายในบ้าน เช่น ควบคุมสั่งการการเปิด-ปิดไฟอัตโนมัติตามระยะเวลาที่พระอาทิตย์ขึ้นและลง สั่งการให้เครื่องปรับอากาศเปิดทำงานโดยอัตโนมัติ หรือแม้แต่

ระบบที่กำลังได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบันคือ ระบบควบคุมความปลอดภัยภายในบ้านคือการติดตามดुक้องวงจรปิดได้จากทุกที่ที่มีการเชื่อมต่ออินเทอร์เน็ต (Mocrii, Chen, & Musilek, 2018)

2. ประยุกต์ใช้ด้าน Smart industrial agriculture หรือในประเทศไทยคุ้นชินกับคำว่า สมาร์ทฟาร์ม ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยก็ได้มีการพัฒนาระบบและอุปกรณ์ต่าง ๆ ออกมารองรับระบบนี้ อย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็น โดรนหุ่นยนต์พ่นยา อุปกรณ์ควบคุมพารามิเตอร์ในโรงเรือน ทั้ง อุณหภูมิ ความชื้นในดินหรือในอากาศ ระบบรดน้ำอัจฉริยะ เป็นต้น ไม่เพียงแต่การนำระบบสมาร์ทฟาร์มไปใช้ในเกษตรกรรมรายย่อย แต่ยังสามารถพัฒนาไปใช้ในอุตสาหกรรมขนาดกลาง และมหาภาคได้อีกด้วยรวมถึง อุตสาหกรรมชีวภาพที่ต้องอาศัยข้อมูลเป็นจำนวนมากในการจัดการระบบ ทั้งการทำงานร่วมกันระหว่างเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิ เซ็นเซอร์ตรวจวัดก๊าซต่าง ๆ และเซ็นเซอร์ตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง อุปกรณ์เหล่านี้ล้วนแล้วแต่ทำงานร่วมกันเป็นระบบเพื่อช่วยให้เกิดการตัดสินใจที่ถูกต้องแม่นยำในการวางแผนดำเนินการแก่ผู้ประกอบการ (Maroli, Narwane, & Gardas, 2021)

3. ประยุกต์ใช้งานด้าน Smart healthcare technology เป็นการดูแลสุขภาพอัจฉริยะด้วยระบบ IoT จากอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่เชื่อมโยงเข้าด้วยกันผ่านระบบอินเทอร์เน็ตซึ่งระบบนี้เองก็ถือว่าเป็นระบบหนึ่งที่มีบทบาทและความสำคัญในวงการการแพทย์เป็นอย่างมาก เช่น ระบบติดตามการนอนหลับ ระบบการตรวจวิเคราะห์หามะเร็งเร็ว เครื่องตรวจวัดน้ำตาลในร่างกายน หรือเครื่องตรวจวัดชีพจร ระบบตรวจจับการหายใจและปริมาณออกซิเจนในเลือด ข้อมูลเหล่านี้จัดว่าเป็น Bio-signals ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการทางการแพทย์เป็นอย่างมากในการวินิจฉัย ติดตาม และรักษาโรค (Sreedevi, Harshitha, Sugumaran, & Shankar, 2022)

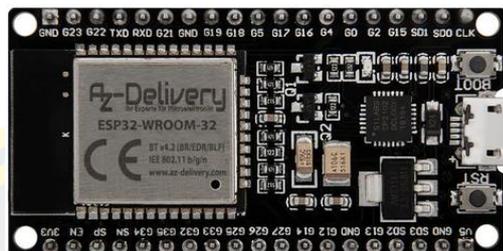
ระบบให้บริการแพลตฟอร์ม Network platform for Internet of everything platform; NETPIE 2020



ภาพที่ 2-10 Platform NETPIE2020 (NECTEC, 2017)

ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NECTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ได้พัฒนาและเปิดตัวในปี พ.ศ. 2558 แพลตฟอร์ม Network platform for internet of everything ในปี พ.ศ. 2558 หรือเรียกโดยย่อว่า NETPIE 2015 ซึ่งจัดเป็น IoT cloud platform บุคคลทั่วไปสามารถใช้งานได้ผ่าน เว็บเว็บไซต์ (Web portal) ที่สามารถลงทะเบียน จัดการตัวตน เข้าถึงสิทธิ์ของแอปพลิเคชัน รวมถึงจัดการอุปกรณ์ต่าง ๆ ได้ผ่านทางเว็บไซต์ <https://2015.netpie.io/#gsc.tab=0> โดยที่ middleware จัดว่าเป็นหัวใจหลัก (นอกเหนือจากส่วนอื่น) เป็น Distributed MQTT Brokers เพื่อให้สิ่งต่าง ๆ (Things) มาแลกเปลี่ยนข้อมูล ติดต่อสื่อสาร พบปะและทำงานร่วมกันผ่านการส่งข้อความแบบ Publish/Subscribe การขยายตัวของ NETPIE เพื่อรองรับอุปกรณ์จะทำหารขยายตัวได้แบบอัตโนมัติ เนื่องจาก NETPIE เป็นสถาปัตยกรรมคลาวด์อย่างแท้จริงทุกองค์ประกอบ อีกทั้งจุดเด่นคือ เมื่อระบบตรวจพบส่วนหนึ่งส่วนใดมีปัญหาขึ้นก็จะสามารถซ่อมแซมแก้ไขได้เองโดยอัตโนมัติ (Self-recovery) การจัดการระบบเป็นไปในรูปแบบของ Plug-and-Play และไม่จำเป็นต้อง Configure หรือปรับแต่งใด ๆ อีกทั้งในฝั่งอุปกรณ์ NETPIE มี Client library หรือสามารถเรียกอีกชื่อว่า Microgear เป็นแบบ Open source มีหน้าที่ในการสร้างและดูแลช่องทางการสื่อสารระหว่างอุปกรณ์กับแพลตฟอร์ม NETPIE รวมไปถึงจนถึงมีหน้าที่ในการรักษาความปลอดภัยในการส่งข้อมูล ในส่วนของ Microgear ผู้ใช้งานสามารถทำการดาวน์โหลดได้จาก <https://github.com/netpieio> รองรับทั้งแบบ OS และ Embedded board และในปี พ.ศ.2563 NECTEC และ สวทช. เปิดตัว NETPIE 2020 ดังภาพที่ 2-10 ซึ่งแก้ไขข้อบกพร่องใน NETPIE 2015 เดิม เช่น ปรับปรุงให้รองรับโดยฮาร์ดแวร์และภาษาการโปรแกรมหลากหลายมากขึ้น และมีคุณสมบัติหลัก เช่น การแจ้งเตือนความผิดปกติของเซ็นเซอร์หรืออุปกรณ์ จากที่ได้กำหนดไว้ การควบคุมการทำงานของอุปกรณ์ต่างๆ ผ่าน Cloud platform และ การแสดงผลและควบคุมการทำงานของอุปกรณ์ผ่าน Dashboard

บอร์ดไมโครคอนโทรลเลอร์ ESP-WROOM-32



ภาพที่ 2-11 บอร์ด ESP-32 NodeMCU AZ-Delivery module WLAN Wi-Fi development board with CP2102 (AZ-Delivery, n.d.)

บอร์ดไมโครคอนโทรลเลอร์ชิป ESP-WROOM-32 เป็นบอร์ดรุ่นที่ถูกพัฒนา ต่อยอด และแก้ไขข้อเสียหรือจุดด้อยของบอร์ด ESP8266 ทั้งในเรื่องความเร็ว ความแรงในการประมวลผล รวมทั้งเพิ่มฟังก์ชันต่าง ๆ มากมายดังภาพที่ 2-11 อีกทั้งชิป ESP32 ถูกติดตั้งมาพร้อมกับความสามารถในการรองรับมาตรฐาน Wi-Fi 802.11 b/g/n และมีการเชื่อมต่อของเทคโนโลยี Bluetooth 4.2 (bluetooth low energy; BLE) ที่ความเร็ว 1 เมกะบิตต่อวินาที และมีความสามารถในด้านของโหมด Low energy แบบ Deep sleep และเมื่อมีการทำงานบอร์ดจะสามารถ Wake up ขึ้นมาพร้อมสำหรับการทำงานทันที จุดเด่นของ ESP32 คือ มีราคาถูก (ในราคาประมาณ 300 ถึง 400 บาท) เมื่อเทียบกับบอร์ด ESP8266 สามารถหาซื้อได้ง่าย รวมทั้งมีเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิเพื่อป้องกันความร้อนที่มากเกินไปจนเกิดความเสียหายขึ้นแก่ตัวบอร์ด รวมทั้งมีการรักษาความปลอดภัยของบอร์ดด้วยการเข้ารหัส Wi-Fi ในรูปแบบ WEP และ WPA/WPA2 PSK/Enterprise สามารถเข้ารหัสวงจรรด้วย AES/SHA2 Elliptical Curve Cryptography/RSA-4096 การทำงานภายในบอร์ดเป็นการทำงานในรูปแบบ Dual core ที่ความเร็ว 2.4 ถึง 2.5 กิกะเฮิรตซ์ อ่านค่าได้ที่ความละเอียดแบบ ADC 12 บิต โดยมีข้อมูลจำเพาะของบอร์ด ESP32 ดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 ข้อมูลจำเพาะบอร์ด ESP32 (AZ-Delivery, n.d.)

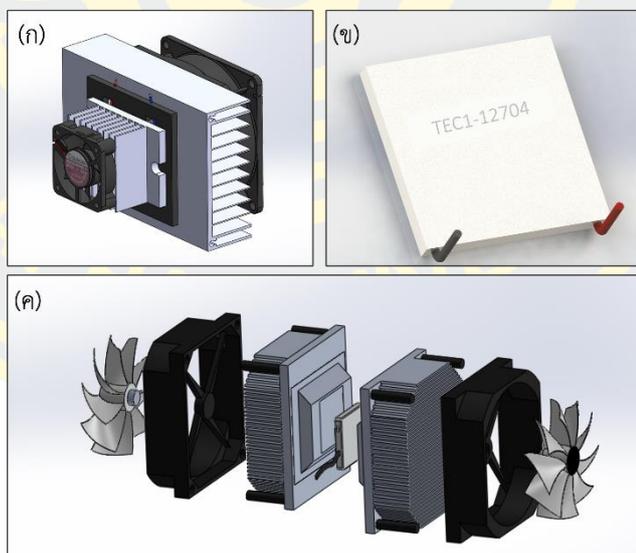
รายละเอียด	ข้อมูล
CPU	Tensilica Xtensa LX6 32 bits Dual core [®] 160/240 เมกะเฮิรตซ์
Memory	4 เมกะไบต์ Flash, 520 กิโลไบต์ SRAM
Wireless form	On-board PCB antenna
Electrical characteristic	3.3 โวลต์ operated, 15 มิลลิแอมป์ output current per GPIO pin, 80 มิลลิแอมป์ average working current
Operating temperature	ลบ 40 ถึง 125 องศาเซลเซียส
Input voltage	2.2 โวลต์ ถึง 3.6 โวลต์
Operating current	80 มิลลิแอมป์
Clock speed	240 เมกะเฮิรตซ์

นอกจากที่กล่าวไปในข้างต้นบอร์ด ESP32 ยังมีเซ็นเซอร์ฝังมาพร้อมในตัวบอร์ด ได้แก่ เซ็นเซอร์แม่เหล็ก เซ็นเซอร์สัมผัสสูงสุดจำนวน 10 ช่อง และมีวงจรสำหรับกรองสัญญาณรบกวนภายในตัววงจรขยายสัญญาณ อีกทั้งยังมีความสามารถในการรองรับการเชื่อมต่อด้วยคริสตัลความถี่ 32.768 กิโลเฮิรตซ์ โดยส่วนนี้เป็นการใช้งานร่วมกันกับการนับวงจรเวลาในบอร์ดโดยเฉพาะ ส่วนขาของบอร์ด ESP32 ดังตารางที่2-5

ตารางที่ 2-5 ส่วนประกอบของช่องเชื่อมต่อภายในบอร์ด ESP32 (AZ-Delivery, n.d.)

ช่องสัญญาณ	จำนวน (ช่อง)
GPIO	32
รองรับ UART	3
รองรับ SPI	3
รองรับ I ² C	2
รองรับ ADC	12
รองรับ DAC	2
รองรับ I ² S	2
รองรับ PWM/Timer	ทุกช่อง
รองรับการเชื่อมต่อกับ SD-Card	-

ชุดทำความเย็นด้วย Peltier thermoelectric cooler



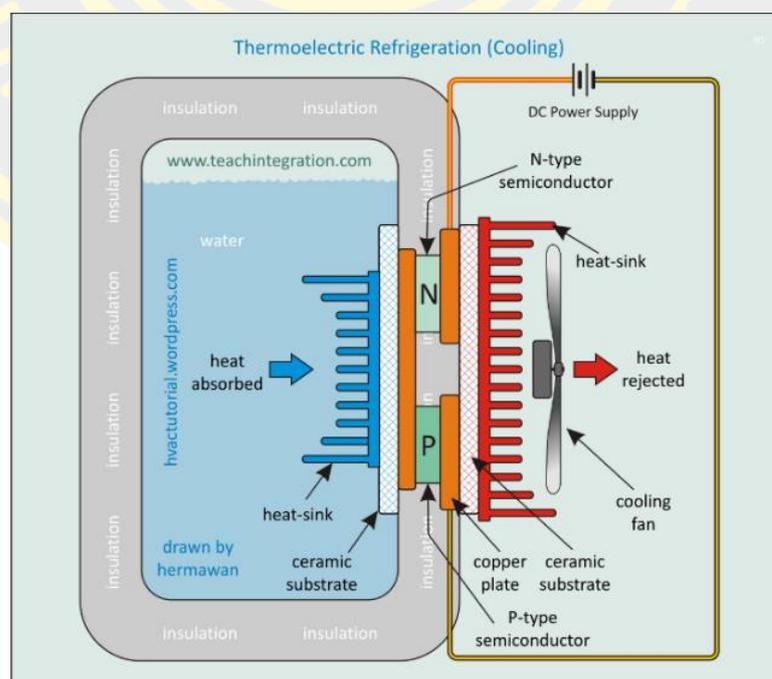
ภาพที่ 2-12 ระบบทำความเย็น (ก) องค์ประกอบรวมของชุดทำความเย็น (ข) แผ่นเพลเทียร์รุ่น thermoelectric cooler TEC1-12704 (ค) ชิ้นส่วนในชุดทำความเย็นทั้งหมด

แผ่นทำความเย็นเพลเทียร์ หรือเรียกอีกชื่อว่า แผ่นร้อน - เย็น มีสีขาวยังสองด้าน ขนาดกว้างคูณยาว เท่ากับ 30 คูณ 30 มิลลิเมตร หรือ 40 คูณ 40 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 2-12 (ข) ใช้หลักการในการทำงานดังภาพที่ 2-13 ตามหลัก Thermolectric ของสารกึ่งตัวนำแบบชนิด N และสารกึ่งตัวนำชนิดแบบ P เมื่อมีการต่อวงจรกระแสไฟฟ้าแบบกระแสตรงไหลผ่านไปยังสารกึ่งตัวนำทั้งชนิด N และ P ส่งผลให้เกิดการดูดกลืนอิเล็กตรอน จากสารกึ่งตัวนำชนิด P ไปยังชนิด N ซึ่งแตกต่างจากลักษณะการทำความเย็นแบบอัดไอเคมี (Compression) ที่ต้องมีสารทำความเย็นไหลวนในระบบ หรือหากจะอธิบายโดยง่าย คือ เมื่อมีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านสารกึ่งตัวนำจะมีการดูดกลืนอิเล็กตรอนเคลื่อนที่จากระดับพลังงานต่ำทางด้านตัว P ไปสู่ด้าน N ซึ่งมีระดับพลังงานที่สูงกว่าส่งผลให้บริเวณผิวของแผ่นเพลเทียร์ด้านหนึ่งดูดพลังงานความร้อนในอากาศรอบ ๆ เมื่อความร้อนโดยรอบถูกดูดไปส่งผลให้บริเวณนั้นมีอุณหภูมิที่ลดลง เรียกด้านนี้ว่า ด้านเย็น และนำความเย็นจากบริเวณนี้ไปใช้งานได้ ส่วนอีกด้านหนึ่งจะเกิดการดูดกลืนของอิเล็กตรอนจากระดับพลังงานที่สูงในสารกึ่งตัวนำแบบชนิด N สู่อะดับพลังงานแบบชนิด P ที่ต่ำกว่า ลักษณะเช่นนี้ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาคายความร้อน (Exothermic reaction) ขึ้นในอีกด้านของแผ่นเพลเทียร์ เรียกด้านนี้ว่า ด้านร้อน โดยด้านร้อนมีความสามารถในการระบายความร้อนได้สูงถึง 90 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามถึงแม้ด้านร้อนจะมีความสามารถในการระบายความร้อนสูงแต่ผู้ใช้งานไม่ควรปล่อยให้อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานาน จำเป็นต้องมีระบบระบายความร้อน เช่น พัดลมระบายอากาศหรือระบบรางน้ำเพื่อลดอุณหภูมิลงเป็นการป้องกันความเสียหายต่อแผ่นเพลเทียร์เอง ลักษณะการทำงานดังกล่าวนี้ทำให้ หลายคนจึงนิยมเรียกแผ่นเพลเทียร์ในอีกชื่อว่า แผ่นร้อน - เย็น (Lavanya, Venkanteshwarlu, Nagaraju, & Prasanthi, 2016)

แผ่นเพลเทียร์รุ่น TEC1-12704 มีสารกึ่งตัวนำชนิด P นิยมทำมาจากธาตุบิสมัท (Bismuth: Bi) เลขอะตอมเท่ากับ 83 และสารกึ่งตัวนำชนิด N ทำมาจากธาตุเทลลูเรียม (Tellurium: Te) ธาตุ มีเลขอะตอมเท่ากับ 52 ข้อมูลจำเพาะดังตารางที่ 2-8 ซึ่งมีการประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น นำไปดัดแปลงทำตู้เย็นขนาดเล็ก นำไปช่วยลดความร้อนบริเวณหน่วยประมวลผลของเครื่องคอมพิวเตอร์ หรือแม้แต่นำไปทำเครื่องระบายอากาศพกพาส่วนตัวในหมวกกันน็อค ข้อดีของแผ่นเพลเทียร์ เช่น ไม่ต้องใช้น้ำยาทำความเย็นในระบบ มีการทำความเย็นที่ไม่ซับซ้อนยุ่งยาก ไม่มีเสียงรบกวนผู้ใช้งาน น้ำหนักเบา ขนาดเล็ก และมีอายุการใช้งานของแผ่นเพลเทียร์นาน 5 ถึง 10 ปี ซึ่งแผ่นจะถูกติดตั้งเข้าไปยังชุดทำความเย็นซึ่งมีพัดลมกระจายความเย็นและพัดลมระบายความร้อน ดังภาพ 2-12 (ก) และการประกอบชิ้นส่วนเข้าด้วยกันดังภาพที่ 2-12 (ค) แผ่นเพลเทียร์จะอยู่ชั้นในสุดและถูกประกบไว้ด้วย Heat sink และพัดลมที่ช่วยกระจายความร้อนและความเย็นทั้งสองด้าน ซึ่งด้านร้อนของแผ่นเพลเทียร์จะถูกทาซิลิโคนทั่วแผ่นเพื่อเป็นการช่วยระบายความร้อนเช่นเดียวกันกับหลักการระบายความร้อนด้วยการทาซิลิโคนบนซีพียูของเครื่องคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 2-6 คุณสมบัติจำเพาะของแผ่นเพลเทียร์ รุ่น TEC1-12704 (Electric Components datasheet search, n.d.)

รายละเอียด	ข้อมูล
หน่วยประมวลผล	TEC1-12704
น้ำหนัก	29 gramme
ขนาด	40*40*42 มิลลิเมตร element logarithm 127 pairs
ขนาดสายไฟเชื่อมต่อ	Lead length 350 มิลลิเมตร RV standard wire Sigle head 5 มิลลิเมตร Tin plated
ความสามารถในการทำงาน	อุณหภูมิระหว่าง ลบ 10 ถึงประมาณ 83 องศาเซลเซียส
กระแสไฟที่ทำงานได้	I_{max} 4 แอมป์
อัตราการจ่ายไฟ	DC 12 โวลต์ maximum voltage 15.5 โวลต์
Cooling power	Q_{cmax} 36 วัตต์
Internal resistance	ประมาณ 3.0 ถึง 3.3 โอห์ม (Ambient temp. 23±1 องศาเซลเซียส, 1 กิโลเฮิร์ต AC test)



ภาพที่ 2-13 ลักษณะการทำงานของแผ่นเพลเทียร์ (Sanjit S. Chavan, 2022)

Switching power supply (Thailand factomart industrail product, 2018)

สวิตซ์เพาเวอร์ซัพพลาย (switching power supply) บางครั้งเรียกว่า Switch mode power supplies (SMPS) เป็นอุปกรณ์สำหรับจ่ายไฟแบบกระแสคงที่ชนิดหนึ่ง โดยมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไฟฟ้ากระแสตรง (Direct current; DC) ให้เป็นไฟฟ้ากระแสสลับ (Alternating current; AC) หรือเปลี่ยนจากกระแสสลับให้จ่ายไฟออกมาเป็นกระแสตรงในค่าที่ต่ำลงได้ ซึ่งโดยปกติทั่วไปในชีวิตประจำวันเครื่องใช้ไฟฟ้าขนาดเล็กที่ต้องการแหล่งจ่ายไฟกำลังสูงล้วนแล้วแต่มีสวิตซ์เพาเวอร์ซัพพลายในการจ่ายไฟทั้งสิ้น เช่น เครื่องคอมพิวเตอร์ หรือโทรทัศน์

1 หลักการทำงานของสวิตซ์เพาเวอร์ซัพพลาย

สวิตซ์เพาเวอร์ซัพพลายประกอบด้วย 3 ส่วนหลักคือ วงจรฟิลเตอร์และเรกติไฟเออร์ ทำหน้าที่ในการแปลงแรงดันไฟสลับเป็นไฟตรง คอนเวอร์เตอร์ ทำหน้าที่แปลงไฟตรง เป็นไฟสลับ ความถี่สูงและแปลงกลับ เป็นไฟตรงโวลต์ต่ำ และส่วนสุดท้ายวงจรควบคุม ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของคอนเวอร์เตอร์เพื่อให้ได้แรงดันเอาต์พุตตามต้องการ

2 ประเภทของสวิตซ์เพาเวอร์ซัพพลาย

ในท้องตลาดโดยทั่วไปสามารถแบ่งประเภทตามลักษณะของการติดตั้งอุปกรณ์ต่าง ๆ ภายในเครื่อง ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทหลัก คือ

1. แบบ Front mounting เป็นการติดตั้งโดยการใช้อุปกรณ์ติดตั้ง เช่น น็อต สกรู เพื่อยึดติดกับอุปกรณ์ ซึ่งนิยมใช้เนื่องจากมีราคาถูก แบ่งย่อยได้เป็นแบบมีฝาครอบ Enclosed ดังรูปที่ 2-14 (ก) นิยมใช้งานมากที่สุดเนื่องจากราคาประหยัด และสามารถใช้ในตู้คอนโทรลได้ อีกแบบคือแบบเปลือย Open frame ดังรูป 2-14 (ข) สามารถนำไปเป็นจ่ายไฟเลี้ยงเครื่องจักร หรือเครื่องมือต่าง ๆ แต่จะไม่เหมาะสำหรับงานตู้คอนโทรลเนื่องจากไม่ปลอดภัย



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2-14 สวิตซ์เพาเวอร์ซัพพลาย (ก.) แบบมีฝาครอบ Enclosed และ (ข.) แบบเปลือย Open frame (Thailand factomart industrail product, 2018)

2. แบบ Din rail เป็นการติดตั้งที่ยึดติดกับรางแบบต่าง ๆ ซึ่งในประเทศไทยแบบ Din rail นี้ นิยมใช้ขนาด 35 มิลลิเมตร หรือในบางครั้งก็เรียกอีกชื่อว่า รางปีกนก
3. แบบ Adapter เหมาะสำหรับงานที่ต้องมีการเคลื่อนย้ายบ่อย ไม่มีการติดตั้งถาวร

หลักการออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

1. หลักการออกแบบแผ่นจานหมุน

แผ่นจานหมุนสำหรับใส่หลอดเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติมีการออกแบบให้มีลักษณะเป็นทรงกลมเพื่อให้ง่ายต่อการเคลื่อนที่ของหลอดเก็บตัวอย่างไปยังท่อนำส่งตัวอย่าง โดยการออกแบบแผ่นจานหมุนนั้นจำเป็นต้องมีการคำนวณจุดวางหลอดเก็บตัวอย่าง ซึ่งระยะห่างระหว่างหลอดเก็บตัวอย่างบนแผ่นจานหมุนจะถูกคำนวณโดยอาศัยสมการที่ 2-1

$$\text{arc length} = 2\pi r \left(\frac{\theta}{360} \right) \quad (2-1)$$

เมื่อกำหนดให้

arc length คือ ระยะห่างระหว่างหลอดเก็บตัวอย่าง

θ คือ มุมระหว่างหลอดเก็บตัวอย่าง

π คือ ค่าคงที่ 3.14

r คือ รัศมีของแผ่นจานหมุน

หลักการออกแบบจะเริ่มจากการกำหนด มุมและระยะห่างระหว่างหลอดเก็บตัวอย่างเพื่อหาค่ารัศมีของแผ่นจานหมุน จะทราบถึงขนาด (Diameter) ของแผ่นจานหมุนซึ่งมีค่าเป็นสองเท่าของรัศมี ($2xr$) จากนั้นคำนวณเพื่อหาจำนวนของหลอดเก็บตัวอย่างที่สามารถใส่ได้บนแผ่นจานหมุนจากสมการที่ 2-2

$$N = \frac{360}{\theta} \quad (2-2)$$

เมื่อกำหนดให้

N คือ จำนวนหลอดเก็บตัวอย่างบนแผ่นจานหมุน และ

θ คือ มุมระหว่างหลอดเก็บตัวอย่าง

2. หลักการเลือกวัสดุในการผลิตเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

ในกล่องเก็บตัวอย่างมีการติดตั้งระบบทำความสะอาดด้วยแผ่นเพลทีร์ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความชื้นหรือมีหยดน้ำในกล่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติระหว่างหรือเมื่อสิ้นสุดการใช้งาน อีกทั้งสารตัวอย่างซึ่งถูกกล้ำเลียงมาเก็บยังหลุดเก็บตัวอย่างในกล่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ ในบางครั้งอาจมีการกระเด็นของตัวอย่างเล็กน้อย และด้วยปัญหาดังกล่าวนี้อาจส่งผลให้เกิดสนิมหรือการกัดกร่อนภายในกล่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ ดังนั้นผู้ออกแบบจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของการเลือกวัสดุที่มีคุณภาพ ราคาไม่สูงมาก และทนการกัดกร่อนได้เป็นอย่างดี มีระยะเวลาการใช้ที่ยาวนาน โดยวัสดุที่มีคุณสมบัติดังกล่าวในข้างต้น ซึ่งเป็นที่นิยมในท้องตลาดโดยทั่วไป คือ สแตนเลส

สแตนเลสมีหลากหลายชนิด แต่ที่เป็นที่นิยม พบเห็นได้บ่อยในอุตสาหกรรม โรงพยาบาล หรือในครัวเรือน คือ สแตนเลสเกรด 304 (Stainless 304) บางครั้งเรียก 18/8 ชื่อที่นิยมเรียกในท้องตลาดอีกชื่อคือ เหล็กกล้าไร้สนิม โดยสแตนเลส 304 เป็นสแตนเลสในกลุ่มออสเทนนิติก (Austenitic stainless steel) มีจุดเด่น ในด้านความทนทาน มีความเหนียวสูง ทนความร้อนสูงถึง 1400 องศาเซลเซียส สามารถนำมาขึ้นรูปได้ง่าย ไม่ดูดซึมสารและกลิ่น มีอายุการใช้งานที่ยาวนาน เนื่องจากมีส่วนผสมหลักเป็น เหล็ก (Fe) คิดเป็น 70 ถึง 75% โครเมียม (Cr) 18% นิกเกิล 8% คาร์บอน (C) และอื่น ๆ น้อยกว่า 0.15% โดยประมาณ และเนื่องจากการเติมโครเมียมเป็นส่วนผสมในสแตนเลส เมื่อโครเมียมทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศโดยรอบ เกิดเป็นชั้นฟิล์มบาง ๆ เคลือบตัวสแตนเลสไว้ส่งผลให้มีความสามารถในการต้านทานการกัดกร่อนจากรดได้เป็นอย่างดี (Thai Stainless Steel Development Association, 2014)

3. สเต็ปเปอร์มอเตอร์ (Stepper Motor)

สเต็ปมอเตอร์ คือ มอเตอร์กระแสตรง มีจำนวนขดลวดและแม่เหล็กมากกว่ามอเตอร์ทั่วไป ซึ่งขดลวดในมอเตอร์จะติดอยู่กับส่วน Stator และส่วน Rotor เป็นขั้วแม่เหล็ก จำนวนของขดลวดและแกนแม่เหล็กนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสเต็ปมอเตอร์ และการออกแบบความละเอียดของการหมุน เช่น มอเตอร์ nema-23 จะมีขดลวด Stator 8 ขด และมีแม่เหล็กที่ Rotor ถึง 100 ขั้ว

ส่วนประกอบหลักของสเต็ปเปอร์มอเตอร์มี 2 ส่วนคือ Stator เป็นส่วนที่ติดกับตัวถังของมอเตอร์ ลักษณะเป็นขั้วแม่เหล็กคล้ายฟันซี่เล็ก ๆ ถูกพันด้วยขดลวดเพื่อเหนี่ยวนำให้สนามแม่เหล็กเปลี่ยนแปลง และ Rotor เป็นก้อนแม่เหล็กถาวรคล้ายเฟืองเป็นซี่เพื่อสอดเข้าไปตรงกับซี่ฟันของสเตเตอร์ ซึ่งโรเตอร์ติดอยู่กับแกนหมุนเพื่อนำไปใช้งานตามต้องการ และด้วยสเต็ปเปอร์นี้มีซี่ฟันจำนวนมาก ทำให้มันสามารถขยับเป็นสเต็ปเล็ก ๆ ได้ โดยมีหลักการทำงาน คือ จ่ายไฟฟ้ากระแสตรงเข้าขดลวดเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสนามแม่เหล็กไฟฟ้า และแม่เหล็กที่โรเตอร์จะดูดติดเข้ากับขดลวด การขยับเช่นนี้จะเท่ากับ เป็นการขยับของมอเตอร์ที่ 1 สเต็ป

สเต็ปเปอร์มอเตอร์ มีหลายชนิดด้วยกัน หากแบ่งตามโครงสร้างสามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ Variable reluctance stepper motor, Permanent magnet stepper motor และ Hybrid synchronous stepper motor หรือหากแบ่งตามชนิดของสเตเตอร์ได้ 2 ชนิด คือ Bipolar stepper motor (2-phase) และ Unipolar stepper motor (4-phase)

การเลือกสเต็ปเปอร์มอเตอร์ให้เหมาะสมกับการใช้งาน ควรพิจารณาข้อดังต่อไปนี้

1. จำนวนเฟสของมอเตอร์ (Phase) พิจารณาจากงานต้องการใช้ว่าต้องการแบบใด เช่น 2 phase, 5 phase
2. ขนาดของมอเตอร์ (Size) พิจารณาได้จากขนาดของบริเวณพื้นที่ที่เราจะนำไปติดตั้ง
3. ความละเอียดของมอเตอร์ (Step angle) เป็นส่วนที่สำคัญมากในการเลือกซื้อ Stepping Motor ซึ่งตัวองศาจะเป็นตัวบ่งบอกถึงความละเอียดและความแม่นยำของตำแหน่งงาน
4. ค่าทอร์ก (Torque) ของมอเตอร์ ถือเป็นตัวแปรที่สำคัญเป็นอย่างมาก ไม่น้อยไปกว่าองศาในการเคลื่อนที่ของมอเตอร์ เนื่องด้วยค่าทอร์กหรือแรงบิดเป็นสิ่งสำคัญในการนำมอเตอร์มาใช้งาน หากงานที่ใช้เป็นงานที่ต้องใช้กำลังเยอะก็ควรเลือกมอเตอร์ที่มีค่าทอร์กสูงตามไปด้วยเช่นกัน ซึ่งในบางครั้งผู้ใช้งานจะต้องคำนวณหาค่าทอร์กของมอเตอร์เอง แต่ในปัจจุบันเพื่ออำนวยความสะดวกให้แก่ผู้ใช้งานผู้ผลิตจึงนิยมให้รายละเอียดในส่วนนี้มากับรายละเอียดของสินค้าด้วย ยกตัวอย่าง เช่น มอเตอร์ที่มีแรงทอร์ก 1.3 นิวตันเมตร สามารถใช้งานกับโหลดที่มีน้ำหนักได้ไม่เกิน 0.67 กิโลกรัม หรือไม่เกิน 53.5 ลิตร (Electronic, 2021)

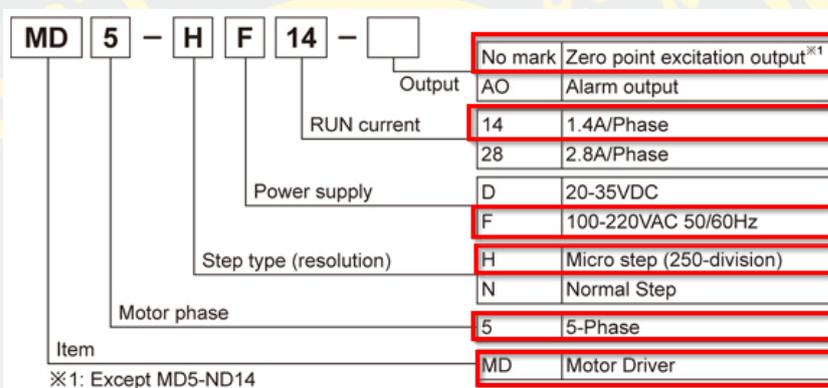
4. ตัวขับมอเตอร์ (Stepping Motor Drive)

สเต็ปเปอร์มอเตอร์ ไม่สามารถทำงานได้หากขาดตัวขับสเต็ปมอเตอร์ (Stepping motor drive) โดยตัวขับมอเตอร์เป็นอุปกรณ์ที่ใช้งานร่วมกับสเต็ปเปอร์มอเตอร์ ดังนั้น การเลือกซื้อสเต็ปมอเตอร์ ควรพิจารณาร่วมกับสเต็ปเปอร์มอเตอร์ที่มีอยู่หรือที่ทำการซื้อไว้ รายละเอียดที่ควรพิจารณาในการเลือกซื้อตัวขับมอเตอร์มีดังนี้

1. จำนวนเฟสของมอเตอร์ (Phase) สามารถพิจารณาได้จากตัวสเต็ปเปอร์มอเตอร์ว่า มอเตอร์นั้นเป็นมอเตอร์ชนิดใด เช่น 2 phase, 5 phase และนอกจากนั้นควรพิจารณาว่าจะเป็นแบบ Bipolar หรือ Unipolar
2. กระแสที่สเต็ปเปอร์มอเตอร์ใช้ โดยสามารถพิจารณาได้จากคู่มือของสเต็ปเปอร์มอเตอร์ ว่าสเต็ปเปอร์มอเตอร์รองรับกระแสไฟที่จำนวนแอมป์เท่าไร และไม่ควรจ่ายกระแสไฟเกิน เนื่องจากจะส่งผลให้สเต็ปเปอร์มอเตอร์เกิดความเสียหาย
3. สวิตชิงเพาเวอร์ซัพพลาย (Switching power supply) แหล่งจ่ายไฟถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเปรียบเสมือนโรงไฟฟ้าที่จ่ายไฟให้ทั้งสเต็ปเปอร์มอเตอร์ และ

สตีปิ้งมอเตอร์ ดังนั้นควรพิจารณาถึงกระแสไฟ ความดันไฟ รวมถึงชนิดของไฟฟ้าว่าเป็นกระแสตรงหรือกระแสสลับ

4. การกระตุ้นเฟส สามารถพิจารณาได้จากงานที่นำไปใช้ ว่าต้องการใช้แรงบิดมากน้อยเพียงใด โดยลักษณะการกระตุ้นเฟสมีหลากหลาย เช่น การกระตุ้นแบบ Full-step 1 phase full-step 2 phase หรือ Half-step โดยแต่ละวิธีมีลักษณะการควบคุมกระแสไฟที่จะจ่ายให้แก่ขดลวดสเตเตอร์แตกต่างกันออกไป และสามารถศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับคุณสมบัติของสตีปิ้งมอเตอร์จากชื่อโมเดลได้จากตัวอย่างดังภาพที่ 2-15



ภาพที่ 2-15 รายละเอียดความหมายตามโมเดลในแต่ละสตีปิ้งมอเตอร์ (Holding, 2019)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

(Ezeji, Qureshi, & Blaschek, 2007) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตบิวทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเน้นศึกษาที่ผลกระทบต่อการย่อยสลายสารผลิตภัณฑ์ของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* BA101 และการผลิตบิวทานอล พบว่า ในระหว่างกระบวนการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีองค์ประกอบของไฟเบอร์สูง จะก่อให้เกิดสารองค์ประกอบจำพวก เกลือ Phenolic compound หรือ Glucuronic acid ขึ้น ส่วนแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* BA101 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิส เช่น อาราบิโนส ไซโลส และกลูโคส อีกทั้งยังพบว่า เมื่อมีการเติมสาร p-Coumaric acid หรือ Ferulic acid ในความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร การเจริญเติบโตและอัตราการผลิตบิวทานอลของแบคทีเรียลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

(Bankar, Survase, Ojamo, & Granström, 2013) รวบรวมงานวิจัยในแบบ Literature review โดยในรายละเอียดของงานเน้นไปที่ ภาพรวมเกี่ยวกับปัญหาต่าง ๆ ในการผลิตบิวทานอลด้วย กระบวนการหมักแบบ ABE และแนวทางในการแก้ปัญหาจากหลากหลายงานวิจัยทั่วโลกที่ได้ถูก คิดค้นขึ้นมาเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ เช่น การใช้ความรู้ด้าน Genetic engineering ตัดต่อพันธุกรรมแบคทีเรีย *Clostridium spp.* ให้มีความทนทานต่อแอลกอฮอล์มากยิ่งขึ้น หรือชี้ให้เห็นปัญหาหลักในกระบวนการหมัก คือ ขั้นตอน Purification ผลิตภัณฑ์ เนื่องด้วย ภัยที่สุดผลิตภัณฑ์ทุกอย่างจะผสมรวมกันในรูปแบบของเหลว ดังนั้นขั้นตอน Purification จึงมีส่วน สำคัญเป็นอย่างยิ่ง

(Khedkar, Nimbalkar, Gaikwad, Chavan, & Bankar, 2017) ศึกษาการผลิตบิวทานอล ทางชีวภาพอย่างยั่งยืน ด้วยการ ใช้ Pineapple waste ร่วมกับ แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum B527* โดยให้ความสำคัญที่การศึกษา Drying kinetic ของสับปะรด พบว่า องค์ประกอบของสับปะรดประกอบไปด้วย 35% Cellulose, 19% Hemicellulose และ 16% Lignin ด้วยการ ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ศึกษาจลพลศาสตร์การทำให้สับปะรดแห้งตั้งแต่ อุณหภูมิ 60 ถึง 120 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ทำให้สับปะรดแห้งได้ดีที่สุดคือ 120 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด ได้ผลรวมน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 97 กรัมต่อลิตร เมื่อนำไปหมักได้ผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ทั้งอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลเท่ากับ 5.23 กรัมต่อลิตร

(Amiri & Karimi, 2018) ทำการศึกษารวบรวมกระบวนการปรับสภาพและไฮโดรไลซิส วัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสสำหรับกระบวนการผลิตบิวทานอล ผลการศึกษาพบว่า การใช้ พางข้าวสาเลียมปรับสภาพด้วยวิธี Alkaline peroxide โดยใช้ Sodium hydroxide จำนวน 16 กรัม ต่อลิตร และ Hydrogen peroxide จำนวน 21 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการกำจัดเกลือที่เกิดขึ้นด้วย วิธี electro dialysis และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ มี Solid loading เท่ากับ 88.6 กรัมต่อลิตร ส่งผล ให้ได้น้ำตาลเท่ากับ 59.6 กรัมต่อลิตร เมื่อนำไปหมักแบบ ABE ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii P260* ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 22.17 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตมากถึง 0.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ถัดมาเป็นการใช้ซังข้าวโพดปรับสภาพด้วย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 2% ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซิสด้วย เอนไซม์ มี Solid loading เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ได้น้ำตาลเท่ากับ 49.5 กรัมต่อลิตร เมื่อนำไปหมักแบบ ABE ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum ATCC 824* ส่งผลให้ได้ ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 15.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตมากถึง 0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

(เอกชัย ไกลถิ่น, 2564) ทำการพัฒนา *Clostridium cochlearium* โดยใช้วิธีการกลายพันธุ์ด้วยแสงยูวี และสร้างถึงปฏิกรณ์ชีวภาพต้นแบบ พร้อมระบบควบคุมสถานะผ่านระบบอินเตอร์เน็ตของสรรพสิ่ง โดยผลการศึกษาพบว่า ที่ระยะเวลาการสาดแสงยูวีนาน 45 และ 60 วินาที พบจำนวนโคโลนีที่สามารถอยู่รอดของแบคทีเรียได้มากที่สุด จากนั้นจึงดำเนินการทดสอบความทนทานต่อบิวทานอล (Butanol tolerance) โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพได้ที่มีความเข้มข้นสูงสุดได้แก่ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ที่ความเข้มข้นของบิวทานอลเท่ากับ 1.7302 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 1.5197 กรัมต่อลิตร และแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตอะซิโตนได้สูงสุดคือแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type) ที่ความเข้มข้น 0.3852 กรัมต่อลิตร และการใช้สารตั้งต้นก็มีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อนำแบคทีเรียรหัส 45-20 ไปทำการหมักแบบ ABE ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นแบบ ปริมาตร 10 ลิตร ซึ่งมีระบบควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด - ด่าง ระหว่าง 6.5 ถึง 7.5 ควบคุมสถานะไร้ออกซิเจน พร้อมทั้งติดตามสถานะการหมักแบบ Real-time ด้วยระบบ NETPIE 2015 ซึ่งจัดเก็บข้อมูลทั้งหมดจากกระบวนการหมักบน Google sheet พบว่า ในชั่วโมงการหมักที่ 120 ผลของการผลิตบิวทานอลมีมากที่สุดเท่ากับ 29.65 กรัมต่อลิตร ส่วนเอทานอลและอะซิโตนสามารถผลิตได้สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 264 ความเข้มข้นเท่ากับ 11.30 กรัมต่อลิตร และ 0.0078 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ในส่วนของระบบพ่นก๊าซเพื่อให้เกิดสถานะไร้ออกซิเจนยังคงต้องดำเนินการด้วยผู้ควบคุมระบบเอง เนื่องด้วยระบบการทำงานขัดข้อง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

งานวิจัยฉบับนี้ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1. กระบวนการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) จากชานอ้อยและเปลือกผลไม้ ส่วนที่ 2. ส่วนการพัฒนาถึงปฏิกิริยชีวภาพ (เครื่องเก็บตัวอย่างและระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติ) และส่วนที่ 3. กระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1. กล่องควบคุม | 2. เครื่องคอมพิวเตอร์ |
| 3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง | 4. เครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำ |
| 5. เครื่องแก้ววิทยาศาสตร์ | 6. เครื่องสำรองไฟ (UPS) |
| 7. เครื่อง UV-visible spectrophotometre | 8. ตู้บ่มแบคทีเรีย |
| 9. ตู้ปลอดแบคทีเรีย | 10. ตู้อบลมร้อน |
| 11. ตะเกียงแอลกอฮอล์ | 12. ถังน้ำพลาสติก |
| 13. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ | 14. ถังก๊าซไนโตรเจน |
| 15. ถังพักก๊าซไนโตรเจน | 16. บอร์ด arduino 2560 |
| 17. บอร์ด ESP32 | 18. ปลั๊กไฟ |
| 19. ปลั๊กไฟแบบ USB | 20. วาล์วอิเล็กทรอนิกส์ |
| 21. วาล์วกันกลับ | 22. สายไฟเชื่อมบอร์ด |
| 23. หลอดเก็บตัวอย่าง | 24. Heater |
| 25. Cooling peltier plate | 26. Router Wi-Fi |
| 27. Relay | 28. Solenoid valve |
| 29. Stepper motor | 30. Terminal block |
| 31. Thermocouple | |

2. สารเคมี

- | | |
|------------|-------------------------------------|
| 1. Alcohol | 2. Agar powder |
| 3. Butanol | 4. Cobalt (II) chloride hexahydrate |

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 5. Coked Meat Medium | 6. Crystal violet |
| 7. Dettol | 8. Distillated water |
| 9. Dinitro salicylic acid | 10. Ethanol |
| 11. Glucose | 12. Glycerol |
| 13. Hydrogen peroxide | 14. Iodine solution |
| 15. Potassium dihydrogen phosphate | 16. Resazurin |
| 17. Safranin-O | 18. Sodium hydrogen carbonate |
| 19. Sodium hydroxide | 20. Sodium thioglycolate |
| 21. Trypticase peptone | 22. Yeast extract |
| 23. Magnesium sulfate heptahydrate | |

3. แบคทีเรีย *P. bifermentans*

งานวิจัยฉบับนี้ใช้แบคทีเรีย *P. bifermentans* ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปจากตะกอนเลนบ่อ กุ้งของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง ในภาคตะวันออกของประเทศไทย เก็บรักษาไว้ ณ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยใช้วิธีระบุสายพันธุ์แบบ 16sRNA Sequencing จาก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และเทคนิควิเคราะห์มวลดิ-ทอพ เอ็มเอส (MALDI-TOF MS) จาก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

4. ซอฟต์แวร์ (Software)

- | | |
|---------------------|-----------------------------|
| 1. Arduino IDE | 2. NETPIE IoT Platform 2020 |
| 3. Line Application | 4. IFTTT Platform |
| 5. Google sheet | |

วิธีการทดลอง

กระบวนการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

งานวิจัยฉบับนี้ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ ชานอ้อยและเปลือกผลไม้ โดยในการผลิตน้ำตาลโดยมีขั้นตอนดังนี้

1. กระบวนการปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอาจมีสิ่งสกปรกปะปนมาหรือมีขนาดใหญ่ ยากต่อการนำไปปรับสภาพในขั้นตอนอื่น ๆ วัสดุบางประเภทมีความชื้นสูงซึ่งส่งผลต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งสิ้น โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด มีวิธีการปรับสภาพ ดังนี้

ชานอ้อยถูกนำมาปรับสภาพด้วยวิธีการทางกล โดยล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า และตากแดดเพื่อลดความชื้นนาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ลดขนาดให้เล็กลง 2 ถึง 3 เซนติเมตร เพื่อให้สะดวกแก่การนำเข้าตู้อบลมร้อน (hot air oven) และเครื่องบด อบให้แห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะมีความชื้นน้อยกว่า 15% จากนั้นปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่น และนำไปปั่นต่อด้วยเครื่องบดสมุนไพร (graining machine) เพื่อให้เป็นผงละเอียด กรองผ่านตะแกรงร่อนสแตนเลส (sieve) ขนาด 40 Mesh ซึ่งสามารถกรองได้ที่มีความละเอียด 0.425 มิลลิเมตร (425 ไมโครเมตร) (Srisang & Chavalparit, 2014) เมื่อเสร็จ ทำการอบเพื่อไล่ความชื้นอีกครั้งที่สภาวะเดิมนาน 12 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ เก็บรักษาไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) และสามารถนำไปใช้ในกระบวนการไฮโดรไลซิสเป็นขั้นตอนต่อไป หากไม่นำไปใช้ทันที เมื่อเสร็จสิ้นการปรับสภาพด้วยวิธีการทางกายภาพให้นำสารตั้งต้นเก็บรักษาไว้ในโถดูดความชื้น จนกว่าจะมีการนำมาใช้งานอีกครั้ง

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยทำการโดยทำการกำหนดอัตราส่วนชานอ้อยตั้งแต่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, และ 10 กรัมชานอ้อย ต่อ สารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.5 M ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ดังภาพที่ 3-1 ดำเนินการปรับสภาพในเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที แต่ที่ปริมาณชานอ้อย 10 กรัมเมื่อเติมสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป ชานอ้อยดูดซับสารละลายทั้งหมดส่งผลให้ไม่มีของเหลวในขวดรูปชมพู่คงเหลือ ซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และไม่สามารถนำไปเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพได้ ดังภาพที่ 3-2 จึงเหลือปริมาณชานอ้อยที่ 1 ถึง 9 กรัม เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังภาพที่ 3-3 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการปรับสภาพมากที่สุดคือ ที่ชานอ้อย 9 กรัม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 26.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการปรับสภาพในขั้นตอนนี้จะแปรผันตรงกับปริมาณชานอ้อยที่ใช้ในกระบวนการ เมื่อปริมาณชานอ้อยเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้นด้วย และรองลงมาคือ ปริมาณชานอ้อย 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 กรัม มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 18.51, 16.93, 11.43, 8.10, 4.26, 1.76, 0.78 กรัมต่อลิตร และที่ปริมาณชานอ้อย 1 กรัม ไม่พบน้ำตาลรีดิวซ์ จึงใช้

อัตราส่วนที่ 9 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรในการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ และทำการเพิ่มขนาดเป็น 5 เท่า จึงได้
อัตราส่วนขานอ้อย 45 กรัม ต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3-1 ปริมาณขานอ้อยตั้งแต่ 1 ถึง 9 กรัมต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3-2 ปริมาณขานอ้อย 10 กรัม ซึ่งไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพได้



ภาพที่ 3-3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

จากนั้นขานอ้อยจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพทางเคมีด้วยวิธี Alkaline pretreatment โดยสามารถเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1.5 M และใช้ปริมาณขานอ้อย 45 กรัม สภาวะในการไฮโดรไลซิส ควบคุมอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดำเนินการในเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำ ดังภาพที่ 3-4 และทำการกำจัดต่างด้วยการล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนจนค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 6.5 ถึง 7.5 และนำเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสอีกครั้งภายใต้สภาวะเดิม



ภาพที่ 3-4 ขานอ้อยระหว่างเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพด้วยวิธี Alkaline pretreatment

เปลือกผลไม้ (เปลือกสับปะรด และเปลือกแตงโม) เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณลิกนินค่อนข้างน้อยจึงไม่จำเป็นต้องนำเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพด้วยวิธี Alkaline pretreatment เพื่อกำจัดลิกนินออก อีกทั้งเปลือกผลไม้มักถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วด้วยแบคทีเรียเนื่องจากเปลือกผลไม้ มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรีย อีกทั้งสภาพอากาศของประเทศไทยซึ่งเป็นเขตร้อนชื้นส่งผลให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องนำเปลือกผลไม้เข้าสู่กระบวนการปรับสภาพโดยเร็ว โดยเริ่มต้นจากลดขนาดเปลือกผลไม้ให้เล็กลง 2 ถึง 3 เซนติเมตร เพื่อให้สะดวกแก่การนำเข้าสู่เครื่องปั่นผลไม้ เติมน้ำลงไปเล็กน้อยก่อนเริ่มต้นปั่น ปั่นให้เปลือกผลไม้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนของแข็งออก และนำส่วนของเหลวเข้าเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เปลือกผลไม้ปราศจากแบคทีเรียแบคทีเรียอื่นใด ดังภาพที่ 3-5 และเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 องศาเซลเซียสเพื่อชะลอการ

ย่อยสลายและใช้น้ำตาลของแบคทีเรีย หากเก็บไว้เป็นระยะเวลาสั้น ก่อนการใช้งานควรนำไปตรวจความเข้มข้นของน้ำตาลอีกครั้งก่อนการใช้งาน



(ก)

(ข)

ภาพที่ 3-5 เปลือกผลไม้หลังผ่านกระบวนการปรับสภาพ (ก.) เปลือกแตงโม (ข.) เปลือกสับปะรด

2. กระบวนการไฮโดรไลซิส

งานวิจัยนี้ใช้วิธีการไฮโดรไลซิสด้วยวิธี Steam hydrolysis วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด จะถูกนำเข้าสู่เครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยชานอ้อยใช้ปริมาณ 45 มิลลิกรัมต่อน้ำปราศจากไอออนปริมาณ 500 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับกับเปลือกผลไม้ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการไฮโดรไลซิสจะต้องแยกส่วนของแข็งและส่วนของเหลวออกจากกันด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 4 องศาเซลเซียสเพื่อชะลอการย่อยสลายและใช้น้ำตาลของแบคทีเรีย หากเก็บไว้เป็นระยะเวลาสั้น ก่อนการใช้งานควรนำไปตรวจความเข้มข้นของน้ำตาลและนำไปฆ่าแบคทีเรียในเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำอีกครั้งก่อนการใช้งาน

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitro salicylic acid: DNS

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการไฮโดรไลซิส เพื่อให้ทราบถึงปริมาณน้ำตาลซึ่งได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสจึงต้องนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้สารละลายตัวอย่างปริมาณ 2 มิลลิลิตร กับปฏิกิริยากับสารละลาย DNS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 3 ถึง 5 นาที จากนั้นนำออกมาพักไว้ให้เป็นอุณหภูมิห้อง และนำไปเจือจางในอัตราส่วนสารละลาย DNS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่อ สารละลายตัวอย่างปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometre ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งจะทำให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Standard curve) โดยกราฟมาตรฐานมีความเข้มข้น

ของน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ช่วง 0 ถึง 30 กรัมต่อลิตร สร้างได้จากการสารถละลายกลูโคสทำปฏิกิริยากับสารถละลาย DNS ที่ความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ดังภาพที่ 3-6



ภาพที่ 3-6 การเตรียมสารถละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์หาปริมาณลิกนินด้วยวิธี Cysteine-Assisted Sulfuric Acid (CASA) (Lu, Wang, Chen, Yue, & Ralph, 2021)

ก่อนเริ่มกระบวนการปรับสภาพชานอ้อยและหลังปรับสภาพชานอ้อย มีการวัดปริมาณลิกนินโดย โดยสามารถทำได้ดังนี้

เริ่มต้นด้วยการนำเอาชานอ้อยกรองผ่านซีฟ ขนาด 40 mesh จากนั้นนำชานอ้อย 2 กรัม ผสมเข้ากับสารถละลายเบนซินและเอทานอลที่ผสมกันไว้แล้วในอัตราส่วน 2:1 V/V เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา เติมเอทานอล 95% ลงไป 40 มิลลิลิตร และกวนทิ้งไว้นาน 12 ชั่วโมง ดังภาพที่ 3-7 เมื่อครบระยะเวลา นำส่วนของแข็งมาล้างด้วยเอทานอล 95% และน้ำสะอาดปราศจากไอออน (DI Water) 2 ถึง 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนของแข็งไปต้มในน้ำร้อนปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา นำส่วนของแข็งไปล้างด้วยน้ำร้อนอีกครั้ง และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าชานอ้อยจะแห้งสนิท จากนั้นเตรียม Cysteine Stock Solution ด้วยการนำสาร Cysteine-Assisted (CA) ปริมาตร 10 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริก (SA) ความเข้มข้น 72% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำชานอ้อย 5 มิลลิกรัม ผสมเข้ากับสารถละลาย

Cysteine Stock Solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที นาน 60 นาที เมื่อครบระยะเวลาทำการปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 283 นาโนเมตร



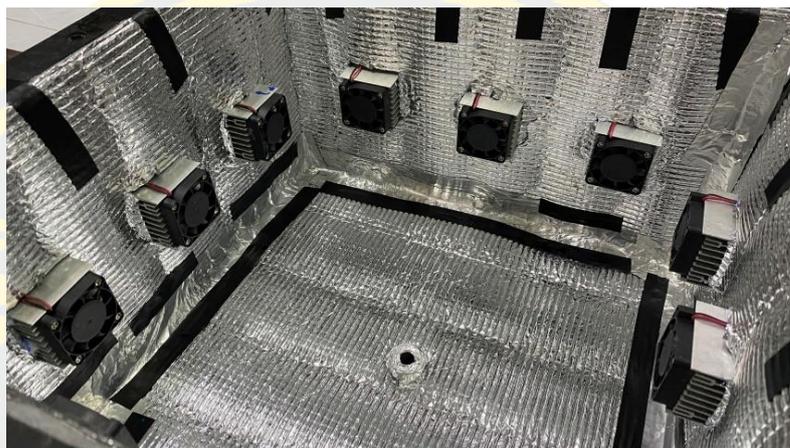
ภาพที่ 3-7 การสกัดหาปริมาณลิกันินในซานอ้อย

การพัฒนาถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ

1. การออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

1.1 วัสดุ (Material) เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติมีการติดตั้งชุดทำความเย็นทั้งหมด 4 ชุดภายในเครื่อง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความชื้น หรือมีหยดน้ำในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติระหว่างหรือเมื่อสิ้นสุดการใช้งาน อีกทั้งสารตัวอย่างซึ่งถูกลำเลียงมาเก็บยังหลุดเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่างอาจมีการกระเด็นของตัวอย่างเล็กน้อย ด้วยปัญหาดังกล่าวนี้อาจส่งผลให้เกิดสนิมหรือเกิดการกัดกร่อนภายในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ ดังนั้นผู้ออกแบบจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของการเลือกวัสดุที่มีคุณภาพ ราคาไม่สูงมาก และทนการกัดกร่อนได้เป็นอย่างดี มีระยะเวลาการใช้ที่ยาวนาน โดยวัสดุที่มีคุณสมบัติดังกล่าวในข้างต้น คือ สแตนเลส ซึ่งได้รับนิยมในงานด้านอุตสาหกรรมเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะสแตนเลสเกรด 304 พบเห็นได้บ่อยในงานด้านอุตสาหกรรม โรงพยาบาล หรือในครัวเรือน ชื่อที่นิยมเรียกในท้องตลาดอีกชื่อคือ เหล็กกล้าไร้สนิม เป็นสแตนเลสในกลุ่มออสเทนนิติก (Austenitic stainless steel) เป็นเกรดที่ใช้งานแพร่หลายมากที่สุดถึง 70% มีจุดเด่น ในด้านความทนทาน มีความเหนียวสูง สามารถนำมาขึ้นรูปได้ง่าย ไม่ดูดซึ่มสารและกลืน มีคาร์บอนต่ำจึงมีความเหนียวสูง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่าการนำความร้อน (Thermal conductivity; K) ของสแตนเลส 304 พบว่า มีค่า K เท่ากับ 16.2 W/m·K (Assael &

Gialou, 2003) ซึ่งถือว่ามีค่าการนำความร้อนที่สูงเมื่อเทียบกับฉนวนกันความร้อนชนิดโพลีเอทิลีน (Polyurethane insulators) ที่มีค่า K น้อยกว่า 0.1 W/m·K (Carrico, Fraga, Carvalho, & Pasa, 2017) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องหุ้มฉนวนกันความร้อนชนิดโพลีเอทิลีนเพื่อลดการถ่ายโอนความร้อนเข้าสู่เครื่องเก็บตัวอย่างดังภาพที่ 3-8



ภาพที่ 3-8 ลักษณะการหุ้มฉนวนชนิดโพลีเอทิลีนในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

1.2 ขนาดของแผ่นจานหมุน เริ่มต้นด้วยการกำหนดจำนวนหลอด ในงานวิจัยฉบับนี้ กำหนดจำนวนหลอดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 24 หลอด แต่ละหลอดมีปริมาตร 15 มิลลิลิตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร และยาว 12 เซนติเมตร คำนวณหามุมจุดศูนย์กลางระหว่างหลอดเก็บตัวอย่าง (The central angle of the arc; θ) ดังสมการที่ 3-1

$$\text{จำนวนหลอด} = \frac{360}{\theta} \quad (3-1)$$

แทนค่าสมการได้ดังนี้

$$\theta = \frac{360}{24}$$

$$\theta = 15$$

ดังนั้น มุมจุดศูนย์กลางระหว่างหลอดเก็บตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 15 องศา

จากนั้นทำการคำนวณดังสมการที่ 3-2

$$\text{arc length} = 2\pi r \left(\frac{\theta}{360} \right) \quad (3-2)$$

ย้ายข้างสมการเพื่อหาค่ารัศมีของวงกลม (r) ได้ดังนี้

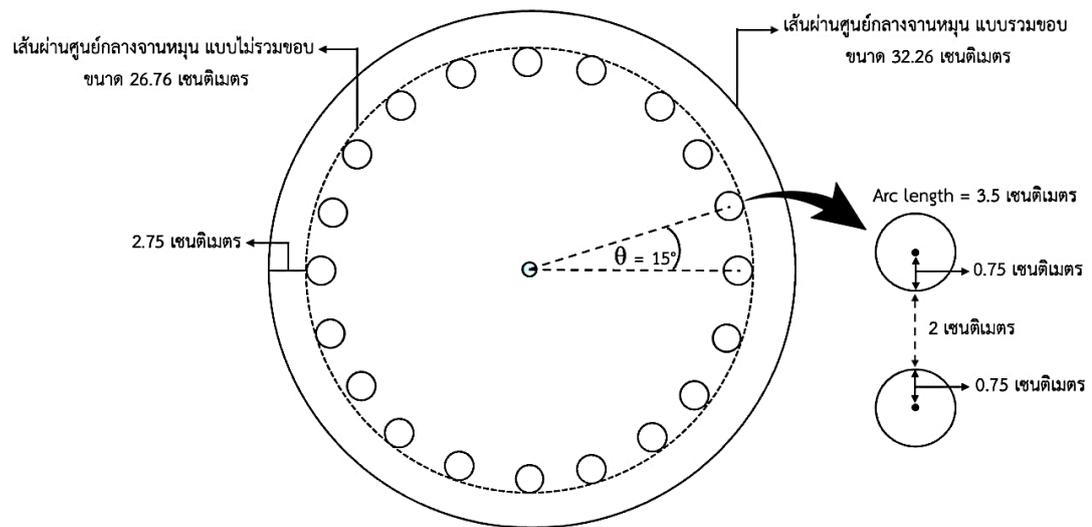
$$r = \frac{\text{arc length}}{\frac{\theta}{360} \times 2\pi}$$

โดยที่ arc length หาได้จาก รัศมีของหลอดที่ X และรัศมีของหลอดที่ Y และระยะห่างระหว่างหลอดที่ X ไปยังหลอดที่ Y (วัดจากขอบของหลอดเก็บตัวอย่าง) จากข้อมูลข้างต้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเก็บตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 1.5 เซนติเมตร ดังนั้นรัศมีของหลอด X และ Y จึงมีค่าเท่ากับ 1.5 เซนติเมตร (0.75 + 0.75 เซนติเมตร) และผู้วิจัยได้กำหนดระยะห่างของแต่ละหลอดให้มีความห่างเท่ากับ 2 เซนติเมตร ดังนั้นค่า arc length จึงมีค่าเท่ากับ 3.5 เซนติเมตร (1.5 เซนติเมตร + 2 เซนติเมตร) ทำการแทนค่าสมการที่ 3.2 ได้ดังนี้

$$r = \frac{3.5}{\frac{15}{360} \times 2(3.14)}$$

$r = 13.38$ เซนติเมตร

ดังนั้น ค่ารัศมีของวงกลม จึงมีค่าเท่ากับ 13.38 เซนติเมตร หรือคิดเป็นขนาดของแผ่นจานหมุนแบบไม่รวมขอบของแผ่นจานจะมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 26.76 เซนติเมตร (13.38 + 13.38 เซนติเมตร) และทำการเพิ่มขอบของแผ่นจานหมุนเข้าไปเนื่องจากในขั้นแรกผู้วิจัยทำการคำนวณแบบไม่คิดระยะห่างจากหลอดไปยังขอบของแผ่นจานหมุน โดยเพิ่มระยะขอบแผ่นจานหมุน ทั้งซ้ายและขวา ข้างละ 2.75 เซนติเมตร ส่งผลให้ขนาดของแผ่นจานหมุนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 32.26 เซนติเมตร ทำจากแผ่นอะคริลิคความหนา 1.5 มิลลิเมตร แผ่นจานหมุนมีขนาดกว้าง \times ยาวเท่ากับ 31 \times 31 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของเสาที่ยึดแผ่นจานหมุนมีขนาดเท่ากับแกนของมอเตอร์ที่ใช้หมุนแผ่นจาน คือ 10 มิลลิเมตร ช่องแต่ละช่องสำหรับใส่หลอดเก็บตัวอย่างมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 16.00 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 3-9



ภาพที่ 3-9 ขนาดแผ่นจานหมุนใส่หลอดเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

1.3 ขนาดของกรวยสำหรับใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง เนื่องจากเส้นผ่านศูนย์กลางของปากหลอดเก็บตัวอย่างมีความกว้างเพียง 1.5 เซนติเมตร ส่งผลให้การจ่ายน้ำหมักลงในหลอดเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งอาจเกิดหก จ่ำยลงไม่ตรงช่องของหลอด อีกทั้งมอเตอร์หมุนเองมีค่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นในการหมุนแต่ละครั้งจึงส่งผลให้ในบางครั้งอาจหมุนไปอยู่ในตำแหน่งที่ไม่ใช่กึ่งกลางของปากหลอด และเพื่อป้องกันการหกของน้ำหมักที่อาจเกิดขึ้นในช่วงของการเก็บตัวอย่าง ผู้วิจัยจึงออกแบบกรวยสำหรับใส่น้ำหมัก และใช้เครื่องพิมพ์ 3 มิติ ขึ้นรูปกรวยโดยมีหลักการดังสมการที่ 3-3

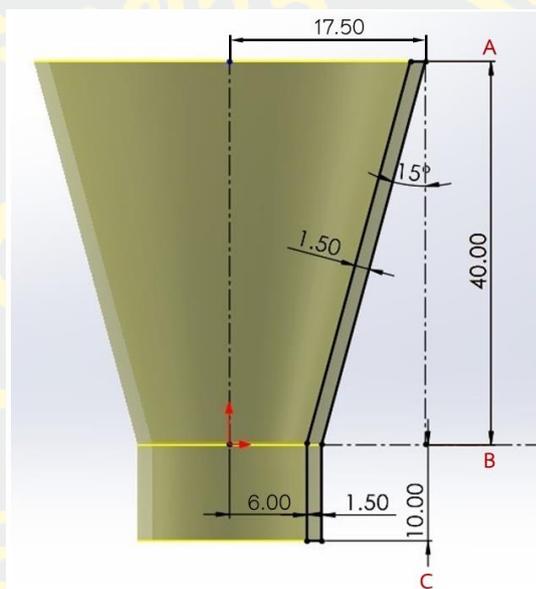
$$r = \frac{\text{arc length}}{2} \quad (3-3)$$

เมื่อ arc length มีค่าเท่ากับ 3.5 เซนติเมตร และขนาดของกรวยที่ใส่ลงไปหลอดที่ X และหลอดที่ Y ต้องติดกันพอดีเพื่อให้ได้ขนาดปากกรวยที่ใหญ่ที่สุดเพื่อป้องกันการหกของน้ำหมักจึงสามารถแทนค่าสมการที่ 3-3 ได้ดังนี้

$$r = \frac{3.5}{2}$$

$$r = 1.75 \text{ เซนติเมตร}$$

ดังนั้น รัศมีของกรวยจึงมีขนาดเท่ากับ 1.75 เซนติเมตร และกรวยมีเส้นรอบวงด้านนอก (Outside Diameter; OD) เท่ากับ 35.00 มิลลิเมตร และเส้นรอบวงด้านใน (Inside Diameter; ID) เท่ากับ 32.00 เซนติเมตร มีความหนาเท่ากับ 1.50 มิลลิเมตร ความสูงโดยรวมของกรวยตั้งแต่จุด A ถึงจุด C เท่ากับ 50.00 มิลลิเมตร แบ่งเป็นความสูงจากจุด A ถึงจุด B เท่ากับ 40.00 มิลลิเมตร และความสูงจากจุด B ถึงจุด C เท่ากับ 10.00 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 3-10



ภาพที่ 3-10 สัดส่วนและขนาดของกรวยสำหรับใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง

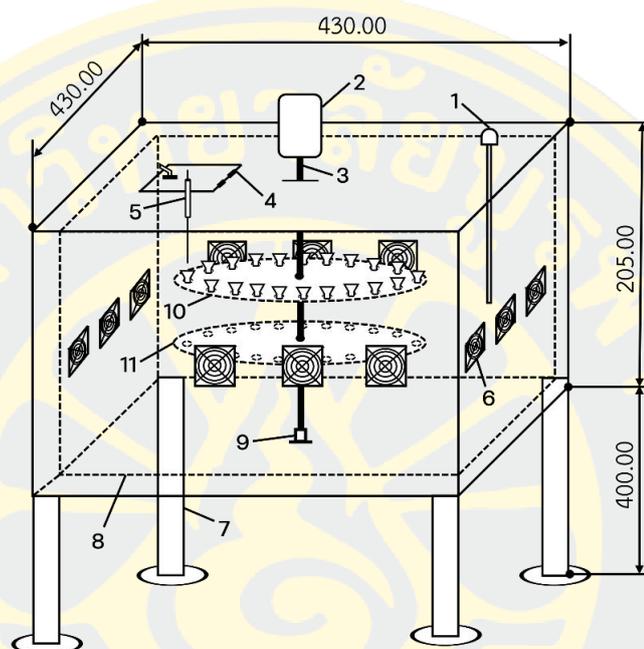
1.4 ขนาดและสัดส่วนของเครื่องเก็บตัวอย่าง จากการกำหนดจำนวนหลอดบนแผ่นจานหมุนและคำนวณขนาดของแผ่นจานหมุนในหัวข้อที่ 1.2 ทำให้สามารถออกแบบขนาดของเครื่องเก็บตัวอย่างดังภาพที่ 3-11 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. มุมมองด้านบน (Top view) เป็นสี่เหลี่ยมด้านเท่า ขนาดกว้างxยาว เท่ากับ 430.00 มิลลิเมตร x 430.00 มิลลิเมตร ติดตั้งเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิ (หมายเลข 1) ติดตั้งสตีปเปอร์มอเตอร์ (หมายเลข 2) เชื่อมติดกับแกนหมุน (หมายเลข 3) มีช่องสำหรับเปิด-ปิดเก็บหลอดตัวอย่าง กว้างxยาว เท่ากับ 80.00 มิลลิเมตร x 120.00 มิลลิเมตร (หมายเลข 4) ซึ่งเชื่อมติดอยู่กับช่องจ่ายสาร (หมายเลข 5)

2. มุมมองด้านข้างทั้ง 4 ด้าน (Side view) กว้างxยาว เท่ากับ 160.00 มิลลิเมตร x 420.00 มิลลิเมตร และติดตั้งชุดทำความเย็นทั้ง 4 ด้าน ด้านละ 1 ชุด (หมายเลข 6)

3. ขาตั้งเครื่องมีความสูง 400.00 มิลลิเมตร (หมายเลข 7)

4. ด้านในเครื่องเป็นสี่เหลี่ยมด้านเท่า ขนาดกว้างxยาว เท่ากับ 370.00 มิลลิเมตร x 370.00 มิลลิเมตร (หมายเลข 8) โดยด้านในติดตั้งฐานล็อกแกนหมุน (หมายเลข 9) และมีจานสำหรับใส่หลอดเก็บตัวอย่างจำนวน 2 ชั้น (หมายเลข 10 และ 11) ซึ่งออกแบบดังหัวข้อที่ 1.2



ภาพที่ 3-11 การออกแบบขนาดและสัดส่วนเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

2. ระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจน ระบบพ่นก๊าซอัตโนมัติเป็นระบบที่ช่วยในการควบคุมปริมาณก๊าซออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ด้วยการพ่นก๊าซไนโตรเจนแบบอัตโนมัติเพื่อแทนที่ก๊าซออกซิเจนจนเกิดเป็นสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ในการผลิตชีวทานอลของแบคทีเรีย *P. bifermentans* ดังนั้นการควบคุมปริมาณก๊าซออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์จึงเป็นหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อกระบวนการผลิตชีวทานอลทางชีวภาพ โดยระบบประกอบไปด้วย A ถังก๊าซไนโตรเจนแรงดันสูง (High pressure tank) ขนาด 2.0 คิว ความดันประมาณ 137.00 เอทีเอ็ม สำหรับกักเก็บและบรรจุก๊าซไนโตรเจนความดันสูง B ถังก๊าซไนโตรเจนแรงดันต่ำ (Low pressure tank) ขนาด 1.5 คิว ความดันประมาณ 40.00 เอทีเอ็ม ใช้พ่นก๊าซไนโตรเจนความดันต่ำ เพื่อรพ่นเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ C วาล์วกันกลับ (Check valve) ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดการไหลกลับของก๊าซไนโตรเจนจากถัง B ไปยังถัง A และส่วนสุดท้ายคือ D โซลินอยด์วาล์ว (Solenoid valve) ทำหน้าที่ควบคุมการปล่อยก๊าซไนโตรเจนไปยังถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยในกรณีที่เซ็นเซอร์ตรวจจับก๊าซออกซิเจน ตรวจไม่พบก๊าซออกซิเจน โซลินอยด์วาล์วจะปิดการทำงาน และจะเปิดการทำงานเมื่อพบ

การรั่วไหลของก๊าซออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและปิดการทำงานอีกครั้งเมื่อเซ็นเซอร์ตรวจไม่พบก๊าซออกซิเจนหรือค่าออกซิเจนน้อยกว่าที่ตั้งค่าไว้ ดังภาพที่ 3-12

โดยจากความจุ 1.5 คิว (1500 ลิตร) สามารถคำนวณจำนวนรอบการพ่นก๊าซไนโตรเจนเพื่อแทนที่ก๊าซออกซิเจนได้ด้วยสมการที่ 3-4

$$PV = nRT \quad (3-4)$$

ทำการย้ายข้างสมการ คำนวณหาจำนวนโมลของไนโตรเจน (n) เพื่อให้ทราบถึงปริมาณก๊าซไนโตรเจนภายในถังแรงดันต่ำได้ดังนี้

$$n = \frac{PV}{RT}$$

แทนค่าสมการที่ 3-4 ได้ดังนี้

$$n = \frac{40 \text{ atm} \times 1500 \text{ L} \times \text{K-Mol}}{0.08206 \text{ L}\cdot\text{atm} \times 298.15 \text{ K}}$$

$$n = \frac{60000}{24.4661}$$

$$n = 2,452.37 \text{ mol}$$

ดังนั้น จำนวนโมลของไนโตรเจนในถังพ่นก๊าซแรงดันต่ำเท่ากับ 2,452.37 mol ที่ความดัน 40.00 เอทีเอ็ม และเมื่อทราบจำนวนโมลของก๊าซไนโตรเจน จึงทำการคำนวณหาปริมาตรก๊าซไนโตรเจนเมื่ออยู่ในสถานะ Standard Temperature and Pressure (STP) ซึ่งเป็นสถานะที่ก๊าซถูกปล่อยออกมาใช้งานโดยคำนวณด้วยสมการที่ 3-4 และย้ายข้างสมการเพื่อหาปริมาตรของก๊าซไนโตรเจน (V) ที่สถานะ STP ได้ดังนี้

$$V = \frac{nRT}{P}$$

แทนค่าสมการได้ดังนี้

$$V = \frac{2452.37 \text{ mol} \times 0.08206 \text{ L}\cdot\text{atm} \times 298.15 \text{ K}}{\text{K}\cdot\text{Mol} \times 1 \text{ atm}}$$

$$V = 60,000 \text{ ลิตร}$$

ดังนั้น เมื่อสถานะ STP ก๊าซไนโตรเจนจะมีปริมาตรทั้งหมด 60,000 ลิตร และพื้นที่ว่างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ 4 ลิตร ในการพ่นก๊าซไนโตรเจน 1 ครั้งจะใช้ก๊าซไนโตรเจนทั้งหมด 4 ลิตรเพื่อแทนที่ก๊าซออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จำคำนวณรอบการพ่นก๊าซไนโตรเจนสูงสุดได้ดังนี้

$$\text{รอบการพ่น (ครั้ง)} = \frac{60000 \text{ L}}{4 \text{ L}}$$

$$\text{รอบการพ่น} = 15,000 \text{ ครั้ง}$$

จึงสรุปได้ว่า ก๊าซไนโตรเจน 1.5 คิว ที่ความดันประมาณ 40.00 เอทีเอ็ม มีจำนวนโมลของก๊าซไนโตรเจนในถังความดันต่ำเท่ากับ 2452.37 โมล สามารถพ่นเพื่อแทนที่ก๊าซออกซิเจนได้สูงสุด 15,000 รอบ ในกรณีที่ใช้ก๊าซไนโตรเจน 4 ลิตรต่อการพ่นก๊าซ 1 ครั้งแบบคงที่ตลอดเวลา แต่หากในการพ่นแต่ละรอบใช้ก๊าซไนโตรเจนมากกว่า 4 ลิตร จะส่งผลให้จำนวนรอบในการพ่นลดลงตามไปด้วย



ภาพที่ 3-12 ระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3. กล่องควบคุมระบบเก็บตัวอย่างอัตโนมัติและระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจน มีการใช้บอร์ดควบคุมซึ่งคือ Arduino โดยเป็น Platform micro controller มีหน้าที่ในการเชื่อมต่อเพื่อทำหน้าที่รับ - ส่งข้อมูลระหว่างบอร์ด หรือทำหน้าที่ควบคุมอุปกรณ์ต่าง ๆ ในกระบวนการโดยกล่องควบคุมถูกออกแบบให้ประกอบไปด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังภาพที่ 3-13 ดังนี้

หมายเลข 1. สวิตชิงเพาเวอร์ซัพพลาย จ่ายไฟฟ้ากระแสตรง 83 แอมป์ 1000 วัตต์

หมายเลข 2. terminal block จำนวน 8 ช่อง

หมายเลข 3. รีเลย์โมดูล 12VDC แบบ Active low จำนวน 2 ช่อง

หมายเลข 4. บอร์ด Arduino

หมายเลข 5 บอร์ด ESP-32 และบอร์ดขนมปัง

หมายเลข 6 ตัวขับเคลื่อนมอเตอร์ TB6600 (HY-DIV268N-5A) 12-48 VDC 2-Phase

หมายเลข 7 ช่องสำหรับระบายอากาศ และตะแกรงกันชื้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ

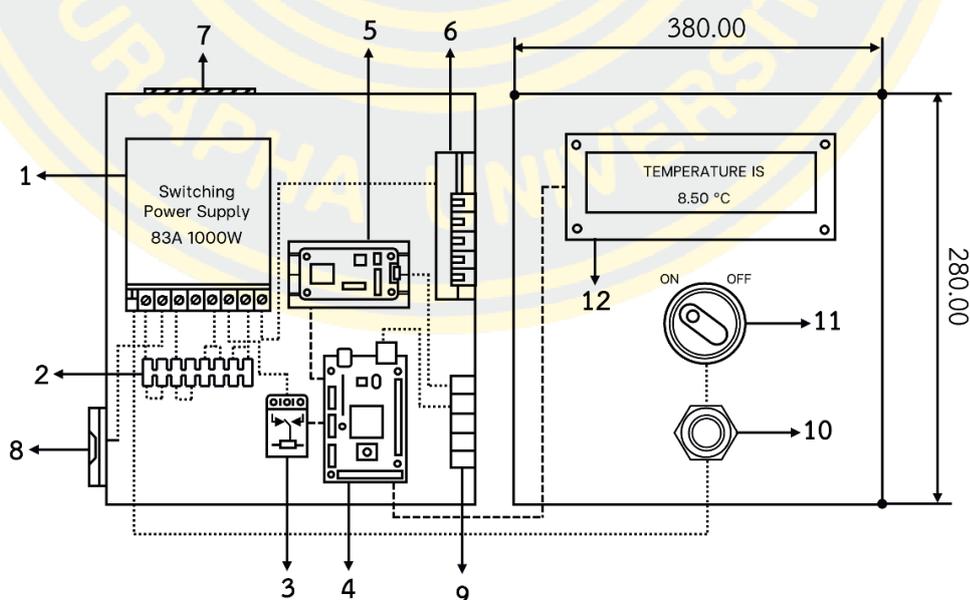
หมายเลข 8 พัดลมดูดอากาศ Brushless DC Fav 9225HSL 12V 0.30 แอมป์

หมายเลข 9 USB Port hub จำนวน 4 ช่อง

หมายเลข 10 Pilot lamp 22 มิลลิเมตร DC 12V

หมายเลข 11 Selector switch 2 Position 10A

หมายเลข 12 LCD Display I2C Blue Backlight 5V รุ่น LCD1602 ขนาด 16x2



ภาพที่ 3-13 อุปกรณ์ภายในกล่องควบคุมและการสั่งการระบบเก็บตัวอย่างอัตโนมัติและควบคุมสถานะไร้ออกซิเจน

จากรายละเอียดข้างต้นของอุปกรณ์ที่อยู่ภายในกล่องควบคุม อุปกรณ์หลักซึ่งเป็นอุปกรณ์ชิ้นสำคัญที่เปรียบเสมือนโรงงานไฟฟ้าที่ทำหน้าที่จ่ายกระแสไฟฟ้าให้อุปกรณ์ต่าง ๆ คือ สวิตซ์িংเพาเวอร์ซัพพลายเชื่อมต่อกับอุปกรณ์ดังภาพที่ 3-14 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

หมายเลข 1 พัดลมดูดอากาศ Brushless DC Fav 9225HSL 12V 0.30 แอมป์ สำหรับดูดอากาศจากภายนอกกล่องเข้ามาในกล่องควบคุมและระบายออกทางช่องระบายอากาศ

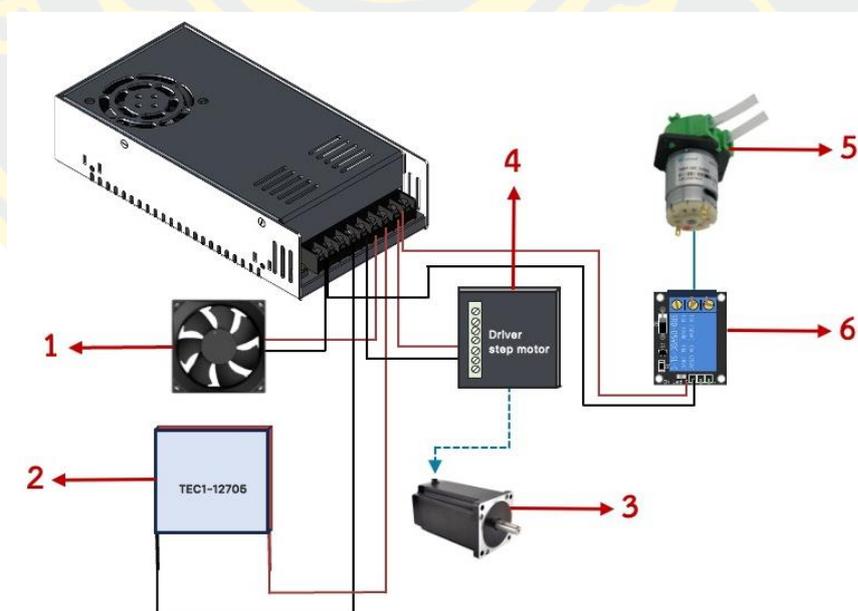
หมายเลข 2 แผ่นทำความเย็น TEC1-12705 12VDC 3.19A 38W ในชุดทำความเย็นทำหน้าที่ลดอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

หมายเลข 3 สเต็ปเปอร์มอเตอร์ Zhengji (Nema-23) Torque 3.6 N.m 4A Shaft 10 mm. (J-5718HB6401) ทำหน้าที่หมุนจานหมุนที่ใส่หลอดเก็บตัวอย่าง

หมายเลข 4 ตัวขับมอเตอร์ TB6600 (HY-DIV268N-5A) 12-48 VDC 2-Phase ทำหน้าที่จ่ายกระแสไฟให้แก่สเต็ปเปอร์มอเตอร์เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการหมุนของสเต็ปเปอร์มอเตอร์

หมายเลข 5 ปั๊มดูดสารขนาดเล็ก (Peristaltic dosing pump) 12VDC flowrate 39 มิลลิลิตรต่อนาที ทำหน้าที่ดูดน้ำหมักจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพและจ่ายลงหลอดเก็บตัวอย่าง

หมายเลข 6 รีเลย์โมดูล 12V แบบ Active low จำนวน 2 ช่อง ทำหน้าที่เป็นสะพานไฟสำหรับสั่งการให้ปั๊มเปิดหรือปิดการทำงาน โดยรีเลย์จะถูกควบคุมการเปิด - ปิดด้วยบอร์ด Arduino



ภาพที่ 3-14 อุปกรณ์ที่ได้รับกระแสไฟจากสวิตซ์িংเพาเวอร์ซัพพลายในกล่องควบคุม

บอร์ด Arduino และบอร์ด ESP-32 ซึ่งอยู่ภายในกล่องควบคุมเป็นชิ้นส่วนที่สำคัญไม่น้อยไปกว่าสวิตชิงเพาเวอร์ซัพพลาย เปรียบเสมือนสมองที่ทำหน้าที่คอยสั่งการ รับ - ส่งข้อมูล และประมวลผลทั้งหมดของระบบ โดยบอร์ด Arduino และบอร์ด ESP-32 เชื่อมต่อกับอุปกรณ์ต่าง ๆ ทั้งนอกกล่องควบคุม และในกล่องควบคุมดังภาพที่ 3-15 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

หมายเลข 1 โมดูลเซ็นเซอร์อุณหภูมิ MAX6675 3.0 ถึง 5.0V ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 0.25 องศาเซลเซียส สำหรับใช้งานร่วมกับเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิ

หมายเลข 2 โพรบเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิ 1 ไร่ เค (Thermocouple Type K) 12 บิต ส่งสัญญาณแบบดิจิทัล ทำงานในช่วงอุณหภูมิ 0 ถึง 800 องศาเซลเซียส ที่ 3.0 ถึง 5.0V ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 0.25 องศาเซลเซียส ทำหน้าที่วัดอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่าง

หมายเลข 3 บอร์ดขนมปัง (Breadboard) ขนาด 400 จุด ใช้สำหรับเพิ่มพื้นที่การเชื่อมต่อวงจรกระแสไฟฟ้าให้แก่อุปกรณ์ต่าง ๆ ทั้งยังใช้สำหรับเชื่อมสายดิน (Ground line) อีกด้วย เช่น บนบอร์ด Arduino มีช่องจ่ายไฟ 5V เพียง 2 ช่อง สามารถเชื่อมไฟ 5V จากบอร์ด Arduino ลงบนบอร์ดขนมปังเพื่อเพิ่มจำนวนช่องไฟ 5V ให้เป็น 5 ช่องได้

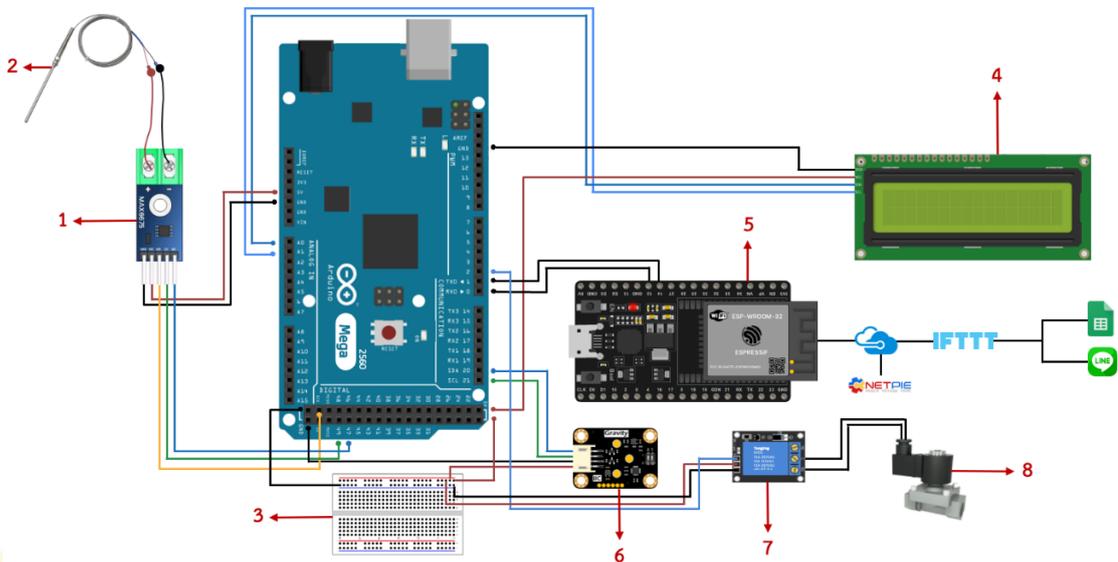
หมายเลข 4 หน้าจอ Arduino LCD 1602 จอ 16 ตัวอักษร 2 บรรทัด แบบ I2C 5V ใช้สำหรับแสดงค่าอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่าง

หมายเลข 5 บอร์ด ESP-32 ใช้ไฟ 5V มีหน้าที่เชื่อมต่อกับ NETPIE2020, IFTTT Platform และรับข้อมูลจากบอร์ด Arduino คือ ค่าอุณหภูมิ ค่าออกซิเจน และรอบการเก็บตัวอย่าง ส่งไปเก็บไว้ยัง Google sheet แจ้งเตือนรอบการเก็บผ่านทาง line notify และ ติดตามหรือควบคุมสถานะผ่าน NETPIE2020

หมายเลข 6 เซ็นเซอร์ตรวจวัดค่าออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ DF Robot Gravity Electrochemical Oxygen Sensor ทำงานในช่วงค่าออกซิเจน 0 ถึง 25% Vol แบบ I2C 3.3 ถึง 5V ค่าความคลาดเคลื่อนที่ 0.15% Vol ทำงานในช่วงอุณหภูมิ ติดลบ 20 องศาเซลเซียส ถึง 50 องศาเซลเซียส

หมายเลข 7 รีเลย์โมดูล 12V แบบ Active low จำนวน 2 ช่อง ทำหน้าที่เป็นสะพานไฟสำหรับสั่งการเปิด หรือ ปิดโซลินอยด์วาล์ว

หมายเลข 8 โซลินอยด์วาล์ว รุ่น KL523-08 2/2 Normal Close; NC ใช้กระแสไฟแบบ AC 220V ทนแรงดันสูงสุดที่ 50 บาร์ สามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุด 180 องศาเซลเซียส เกลียวขนาด 1/4" ทำหน้าที่เปิดประตูให้ก๊าซไนโตรเจนผ่านเข้าไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ หรือปิดไม่ให้ก๊าซไนโตรเจนผ่านในกรณีเซ็นเซอร์ตรวจไม่พบก๊าซออกซิเจน



ภาพที่ 3-15 อุปกรณ์ที่เชื่อมต่ออยู่กับบอร์ด Arduino และบอร์ด ESP-32

4. ระบบควบคุมและติดตามสถานะการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ ผู้ใช้งานสามารถติดตามสถานะต่าง ๆ ในระหว่างกระบวนการหมักดำเนินการอยู่ เช่น ค่าออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ค่าอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่าง ได้ผ่าน NETPIE2020 Application, Google sheet และ Line application ซึ่งสามารถดาวน์โหลดทั้งในระบบปฏิบัติการ iOS และ Android อธิบายลักษณะการทำงานได้ดังภาพที่ 3-16 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

หมายเลข 1 บอร์ด Arduino รับกระแสไฟตั้งแต่ 5 ถึง 20V ทำหน้าที่ประมวลผลคำสั่งต่าง ๆ รับค่าจากเซ็นเซอร์ทุกตัวในระบบ และส่งค่าจากเซ็นเซอร์ไปยังหมายเลข 2

หมายเลข 2 บอร์ด ESP-32 Dev Kit แบบ 32 บิต รองรับแรงดันไฟ 2.6 ถึง 3V ทำหน้าที่เชื่อม Wi-Fi และ Bluetooth และส่งค่าที่รับมาจาก Arduino ไปยังหมายเลข 3

หมายเลข 3 Cloud server เป็นเครื่องคอมพิวเตอร์ชนิดหนึ่งสำหรับเก็บข้อมูลและบริการสิ่งต่าง ๆ ตามคำร้องขอของผู้ใช้งาน (Client) ในที่นี้ Cloud server ทำหน้าที่เชื่อมต่อกับหมายเลข 4 และหมายเลข 5

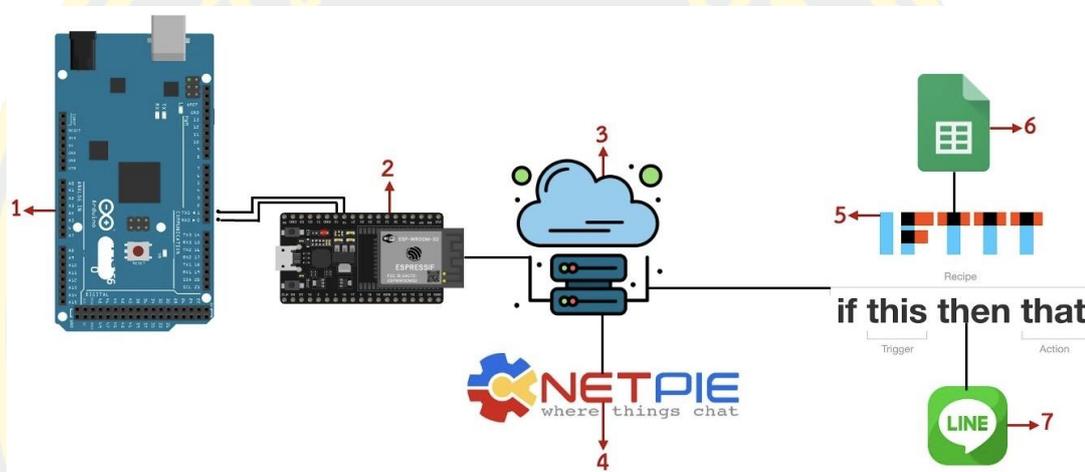
หมายเลข 4 NETPIE2020 ถือเป็น Platform ที่ให้อุปกรณ์ต่าง ๆ เชื่อมต่อสื่อสารระหว่างกันได้อย่างทันท่วงที (Real-Time) เกิดการรับและส่งข้อมูลระหว่างอุปกรณ์ ส่งผลให้ผู้ใช้งานทราบถึงข้อมูลของอุปกรณ์ ณ เวลานั้น ๆ โดยในงานนี้ NETPIE2020 เป็น Platform ที่ใช้ติดตาม 4 สถานะด้วยกัน คือ อุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ค่าความเป็นกรด-ด่างในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ อีกทั้งค่าอุณหภูมิในเครื่องเก็บ

ตัวอย่างและค่าออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพยังถูกส่งไปเก็บไว้ยัง Google sheet และ แจ้งเตือนการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งด้วย Line notify ผ่านบริการของหมายเลข 5 อีกด้วย

หมายเลข 5 IFTTT ย่อมาจาก IF THIS THEN THAT เป็นตัวกลางในการบริการให้ Application สื่อสารกัน ในงานวิจัยนี้ ใช้ IFTTT ส่งข้อมูลไปเก็บไว้ยัง Google sheet

หมายเลข 6 Google sheet ทำหน้าที่รับค่า และบันทึกค่าที่ได้รับจาก IFTTT

หมายเลข 7 Line Application ทำหน้าที่รับค่าจาก IFTTT และแจ้งเตือนให้ผู้ใช้งานทราบถึงความเคลื่อนไหวที่ตั้งค่าไว้



ภาพที่ 3-16 ลักษณะการส่งข้อมูลจากบอร์ด Arduino และ บอร์ด ESP-32 ไปยัง NETPIE2020, Google sheets และ Line notify

5. ชุดคำสั่งสำหรับการใช้ในการควบคุม สั่งการระบบ สอบเทียบเซ็นเซอร์ และมอเตอร์ สำหรับหมุนงานใส่หลอดเก็บตัวอย่าง ในหัวข้อก่อนหน้าผู้วิจัยได้อธิบายถึงอุปกรณ์และหน้าที่ รวมถึงหลักการเกี่ยวกับการออกแบบอุปกรณ์ทั้งหมดในงานวิจัย แต่ระบบทั้งหมดจะไม่สามารถทำงานได้หากขาดชุดคำสั่ง หรือเรียกโดยทั่วไปว่า โค้ด ในงานวิจัยฉบับนี้ใช้โปรแกรม Arduino IDE Version 2.3.2 ในการเขียนชุดคำสั่ง ภาษาที่ใช้เขียนชุดคำสั่งมีพื้นฐานมาจากภาษาซี ก่อนเริ่มดำเนินการ มีขั้นตอนในการเตรียมเซ็นเซอร์ทั้งหมด ดังนี้

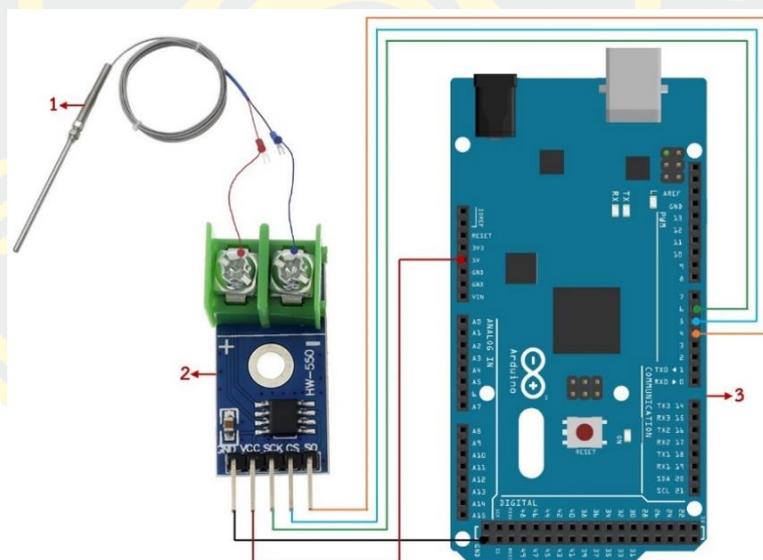
5.1 ขั้นตอนการเชื่อมต่อเซ็นเซอร์

1. เซ็นเซอร์ตรวจวัดอุณหภูมิ (Thermocouple) มีด้วยกันทั้งหมด 3 ตัว คือ วัดอุณหภูมิที่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ถังต้มน้ำ และเครื่องเก็บตัวอย่าง เป็น Thermocouple type K ใช้งานร่วมกับโมดูล MAX6675 ทั้งหมด การเชื่อมต่อโพรบกับโมดูลและบอร์ด Arduino ดังภาพที่ 3-17 โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 หมายเลข 1 โพรบเซ็นเซอร์ มีหางปลาสีแดง เชื่อมเข้ากับหมายเลข 2 ช่องขั้วบวก และหางปลาสีน้ำเงินเชื่อมเข้ากับหมายเลข 2 ช่องขั้วลบ

1.2 หมายเลข 2 โมดูล MAX6675 มีขา 5 ขานับจากเส้นสีดำ (GND) เชื่อมกับบอร์ด Arduino หมายเลข 3 ขาที่ชื่อ GND ด้วยสายจัมป์ (Jumper wire) จากนั้นเส้นสีแดง (VCC) เชื่อมเข้ากับบอร์ด Arduino ขาที่ชื่อ 5V เส้นสีเขียว (Serial Clock Input; SCK) เส้นสีฟ้า (Chip Select; CS) และเส้นสีส้ม (Serial Data Output; SO) เชื่อมกับขา PWM บนบอร์ด Arduino พินที่ 6, 5 และ 4 ตามลำดับ

Thermocouple ทั้ง 3 ตัวเชื่อมต่อแบบเดียวกันทั้งหมดเพียงแค่เปลี่ยนการกำหนดพินในโปรแกรม Arduino IDE ในชุดคำสั่ง `#define thermoSO XX`, `#define ThermoCS XX` และ `#define ThermoSCK XX` ตัวเลขที่แสดงดังภาพที่ 3-18 ในชุดคำสั่งนี้เป็นขาบนบอร์ด Arduino ฝั่ง PWM ซึ่งผู้ใช้งานสามารถกำหนดเป็นตัวเลขใดก็ได้ตั้งแต่ พินที่ 2 ถึง พินที่ 13 ทั้งนี้ทั้งนั้นขึ้นอยู่กับ library ที่ประกาศใช้ด้วยว่ามีลำดับการเขียนโค้ด หรือลักษณะจำเพาะแบบใด ผู้ใช้งานจำเป็นต้องทำความเข้าใจในแต่ละส่วนอย่างละเอียด ก่อนทำการประกาศตัวแปรใด หรือกำหนดพินใดขึ้นมา



ภาพที่ 3-17 การเชื่อมต่อ Thermocouple เข้ากับโมดูล MAX6675 และบอร์ด Arduino

```
#include "max6675.h"
#include <SoftwareSerial.h>

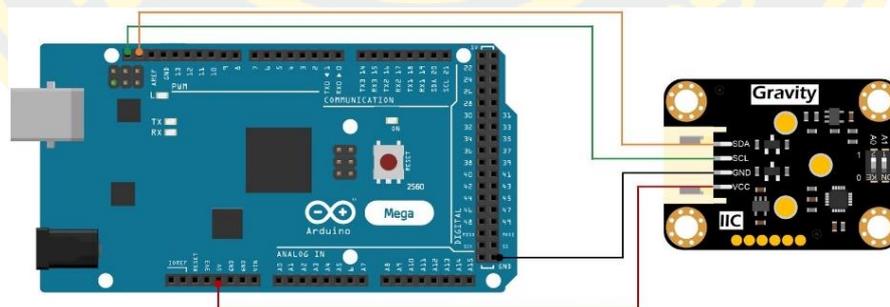
#define thermoS0 4
#define thermoCS 5
#define thermoSCK 6
#define thermoS01 7
#define thermoCS1 8
#define thermoSCK1 9
#define relay 10

MAX6675 thermocouple(thermoSCK, thermoCS, thermoS0);
MAX6675 thermocouple1(thermoSCK1, thermoCS1, thermoS01);
SoftwareSerial ArduinoSerial(2, 3); //Rx and Tx Pin
```

ภาพที่ 3-18 ตัวอย่างชุดคำสั่งการกำหนดพินในโปรแกรม Arduino IDE

2. เซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจน ถูกติดตั้งไว้ส่วนบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สามารถทำการเชื่อมต่อเข้ากับบอร์ด Arduino ดังภาพที่ 3-19 โดยมีรายละเอียดดังนี้

- 2.1 สายสีแดง (VCC) บนเซ็นเซอร์ คู่กับ 5V บนบอร์ด Arduino
- 2.2 สายสีดำ (GND) บนเซ็นเซอร์ คู่กับ GND บนบอร์ด Arduino
- 2.3 สายสีเขียว (SCL) บนเซ็นเซอร์ คู่กับ SCL บนบอร์ด Arduino
- 2.4 สายสีส้ม (SDA) บนเซ็นเซอร์ คู่กับ SDA บนบอร์ด Arduino



ภาพที่ 3-19 การเชื่อมต่อเซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจนกับบอร์ด Arduino

เซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจนสามารถต่อเข้ากับขา SDA และ SCL ได้โดยตรงเนื่องจากบนบอร์ด Arduino มีขาทั้ง 2 นี้อยู่แล้ว การทำงานของออกซิเจนเซ็นเซอร์จะทำงานร่วมกันกับปริเลย์และโซลินอยด์วาล์ว จะเห็นได้ว่าเงื่อนไขในการสั่งปิดโซลินอยด์ คือ ออกซิเจนต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.50% Vol ในคำสั่งที่เขียนว่า `if (oxygenData <= 0.50) digitalWrite (Relay, Low);` ในทาง

ตรงกันข้ามหากไม่เข้าเงื่อนไขข้างต้น คือ มีออกซิเจนมากกว่า 0.50% Vol ดังภาพที่ 3-20 โซลินอยด์ จะถูกเปิดและก๊าซไนโตรเจนจะถูกพ่นเข้ามาแทนที่ก๊าซออกซิเจนทันที

ภาพที่ 3-20 ตัวอย่างชุดคำสั่งการทำงานของเซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

5.2 ขั้นตอนการสอบเทียบ (Calibration) ของเซ็นเซอร์ต่าง ๆ

1. เซ็นเซอร์ตรวจวัดอุณหภูมิ (Thermocouple) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในถังต้ม น้ำ และในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ มีชุดคำสั่งสอบเทียบดังภาพที่ 3-21 โดยมีรายละเอียดดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ต้องทราบผลต่างระหว่างอุณหภูมิใน Thermometer และ Thermocouple ก่อน โดยการจะทราบได้นั้น ต้องนำ Thermometer และ Thermocouple จุ่มลงในน้ำและอ่านค่า โดยยึดค่ามาตรฐานจาก Thermometer

ขั้นตอนที่ 2 เมื่อทราบถึงผลต่างอุณหภูมิ จึงทำการเขียนชุดคำสั่งใน Void loop คือ float TempBoiler = thermocouple.readCelcius() - 1.00; คำสั่งนี้มีความหมายว่า อุณหภูมิของถังต้มน้ำ (ตัวแปรชื่อ Boiler) ถูกรับค่ามาจาก Thermocouple และลบผลต่างของอุณหภูมิก่อน 1 องศาเซลเซียส ส่วน Thermocouple ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และเครื่องเก็บตัวอย่างก็ทำเช่นเดียวกันกับข้างต้น แต่ข้อควรระวังดังภาพที่ 3-21 จะเห็นได้ว่า ค่าผลต่างของเซ็นเซอร์แต่ละตัวไม่ได้เท่ากัน ดังนั้นก่อนใช้งาน ผู้ใช้งานจะต้องทราบผลต่างของเซ็นเซอร์แต่ละตัวก่อน จึงสามารถทำการลบค่าผลต่างออกได้ ไม่สามารถลบด้วยค่าที่เท่ากันในทุกเซ็นเซอร์ได้ และจะต้องหมั่นตรวจสอบว่าเซ็นเซอร์อ่านค่าใกล้เคียงกับ Thermometer หรือไม่ ก่อนจะเริ่มต้นดำเนินการใช้เซ็นเซอร์ทุกครั้ง

```

void loop() {
  float TempBoiler = thermocouple.readCelsius() - 1.00;
  Serial.print("Temp Boiler = ");
  Serial.println(TempBoiler);
  float TempReactor = thermocouple1.readCelsius() - 2.00;
  Serial.print("Temp Reactor = ");
  Serial.println(TempReactor);
}

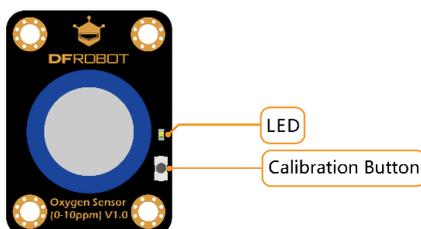
```

ภาพที่ 3-21 ตัวอย่างชุดคำสั่งสำหรับสอบเทียบเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิ

2. เซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจน ในงานวิจัยฉบับนี้ ใช้เซ็นเซอร์ยี่ห้อ DF-Robot เป็นเซ็นเซอร์แบบ electrochemical รุ่น Gravity: I2C oxygen sensor ดังภาพที่ 3-22 ความพิเศษของเซ็นเซอร์รุ่นนี้ คือ การสอบเทียบที่สามารถทำได้ง่าย โดยผู้ใช้งานสามารถสอบเทียบได้ด้วยการนำเซ็นเซอร์วางไว้ ณ อุณหภูมิห้อง ในบริเวณที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก เมื่อเซ็นเซอร์อ่านค่าออกซิเจนจนคงที่ จากนั้นกดปุ่มสอบเทียบสีดำข้างตัวเซ็นเซอร์ ดังภาพที่ 3-23 ค้างไว้ประมาณ 2 วินาที ไฟสีเขียวจะกระพริบ หมายความว่า เสร็จสิ้นการสอบเทียบ



ภาพที่ 3-22 เซ็นเซอร์วัดก๊าซออกซิเจน DF-Robot Gravity I²C ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ



ภาพที่ 3-23 วิธีการสอบเทียบออกซิเจนเซ็นเซอร์

5.3 ชุดคำสั่งสำหรับควบคุมมอเตอร์หมุนงานใส่หลอดเก็บตัวอย่าง การควบคุมมอเตอร์ถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

1. ส่วนของการกำหนดค่า (Global declarations) ใช้ในการกำหนดชนิดตัวแปรแบบนอกฟังก์ชัน หรือประกาศฟังก์ชัน เพื่อให้ฟังก์ชันที่ประกาศสามารถกำหนด หรือเรียกใช้ได้จากทุกส่วนของโปรแกรม

```
const int dirPin = 3; const int stepPin = 4; const int enPin = 5;
```

จากชุดคำสั่งด้านบน มีส่วนประกอบด้วยกันทั้งหมด 3 ส่วน ดังนี้

1 Type เป็นแบบ const int เป็นการทำการประกาศตัวแปรค่าคงที่ ซึ่งเป็นค่าคงที่แบบ int (Integer)

2 Variable Name เป็นชื่อที่ถูกกำหนดขึ้น ในชุดคำสั่งนี้มีชื่อสามตัว คือ dirPin, stepPin, และ enPin

3 Port Number เป็นพอร์ตที่ถูกกำหนดขึ้นให้ใช้บนบอร์ด Arduino เพื่อรับและส่งข้อมูลในรูปแบบดิจิทัล ส่วนสุดท้ายคือ The Semicolon (;) ใช้ปิดท้ายคำสั่งทุกครั้ง เพื่อบอกให้ทราบว่าจบคำสั่งนั้น ๆ แล้ว

2. ฟังก์ชันใช้ในการประกาศค่าเริ่มต้น void setup() คือ ฟังก์ชันใช้ในการประกาศค่าเริ่มต้น ตำแหน่งพอร์ตที่ใช้งาน รวมถึงฟังก์ชัน ที่อยู่ไลบรารีที่ใช้งาน เป็นฟังก์ชันที่ทำงานเพียงครั้งเดียวหรือจะเริ่มต้นการทำงานใหม่ทุกครั้งที่มีการรีเซตบอร์ด หรือเริ่มต้นการอัปโหลดชุดคำสั่งชุดใหม่ลงในบอร์ดเท่านั้น

```
void setup() {
  pinMode(stepPin, OUTPUT);
  pinMode(dirPin, OUTPUT);
  pinMode(enPin, OUTPUT);
  Serial.begin(112500);
  digitalWrite(enPin, LOW);
}
```

จากชุดคำสั่งด้านบน pinMode() มีโครงสร้างชุดคำสั่งดังนี้

pinMode(variable Name, Input/Output) โดยชุดคำสั่ง pinMode() ทั้งหมดมีชื่อ variable name ว่า dirPin, stepPin, และ enPin ทั้งหมดนี้เป็นสัญญาณดิจิทัลจากตัวขับเคลื่อนมอเตอร์แบบ Output ออกไป

ถัดมาเป็นส่วนของ Serial.begin(ความเร็วการสื่อสาร); ซึ่งบรรทัดนี้เป็นการประกาศใช้งานการสื่อสารโดยกำหนดความเร็วในการสื่อสารเท่ากับ 112500 ตัวเลขนี้ เป็นค่ามาตรฐาน สามารถเปลี่ยนเป็นค่าอื่นได้ ยิ่งค่าสูงก็จะสามารถส่งข้อมูลได้รวดเร็วยิ่งขึ้น แต่โอกาสผิดพลาดก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย สามารถเรียกอีกชื่อได้ว่า Bud

และส่วนสุดท้ายคือคำสั่ง digitalWrite(pin ที่ต้องการใช้งาน, HIGH หรือ LOW); เป็นการสั่งให้พอร์ตที่ 5 ปิดการทำงานตลอดเวลาจากคำสั่ง digitalWrite(enPin, LOW);

3. ส่วนของฟังก์ชัน Void loop() คือ ฟังก์ชันที่ทำงานตรงตามชื่อ โดยจะทำงานเป็นลูปตลอดเวลา ภายในฟังก์ชันมีโปรแกรมของผู้ใช้เพื่อรับค่าจากพอร์ต ประมวลผล จากนั้นจึงส่ง Output ออกมาต่าง ๆ เพื่อควบคุมการทำงานของบอร์ด

```
void loop() {
    digitalWrite(dirPin, HIGH);
    for (int Round = 0; Round < 25; Round++) {
        int RoundPlus = 3;
        int R = Round % RoundPlus;
        if (R == 0){
            for (float x = 0; x < 136; x++) {
                digitalWrite(stepPin, HIGH);
                delayMicroseconds(500);
                digitalWrite(stepPin, LOW);
                delayMicroseconds(500);
                Serial.println("For loop A");
                Serial.println(R);
                Serial.println(Round);
            }
        }
        else {
            for (float x = 0; x < 134; x++) {
                digitalWrite(stepPin, HIGH);
                delayMicroseconds(500);
                digitalWrite(stepPin, LOW);
                delayMicroseconds(500);
```

```

Serial.println("For loop B");
Serial.println(R);
Serial.println(Round);
}
}
delay(5000);
}
}

```

ในชุดคำสั่ง void loop นี้เป็นการใช้คำสั่ง for loop ซ้อนทับด้วย for loop อีกครั้ง สามารถอธิบายได้ดังนี้

For loop 1. ชุดคำสั่ง for (int Round = 1; Round < 25; Round++) { เป็นลูปใหญ่ที่สุดเริ่มทำงานอันดับแรก มีส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ for (ตัวแปรค่าเริ่มต้น; เงื่อนไขที่กำหนดว่าจะทำงานในลูปกี่ต่อเมื่อ; คำสั่งตัวนับจำนวนครั้ง)

- ตัวแปรค่าเริ่มต้น คือ variable Round = 1 เริ่มนับการหมุนเป็นรอบที่ 1
- เงื่อนไขที่กำหนดว่าจะทำงานในลูปกี่ต่อเมื่อ Round < 25 (ก็คือ 0, 1, 2,.....,24)
- คำสั่งตัวนับจำนวนครั้ง คือ ++ อธิบายโดยง่าย คือ เมื่อทำงานเสร็จ Round = 1 ให้วนกลับมาทำอีกรอบโดยการเพิ่มค่า + ให้แก่ variable Round จาก 1 ก็จะกลายเป็น 2 เมื่อวนรอบ 2 เสร็จ จะบวกเป็น 3 เรื่อย ๆ จนถึง Round = 24

ถัดมาเป็นคำสั่ง int RoundPlus = 3; มีความหมายว่า variable RoundPlus เป็นจำนวนเต็มตัวเลข 3 โดยตัวเลข 3 หมายถึงการหมุน 3 step

คำสั่ง int R = Round % RoundPlus; มีความหมายว่า variable R ได้มาจากการนำค่า Round % RoundPlus และนำค่า R ไปใช้ในการตัดสินใจว่าจะเข้าทำงานต่อไปใน for loop ไດ เมื่อได้ค่า R จึงเริ่มต้นการทำงานของ for loop 2.

For loop 2. เริ่มต้นการทำงานด้วยการเปรียบเทียบ variable R == 0 ในชุดคำสั่ง if (R == 0) หากรอบการหมุนที่ 1 นำไป % กับค่า RoundPlus คือ 3 จะได้ค่าเท่ากับ 0.33333 โดยการทำให้ % มีความหมายว่า เป็นการหารเอาเศษ เมื่อค่า R != (ไม่เท่ากับ) 0 ส่งผลให้การทำงานจะวนเข้า for loop else (for loop B) แต่เมื่อทำการ % จนตัวเลขเป็นจำนวนเต็ม เช่น 3 % 3 = 1 เศษของ 1 เท่ากับ 0 ส่งผลให้เข้าเงื่อนไขของลูป if (for loop A)

การปรับค่าให้หัวจ่ายกลับมาตรงอีกครั้งจะเริ่มต้นก็ต่อเมื่อค่าการทำ % เข้าสู่ for loop A จากค่า x = 134 (ค่ามาตรฐาน) จะถูกปรับให้เป็น x = 136 (ค่ามาตรฐาน) หัวจ่ายก็จะกลับมาตรงเหมือนเดิม

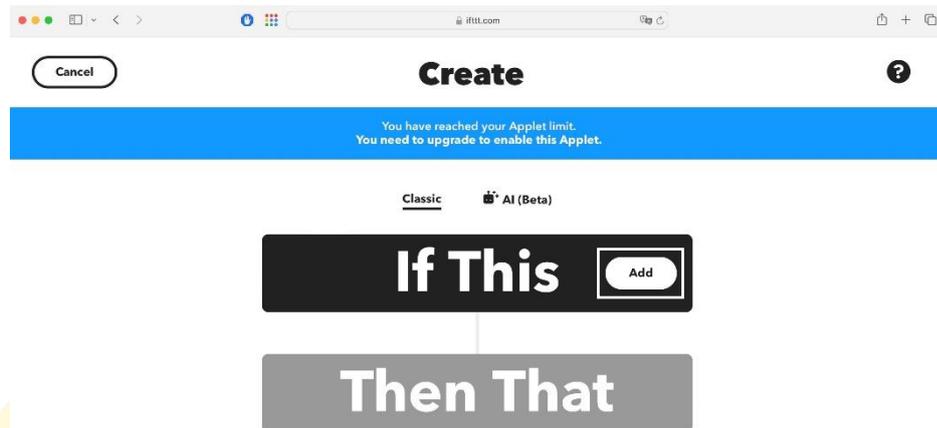
ส่วนคำสั่งสุดท้าย delay(5000); หมายความว่า เป็นคำสั่งหน่วงการทำงานของมอเตอร์ให้หยุดทำงานเป็นระยะเวลา 5 วินาที เพื่อทดสอบการทำงาน แต่ในการใช้งานจริงจะหน่วงเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และหน่วยของการนับเวลาในโปรแกรมมีหน่วยเป็น มิลลิวินาที ดังนั้น 1 ชั่วโมง จึงเท่ากับ 3600000 มิลลิวินาที สิ่งที่ใช้ใช้งานจะต้องพึงระวังเป็นอย่างยิ่ง คือ การนับมิลลิวินาที หรือวินาทีที่ใช้ไปทั้งหมดในชุดคำสั่ง เนื่องจากการใช้คำสั่งหน่วงหรือหยุดเวลา ไม่ได้สั่งให้การนับเวลาบนบอร์ด Arduino หยุด แต่เป็นการสั่งหยุดด้วยคำสั่งเท่านั้น ดังนั้น เวลาจริงบนบอร์ดจะดำเนินต่อไปในขณะที่คำสั่งหยุดไม่ทำงาน ผู้ใช้งานจึงต้องนับรวมเวลาที่หน่วงหรือหยุดไป และนำมาหักลบกับคำสั่งสุดท้าย ยกตัวอย่าง เช่น หากใน Void loop มีคำสั่ง delay(); ทั้งหมด 5 คำสั่ง รวมเป็น 1 นาที คำสั่ง delay(); สุดท้ายที่จะสั่งให้มอเตอร์หยุดเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมงจะไม่ใช้ 3600000 มิลลิวินาที แต่จะต้องเป็น 3540000 มิลลิวินาที

6. การใช้งาน IFTTT Platform เพื่อส่งค่าสถานะของกระบวนการหมักไปเก็บไว้ยัง

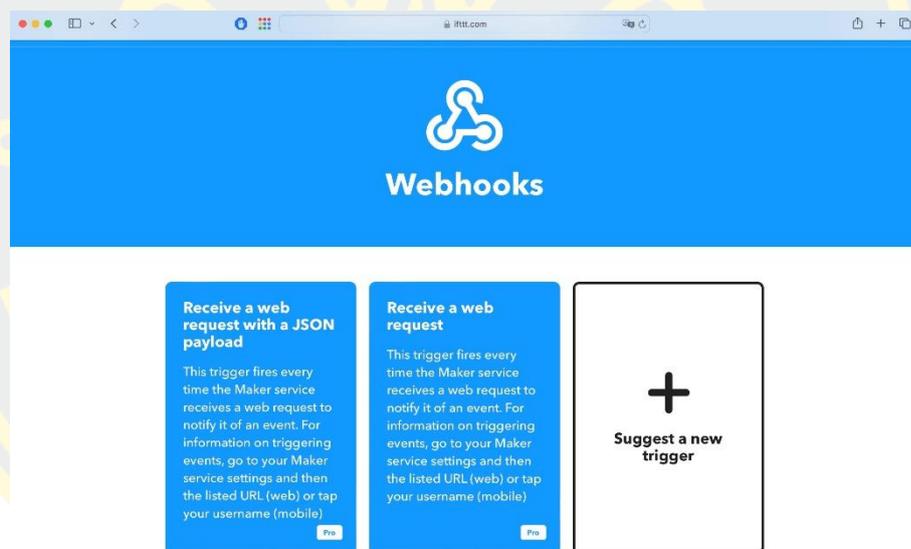
Google sheets เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก ข้อมูลเกี่ยวกับสถานะต่าง ๆ เช่น ค่าออกซิเจน ค่าอุณหภูมิถังต้ม น้ำ ค่าอุณหภูมิถังปฏิกรณ์ชีวภาพ หรือค่าอุณหภูมิเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ ข้อจำกัด IFTTT Platform คือ สามารถส่งค่าสถานะได้สูงสุด 3 ค่าต่อ 1 การสร้าง Applet ในเว็บไซต์ IFTTT หากต้องการส่งค่าสถานะที่ข้อมูลมากกว่า 3 ค่า ผู้ใช้งานจะต้องดำเนินการสร้าง Applet ขึ้นมาใหม่ และในปัจจุบัน IFTTT ไม่ได้เปิดให้ใช้งานฟรี หากต้องการส่งข้อมูลไปยัง Google sheets ผู้ใช้งานต้องสมัครบัญชีแบบ Pro หรือ Pro+ โดยมีค่าใช้จ่ายรายเดือนประมาณ 120 บาทต่อเดือน หรือสามารถสมัครแบบรายปีโดยมีค่าใช้จ่าย 1300 บาทต่อปี ซึ่งมีขั้นตอนการใช้งาน และการเชื่อมต่อดังนี้

1. เริ่มต้นด้วยการสมัครใช้งานบัญชีของ IFTTT โดยเข้าไปที่หน้าเว็บไซต์ของ IFTTT (www.ifttt.com หรือ <https://ifttt.com/explore>) กดคำสั่ง Log in ที่เมนูด้านขวาบนของเว็บไซต์ ดำเนินการกรอกอีเมล และรหัสผ่านของผู้ใช้งาน หากระบบขอให้ผู้ใช้งานยืนยันบัญชีหรือดำเนินการใด ๆ ให้ดำเนินการตามขั้นตอนของระบบ

2. เมื่อสมัครใช้งานสำเร็จ ที่หน้าเว็บไซต์ให้กดคำสั่ง Create ด้านมุมบนขวา และเว็บไซต์จะแสดงดังภาพที่ 3-24 ในตัวเลือก IF This กดตัวเลือก Add เพื่อสร้างเหตุการณ์ (Trigger) จากนั้นให้พิมพ์ในช่องค้นหาว่า “Webhook” และคลิกที่สัญลักษณ์ webhook หน้าจอจะปรากฏดังภาพที่ 3-25 เลือกเมนู Receive a web request และทำการตั้งชื่อเหตุการณ์ (Event) หากต้องการเว้นวรรคคำต้องใช้สัญลักษณ์ Underscore (_) คั่นทุกคำ เช่น ในงานนี้เก็บข้อมูลออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ ผู้วิจัยได้ตั้งชื่อว่า O2_Reactor และต้องจำชื่อเหตุการณ์ที่ตั้งเนื่องจากต้องนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป หากชื่อไม่ตรงกันจะส่งข้อมูลไม่สำเร็จ จากนั้นกดปุ่ม Create trigger เพื่อไปขั้นตอนถัดไป



ภาพที่ 3-24 การตั้งค่า Trigger บน IFTTT ด้วยเงื่อนไข If และ Then (ขั้นตอนที่ 1)



ภาพที่ 3-25 การตั้งค่า Webhook เพื่อรับข้อมูลบน IFTTT (ขั้นตอนที่ 2)

3. จากนั้นในตัวเลือก Then That กดตัวเลือก Add เพื่อสร้างเหตุการณ์ (Trigger) อีกครั้ง พิมพ์ในช่องค้นหาว่า “Google sheets” และคลิกที่สัญลักษณ์ google sheets ในหน้าถัดไปให้เลือกลูกเลือกเมนู Add row to spreadsheet หน้าจอจะปรากฏดังภาพที่ 3-26 ในการตั้งค่าส่วนนี้ส่วนที่สำคัญเป็นอย่างยิ่ง คือ อีเมลที่ใช้ การตั้งค่าในเมนู Spreadsheet name ชื่อจะต้องตรงกับ Even name ที่ตั้งในขั้นตอนที่ 2 และในช่อง Formatted row หากคำว่า Value1, Value2, Value3 หายไป ให้กลับไปดำเนินการในขั้นตอนที่ 2 ใหม่จนกว่า Value1, 2, 3 จะปรากฏ หรืออาจเปลี่ยนจากการรับแบบ Web request เป็นแบบ JSON Payload จากนั้นกด Create action

The screenshot shows the 'Complete action fields' screen for the 'Add row to spreadsheet' action in IFTTT. The interface is dark blue with white text and form fields. At the top left is a 'Back' button. The main title is 'Complete action fields' and the action name is 'Add row to spreadsheet'. Below the title is a small spreadsheet icon and a note: 'This action will add a single row to the bottom of the first worksheet of a spreadsheet you specify. Note: a new spreadsheet is created after 2000 rows.' The form includes several sections: 'Google Sheets account' with a dropdown menu showing '64910148@go.buu.ac.th' and an 'Add new account' button; 'Spreadsheet name' with a text input field containing 'O2_Reactor' and an 'Add ingredient' button; 'Formatted row' with a table structure showing columns 'OccurredAt', 'EventName', 'Value1', 'Value2', and 'Value3', and an 'Add ingredient' button; and 'Drive folder path' with a text input field containing 'IFTTT/MakerWebooks/EventName' and an 'Add ingredient' button. At the bottom is a large 'Create action' button.

ภาพที่ 3-26 การตั้งค่ารูปแบบ Google sheet บน IFTTT (ขั้นตอนที่ 3)

4. IFTTT จะให้ผู้ใช้งานตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลอีกครั้ง ผู้ใช้งานควรตรวจสอบโดยละเอียดว่าได้ทำการ Trigger ในคำสั่ง if และ Then ถูกต้องหรือไม่ หากถูกต้องให้ทำการกด Continue ระบบจะถามซ้ำให้ตรวจสอบ ชื่อของเหตุการณ์ และอีเมลที่ใช้ในการสร้าง Google sheet หากถูกต้องให้กดคำสั่ง Finish หากไม่ถูกต้องให้กด Back มุมบนซ้ายในหน้า IFTTT เพื่อแก้ไข เมื่อสำเร็จหน้าจอแสดงดังในภาพที่ 3-27 และต้องขึ้นคำว่า Connected เท่านั้น หากไม่ต้องการให้เกิดการส่งข้อมูล ผู้ใช้งานสามารถคลิก Disconnect บน IFTTT ได้ด้วยตนเอง และในกรณีที่ระบบเกิดการ Disconnected เองโดยไม่ทราบสาเหตุ สามารถกด Connect เพื่อให้เกิดการส่งข้อมูลอีกครั้งได้เช่นกัน



Connected

ภาพที่ 3-27 การสั่งงาน เปิด หรือ ปิด การรับส่งข้อมูล บน IFTTT (ขั้นตอนที่ 4)

5. เมื่อสร้างเงื่อนไขในการทำงานบน IFTTT เสร็จสิ้น ผู้ใช้งานจะต้องทดสอบว่า เงื่อนไขที่สร้างใช้งานได้จริงหรือไม่ โดยเปิดเว็บไซต์ และวางลิงก์ https://maker.ifttt.com/trigger/{event}/{my_key}?Value1=123&Value2=456&Value3=789 และนำข้อมูลต่าง ๆ มาแทน ดังนี้
 Event คือ ชื่อของเหตุการณ์ที่ตั้งขึ้นมา เช่น โดยในงานวิจัยนี้ตั้งว่า O2_Reactor
 My_Key คือ รหัสที่ระบบ IFTTT ให้มา โดยสามารถหาได้จากการไปที่หน้าแรกของ IFTTT เลือกที่ไอคอนรูปคน และเลือกเมนู My services ค้นหาคำว่า webhook และกดเลือกที่เมนู Settings หน้าจอจะแสดงดังภาพที่ 3-28 ซึ่ง Key จะอยู่ตั้งแต่หลัง used/ เป็นต้นไป
 Value1, Value2, Value3 คือ ค่าที่ต้องการส่งไปยัง Google sheets

Details

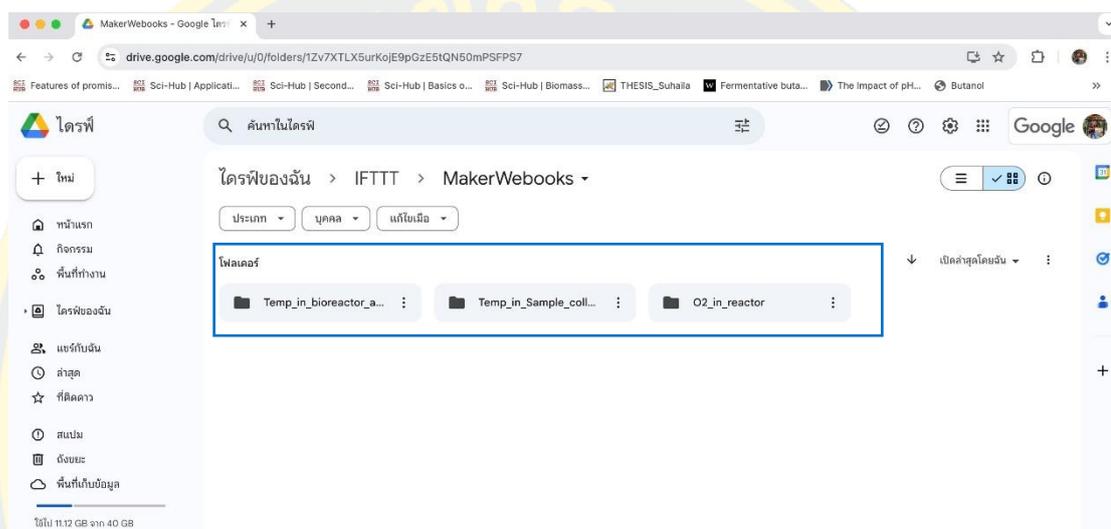
64910148

Status
Active

URL
https://maker.ifttt.com/use/bTmsHkq9xUx0HGE7JU_Hrz

ภาพที่ 3-28 รหัสสำหรับใช้ในการส่งข้อมูลผ่าน IFTTT (ขั้นตอนที่ 5)

เมื่อส่งทดลองส่งข้อมูลด้วยลิงก์ที่กล่าวถึงก่อนหน้าสำเร็จ ผู้ใช้งานจะต้องตรวจสอบว่า Google sheets ถูกสร้างขึ้นมาจริงหรือไม่ โดยไปที่ Google drive ค้นหาโฟลเดอร์ที่ชื่อว่า IFTTT เมื่อคลิกเข้าไปจะพบกับโฟลเดอร์ที่สร้างขึ้นมา โดยในงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยได้สร้าง Google sheet เพื่อบันทึกค่าทั้งหมด 3 โฟลเดอร์ ได้แก่ ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิในถังต้มน้ำและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่าง ดังภาพที่ 3-29



ภาพที่ 3-29 Google sheet ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากการ Trigger โดยผู้ใช้งาน (ขั้นตอนที่ 6)

6. คำสั่งที่ใช้งานในการส่งข้อมูลไปบันทึกยัง Google sheets จะเริ่มต้นจากบอร์ด Arduino รับค่ามาจากเซ็นเซอร์ และส่งต่อไปยังบอร์ด ESP จากนั้น ESP จะทำหน้าที่เชื่อมต่อกับเซิร์ฟเวอร์ และส่งไปยัง IFTTT เพื่อบันทึกไว้ใน Google sheets โดยมีคำสั่งที่สำคัญดังภาพที่ 3-30 เป็นการส่งค่าออกซิเจนขึ้นไปเก็บไว้ใน Google sheets ที่ชื่อว่า O2_in_reactor

```

32 void loop() {
33   NodeSerial.available();
34   String val = NodeSerial.readString();
35   NodeSerial.read() == '\n';
36   float oxy = val.toFloat();
37   Serial.println(oxy);
38   if(oxy >=0){
39     sheets = "http://maker.ifttt.com/trigger/O2_in_reactor/with/key/bTmsHkq9xUx0HG7JU_Hrz?value1="+String(oxy);
40
41     if (WiFi.status() == WL_CONNECTED) {
42       HTTPClient http;
43       http.begin(wifiClient,sheets);
44       int httpCode = http.GET();
45
46       if (httpCode > 0) {
47         String payload = http.getString();
48         Serial.println(payload);
49       }
50       http.end();
51     }
52   else {
53     Serial.println("Fail, something is wrong with the connection.");
54   }

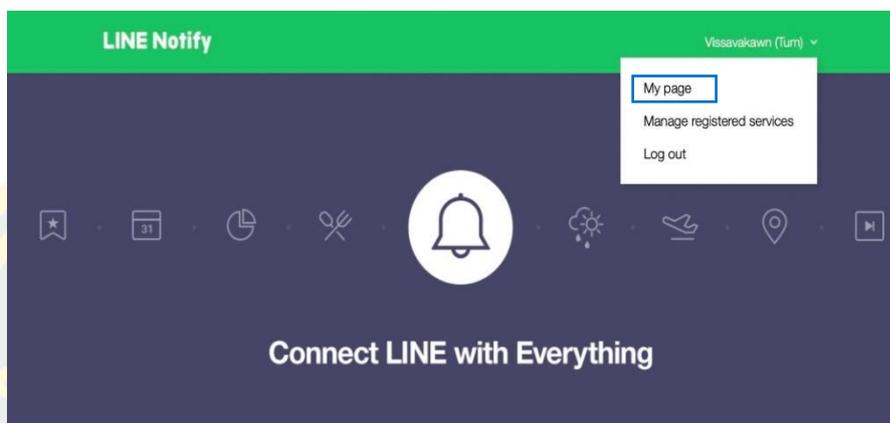
```

ภาพที่ 3-30 ตัวอย่างชุดคำสั่งสำหรับการส่งข้อมูลไปบันทึกไว้ยัง Google sheets

คำสั่งในบรรทัดที่ 39 เป็นการประกาศที่อยู่ของ Google sheets ที่ต้องการส่งข้อมูลไปบันทึกไว้ โดยจะเห็นได้ว่า รูปแบบของลิงก์ตรงกับหัวข้อที่ 5 ที่ได้อธิบายไปแล้วก่อนหน้านี้ ซึ่งในคำสั่งนี้เป็นการส่งค่าออกซิเจนไปบันทึกไว้เพียงค่าเดียว สังเกตได้จากคำสั่งบรรทัดที่ 39 ซึ่งประกาศไว้ว่า Value1="+String(oxy); มีความหมายว่า ให้ส่งเฉพาะค่าตัวแปรที่ 1 คือ ค่าออกซิเจนในรูปแบบของตัวแปร String เก็บไว้ยัง Google sheets ที่มีชื่อว่า O2_in_reactor หากต้องการเพิ่มตัวแปรที่จะส่งไปบันทึกไว้ใน Google sheets สามารถเขียนคำสั่งเพิ่มเข้าไปในโค้ดได้ แต่ต้องเป็นไปตามรูปแบบการเขียนของ JSON Payload หากไม่เป็นไปตามรูปแบบนี้ จะไม่สามารถส่งค่าขึ้นไปบันทึกไว้ใน Google sheets ได้ และในกรณีที่เกิดการส่งไม่สำเร็จหรือเกิดข้อผิดพลาดขึ้นกับระบบ ในชุดคำสั่งบรรทัดที่ 52 เงื่อนไข else ระบบจะขึ้นแจ้งเตือนว่า เกิดข้อผิดพลาดกับการเชื่อมต่อ ดังคำสั่งในบรรทัดที่ 53 ผู้ใช้งานจะต้องตรวจสอบระบบอินเทอร์เน็ต และส่วนอื่น ๆ ในระบบทั้งหมด

7. การส่งแจ้งเตือนรอบการเก็บตัวอย่างด้วย Line notify ผู้วิจัยได้ทำการเขียนชุดคำสั่งเพื่อส่งแจ้งเตือนให้ผู้ใช้งานทราบว่าในขณะที่กำลังหมัก ระบบเก็บตัวอย่างอัตโนมัติได้เก็บตัวอย่างหรือไม่ โดยใช้หลักการการหมุนของมอเตอร์ เมื่อมอเตอร์เกิดการหมุน 1 ครั้ง และสั่งให้บีบจ่ายสารทำงาน ระบบจะนับเป็น 1 การเก็บตัวอย่าง ซึ่งเมื่อครบ 1 ชั่วโมงหากระบบไลน์ไม่ขึ้นแจ้งเตือนว่าเก็บตัวอย่างสำเร็จ ผู้ใช้งานจะสามารถทราบได้ทันทีว่า ระบบเกิดปัญหาและสามารถเข้ามาแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้อย่างทันท่วงที โดยที่ไม่ต้องนั่งสังเกตการณ์ตลอดระยะเวลาของการหมัก สามารถดำเนินการได้ดังต่อไปนี้

1. บนเว็บไซต์ ทำการ Log in และเพิ่มเพื่อน Account Line Notify โดยการค้นหาหรือเพิ่มได้จากลิงก์ <https://notify-bot.line.me/my/> เมื่อเข้าสู่ระบบสำเร็จ มุมบนขวาจะปรากฏชื่อเจ้าของบัญชีนั้น ๆ ดังภาพที่ 3-31

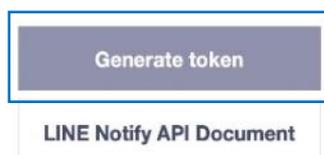


ภาพที่ 3-31 หน้าบัญชี Line notify สำหรับการออก Token (ขั้นตอนที่ 1)

2. ให้กดที่ชื่อบัญชีไลน์ของผู้วิจัยคือ “Vissavakawn (Tum)” เมนูจะปรากฏขึ้นมาเลือกที่ my page หากคำว่า generate access token (for developers) และในช่องสี่เหลี่ยม จะมีคำว่า generate token กด 1 ครั้ง ดังภาพที่ 3-32 หน้าจอจะแสดงดังภาพที่ 3-33 ทำการกรอกข้อมูล ในช่องที่ 1 มีคำอธิบาย “โปรดใส่ชื่อ token” หมายความว่า ข้อความนี้จะแสดงเมื่อมีการส่งแจ้งเตือนทางไลน์ ในงานนี้ผู้วิจัยให้แจ้งเตือนการเก็บตัวอย่างจึง ใส่ข้อความ “Sample Collector:” ในช่องถัดมา เป็นช่องที่ให้ผู้ใช้งานเลือกได้ว่าจะส่งข้อความข้างต้นให้กับผู้ใด โดยส่งได้เพียง 1 คนเท่านั้น หากต้องการส่งให้มากกว่า 1 คนขึ้นไปต้องสร้างห้องแชทแบบกลุ่มขึ้นมา และในที่นี้ผู้วิจัยเลือกที่จะส่งให้กับตนเองจึงเลือกการส่งข้อความแบบ 1-on1 chat with line notify จากนั้นกดที่คำสั่ง generate token ได้ทันที

Generate access token (For developers)

By using personal access tokens, you can configure notifications without having to add a web service.



ภาพที่ 3-32 ขั้นตอนการขอออก token ของ Line notify (ขั้นตอนที่ 2)

Generate token ✕

Please enter a token name to be displayed before each notification.

Sample Collector

Select a chat to send notifications to.

🔍 Search by group name

-  **1-on-1 chat with LINE Notify**
-  943102(กิจกรรม1/61)
-  Algae Research Unit (ARU)
-  Angels nkc.
-  Envi KK1153

Note: Revealing your personal access token can allow a third party to obtain the names of your connected chats as well as your profile name.

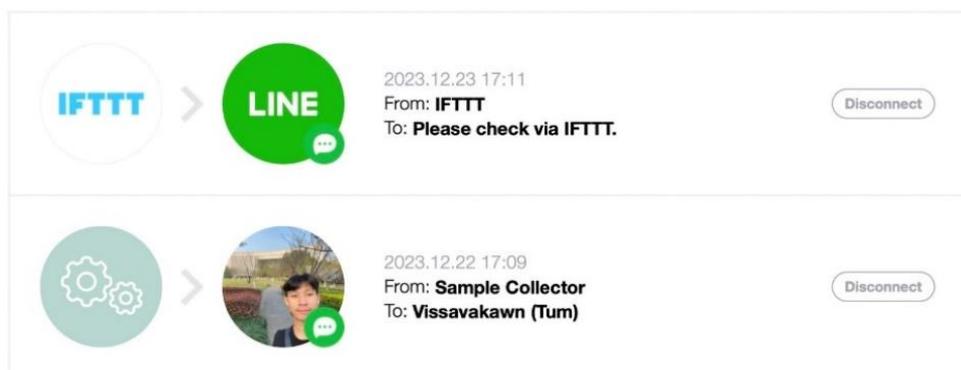
Generate token

ภาพที่ 3-33 การเลือกบัญชีที่ต้องการส่งข้อความถึง และการกำหนดข้อความที่ต้องการแสดงเมื่อเกิดการแจ้งเตือนผ่าน Line notify (ขั้นตอนที่ 3)

3. เมื่อกด generate key หน้าจอบนเว็บเว็บไซต์จะแสดงข้อความ you token is และตามด้วย token ที่จะนำไปใช้งาน ผู้ใช้งานสามารถนำ token นี้ไปใช้ได้ทันทีในการเขียนชุดคำสั่งบนโปรแกรม arduino IDE ซึ่งข้อสำคัญ คือ token นี้สามารถออกได้เพียงครั้งเดียวเท่านั้นและใช้ได้แค่กับการ notify นั้นเพียงอย่างเดียว หากสูญหายหรือจำไม่ได้ การจะขอ generate token ใหม่อีกครั้ง ผู้ใช้งานจะต้องเริ่มทำใหม่ตั้งแต่ขั้นตอนที่ 1 และต้องแก้ไขส่วนของโค้ดควบคุมด้วยเช่นกัน ซึ่งจะสร้างความยุ่งยากเป็นอย่างมากแก่ผู้ใช้งาน ซึ่งการเชื่อมต่อที่สมบูรณ์ระหว่าง Line notify และระบบการรับข้อมูลต้นทางในบัญชี Line notify จะต้องบนเว็บไซต์ดังภาพที่ 3-34 อีกทั้งผู้ใช้งานยังสามารถทำการ disconnect กับระบบได้ด้วยตนเองผ่านเว็บไซต์ของ Line notify

Connected services

Your connected services. Press the Disconnect button to disconnect any service.



ภาพที่ 3-34 การเชื่อมต่อระหว่างระบบ Line notify และข้อมูลต้นทาง (ขั้นตอนที่ 4)

4. คำสั่งที่ใช้งานในการรับและส่งข้อมูลแจ้งเตือนผ่านทาง Line notify ผู้วิจัยใช้ไลบรารี ที่มีชื่อว่า TridentTD_LineNotify ซึ่งมีรูปแบบการเขียนชุดคำสั่งที่สำคัญ ดังนี้

4.1 การระบุ token ที่ได้มาจากขั้นตอนก่อนหน้านั้นด้วยคำสั่ง #define LINE_TOKEN และตามด้วย token ที่ได้มา ในบรรทัดที่ 6 ดังภาพที่ 3-35

4.2 แหล่งอินเทอร์เน็ตที่ใช้เชื่อมต่อต้องไม่มีการ log in ผ่าน URL (ไม่มีระบบ Wi-Fi Authentication Service; WPA) หากมีการ log in ผ่าน URL ดังเช่นอินเทอร์เน็ตของมหาวิทยาลัยบูรพา ผู้ใช้งานจะต้องแปลงสัญญาณอินเทอร์เน็ตของมหาลัยให้เป็น hotspot ก่อนจึงจะสามารถนำอินเทอร์เน็ตมาใช้งานได้ ในบรรทัดที่ 11 และ 12 ดังภาพที่ 3-35

4.3 การประกาศตัวแปร String val ซึ่งตัวแปร val นี้เป็นค่าที่ได้รับมาจากการสั่งเปิดมอเตอร์ และนำมาเก็บเป็นค่า val ส่งแจ้งเตือนผ่านทาง Line notify ด้วยคำสั่งในบรรทัดที่ 34 ดังภาพที่ 3-35

```

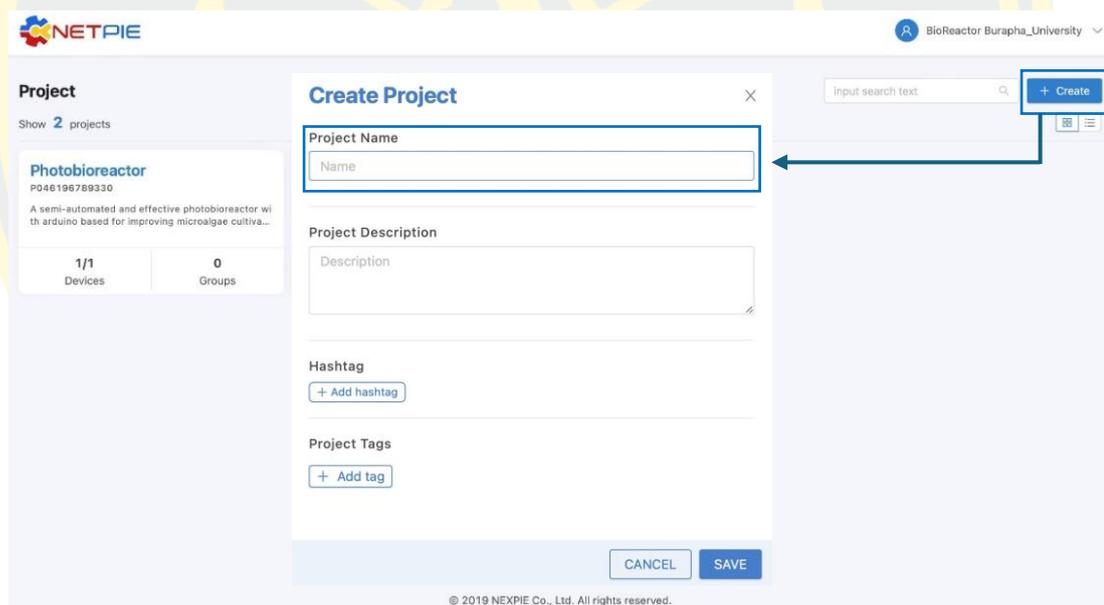
29 void loop() {
30   String val = Serial2.readString();
31   if (val.length() > 0) {
32     Serial.print(val);
33     LINE.setToken(LINE_TOKEN);
34     LINE.notify("No. = " + String(val));
35   }

```

ภาพที่ 3-35 ตัวอย่างชุดคำสั่งสำหรับการส่งแจ้งเตือนการเก็บตัวอย่างผ่านทาง line notify

7. การเขียนโค้ดเพื่อเชื่อมต่อ NETPIE 2020 การสร้างโปรเจกต์ และการสร้าง Dashboard เมื่อเข้าสู่หน้าเว็บไซต์ของ NETPIE (<https://netpie.io>) ที่ไอคอน LOGIN มุมบนขวาของเว็บไซต์ จะปรากฏตัวเลือกให้ผู้ใช้งานเลือกระหว่าง การเข้าใช้บริการ NETPIE2015 และ NETPIE2020 ในงานวิจัยนี้ผู้ใช้งานได้ใช้งาน NETPIE2020 ทำการ log in ด้วยอีเมลและรหัสผ่าน (ผู้ใช้งานต้องทำการสมัครบัญชีมาก่อนแล้ว) จะพบกับหน้าเริ่มต้นของเว็บไซต์ หากเคยสร้างโปรเจกต์ใดมาก่อนในหน้านี้อาจจะสรุปรายการทั้งหมดมาให้ โดยขั้นตอนการสร้างโปรเจกต์มีดังต่อไปนี้

1. หน้าเว็บไซต์ NETPIE2020 กดที่ไอคอนสีฟ้า มุมบนด้านขวาของเว็บไซต์ที่มีคำว่า create จากนั้นหน้าจอจะให้ผู้ใช้งานดัดภาพที่ 3-36 ในช่อง project name ให้ทำการตั้งชื่อตามที่ต้องการ โดยผู้วิจัยได้ตั้งชื่อว่า “Bioreactor” ส่วนในช่อง project description ระบบไม่ได้บังคับขึ้นอยู่กับผู้ใช้งานว่าต้องการจะใส่รายละเอียดหรือไม่ จากนั้นสามารถกดบันทึกที่ปุ่มสีฟ้า มุมขวาล่างได้ทันทีหลังจากใส่รายละเอียดทุกอย่างครบถ้วน

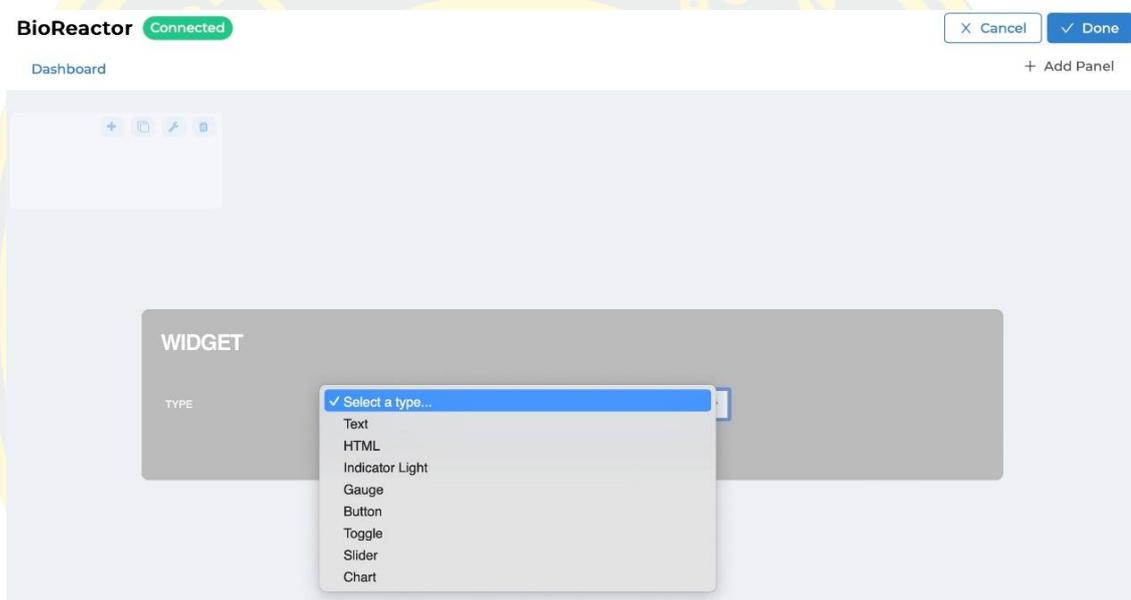


ภาพที่ 3-36 หน้าเว็บไซต์ NETPIE2020 (ขั้นตอนที่ 1)

2. เมื่อสร้าง Project เสร็จเรียบร้อยหน้าเว็บไซต์จะปรากฏ project ที่สร้างขึ้นมา เมื่อกดเลือกที่ project เว็บไซต์จะแสดงดังภาพที่ 3-37 ผู้ใช้งานสามารถสร้าง dashboards ได้โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 ที่แถบสีฟ้าด้านขวามือ ให้ไปที่ตัวเลือก console จากนั้นจะปรากฏเมนูชื่อว่า dashboard เลือกเมนูนี้ และกดที่ project ของผู้ใช้งาน โดยในงานวิจัยนี้ได้ตั้งชื่อ project คือ

“Bioreactor” จึงเลือกที่ project นี้ กดที่ไอคอนสีฟ้า มุมบนด้านขวาของเว็บไซต์ที่มีคำว่า create ในช่อง dashboard name ใส่ชื่อ project อีกครั้ง และกดบันทึก ระบบจะปรากฏข้อความว่า create dash success ผู้ใช้งานสามารถกดที่ dash ที่สร้างขึ้นมา และไปที่เมนู edit มุมบนขวาของเว็บไซต์ เมื่อกดระบบจะปรากฏเมนู + Add Panel กดหนึ่งครั้ง หน้าจอจะปรากฏวิดเจ็ต (widget) สีขาวขึ้นมา เลือกที่เครื่องหมาย + และเลือกชนิดของข้อมูลที่ต้องการแสดง ดังภาพที่ 3-37 เช่นงานวิจัยนี้ต้องการแสดงค่าอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่างในรูปแบบของ gauge จึงเลือกชนิดเป็น gauge



ภาพที่ 3-37 การเลือกชนิดข้อมูลที่ต้องการแสดงใน Dashboard ของ NETPIE2020 (ขั้นตอนที่ 2)

3. จากนั้นหน้าเว็บไซต์จะให้ผู้ใช้งานกรอกรายละเอียด โดยสามารถอธิบายได้ดังนี้
 - 3.1 type คือ ชนิดของข้อมูล ส่วนนี้ระบบจะเลือกให้อัตโนมัติ
 - 3.2 title คือ หัวข้อเรื่องใหญ่ที่จะแสดงในช่องนั้น ๆ
 - 3.3 value คือ ค่าที่ได้มาจากบอร์ด ESP ซึ่งรับค่ามาจากบอร์ด Arduino เป็นลำดับ
 - 3.4 unit คือ หน่วยของข้อมูล เช่น อุณหภูมิมีหน่วยเป็น °C หรือรอบการเก็บตัวอย่างมีหน่วยเป็น hour โดยสามารถคัดลอกหน่วยต่าง ๆ จากหน้าอินเทอร์เน็ตมาวางในช่องได้
 - 3.5 minimum คือ ค่าต่ำสุดที่ผู้ใช้งานกำหนด เช่น ในงานนี้ผู้วิจัยกำหนดค่าอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่างต่ำสุดคือ 0 องศาเซลเซียส (ในช่องนี้กรอกแค่ตัวเลขเท่านั้น)

3.6 maximum คือ ค่าสูงสุดที่ผู้ใช้งานกำหนด โดยกำหนดค่าอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่างสูงสุดคือ 28 องศาเซลเซียส จึงระบุตัวเลข 28 ในช่องนี้

3.7 decimal digit คือ จำนวนเลขทศนิยม

3.8 human friendly number คือ การแปลงข้อมูลที่เป็นตัวเลขในรูปแบบฐานสิบเป็นจำนวนเต็ม เช่น แปลงจาก 1,000,000 เป็น 1M

3.9 range colour คือ การระบุสีตามช่วงค่าตัวเลข โดยสามารถระบุได้หลากหลายสีในแต่ละช่วงค่าตัวเลขจากเมนู add และเลือกสีที่ต้องการ

3.10 range of percent คือ การแสดงค่าตัวเลขในช่วงร้อยละของค่าที่กำหนดไว้
 ดังภาพที่ 3-38

WIDGET

TYPE: Gauge

TITLE: Sample Collector

VALUE: 10 + DEVICE + VARIABLE EDITOR

UNITS: Hour

MINIMUM: 0

MAXIMUM: 24

DECIMAL DIGIT: 2

HUMAN FRIENDLY NUMBER: YES

RANGE COLOR:

From	To	Color
0	10	Green
11	20	Green
21	24	Dark Green

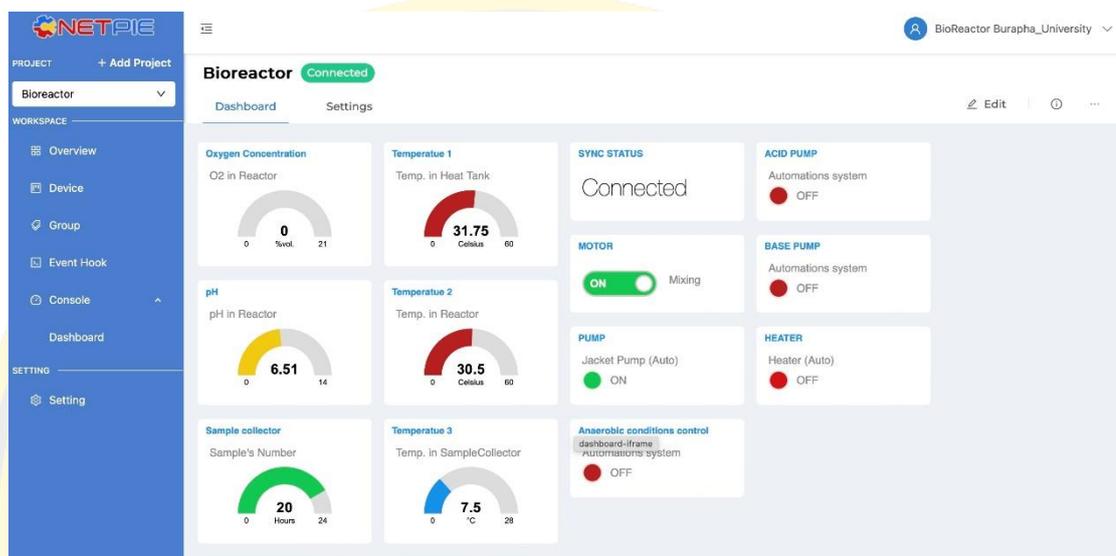
ADD

RANGE ON PERCENT: NO

ภาพที่ 3-38 การตั้งค่าหน้าวิดเจ็ตของ NETPIE2020 (ขั้นตอนที่ 3)

หากต้องการสร้างวิดเจ็ตแสดงผลในรูปแบบอื่นผู้ใช้งานสามารถศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมได้ทางคู่มือการใช้งาน NETPIE2020 platform (<https://docs.netpie.io/dashboard.html>) และในงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยได้กำหนดให้ แสดงวิดเจ็ตค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ค่าความเป็นกรด-ด่างในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ รอบการเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิใน

ถังต้มน้ำ อุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่าง รวมทั้ง แสดงสถานการณ์เชื่อมต่อของระบบ สถานการณ์ทำงานของมอเตอร์ สถานการณ์ทำงานของปั๊มที่ทำหน้าที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างใน และสถานการณ์ทำงานของระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน ดังภาพที่ 3-39



ภาพที่ 3-39 วิดเจ็ตแสดงสถานะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ และระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติ (ขั้นตอนที่ 4)

4. คำสั่งที่ใช้งานในการเชื่อมต่อบอร์ด ESP และ NETPIE2020 ดังภาพที่ 3-40 ส่วนที่สำคัญดังในชุดคำสั่งบรรทัดที่ 90 โดยคำสั่งในชุดนี้ เป็นการสั่งให้ส่งค่าสถานะทั้งหมดที่เคยกล่าวไปข้างต้น ไปยัง NETPIE2020 และแสดงเป็นหน้าวิดเจ็ต ในขณะที่เดียวกันชุดคำสั่งบรรทัดที่ 96 และ 97 ก็ประมวลผลส่งค่าสถานะไปบันทึกไว้ยัง Google sheets เช่นเดียวกัน

```

88 | client.loop();
89 | String place = "NECTEC";
90 | String data = "{\"data\": {\"pH\": \" + String(pH) + \", \"TempReactor\": \" + String(TempReactor) + \", \"TempSampleCol
91 | // Serial.println(\"data = \");
92 | // Serial.println(data);
93 | data.toCharArray(msg, (data.length() + 1));
94 | client.publish("@shadow/data/update", msg);
95 |
96 | String sheets1 = "http://maker.ifttt.com/trigger/Demo/with/key/bTmsHkq9xUx0HGE7JU_Hrz?value1=" + pH + "&value2=" +
97 | String sheets2 = "http://maker.ifttt.com/trigger/temp/with/key/n5nFIR8lwMBPrSFYPpWbbXISM-5sUUhPin_qzateXrr?value1="

```

ภาพที่ 3-40 ตัวอย่างชุดคำสั่งสำหรับการเชื่อมต่อและส่งข้อมูลไปยัง NETPIE2020 (ขั้นตอนที่ 5)

กระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

1.1 อาหารเลี้ยงแบคทีเรียชนิดเหลว (Cooked meat medium broth)

งานวิจัยนี้ใช้ Cooked meat medium broth โดยเป็นอาหารสำหรับใช้ในการกล่าแบคทีเรีย (Inoculation) อัตราส่วนในการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย คือ Cooked meat medium ขนาด 12.5 กรัม ซึ่งมีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.1 ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้อาหารเลี้ยงแบคทีเรียปราศจากสิ่งสกปรกอื่นใด เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ ทิ้งอาหารเลี้ยงแบคทีเรียให้อุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้องในตู้ปลอดแบคทีเรีย (Biological safety cabinet Class II)

ตารางที่ 3-1 องค์ประกอบของ Cooked meat medium broth

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
beef heart, solids	98.00
proteose peptone	20.00
sodium chloride	5.00
dextrose	2.00

1.2 อาหารเลี้ยงแบคทีเรียชนิดแข็ง (Cooked meat medium agar)

ใช้สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ได้โคโลนีของแบคทีเรีย *P. bif fermentans* เตรียมได้จาก Cooked meat medium broth แต่มีการเติม Agar powder bacteriological เพิ่มลงไปจำนวน 1.5 กรัมต่อ Cooked meat medium broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที เพื่อให้อาหารเลี้ยงแบคทีเรียปราศจากสิ่งสกปรกอื่นใด และเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการให้นำอาหารเลี้ยงแบคทีเรียไปเข้าตู้ปลอดแบคทีเรีย ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 40 ถึง 45 องศาเซลเซียส จากนั้นให้ทำการเท Cooked meat medium agar ลงในจานเพาะแบคทีเรีย (Petri dish sterile) และตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

1.3 อาหารเพื่อการหมัก Phosphate-Carbonate Medium (PCM)

อาหารหมัก PCM ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนของการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล และในงานวิจัยนี้มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาแทนน้ำตาลกลูโคสและนำมาเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารสูตรดั้งเดิมโดยมีองค์ประกอบตามตารางที่ 3-2

สามารถเตรียมได้โดยใช้น้ำกลั่น 1 ลิตร ยกเว้นสารละลายกลูโคสและโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ใช้ในปริมาตร 887 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องนิ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ นำเข้าตู้ปลอดแบคทีเรียและตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตที่ผ่านการทำให้ปลอดแบคทีเรียแล้ว 0.4% w/v โดยใช้ปริมาตร 80 มิลลิลิตร และสารละลายกลูโคสผ่านการทำให้ปลอดแบคทีเรียแล้ว 60% w/v ปริมาตร 33 มิลลิลิตร

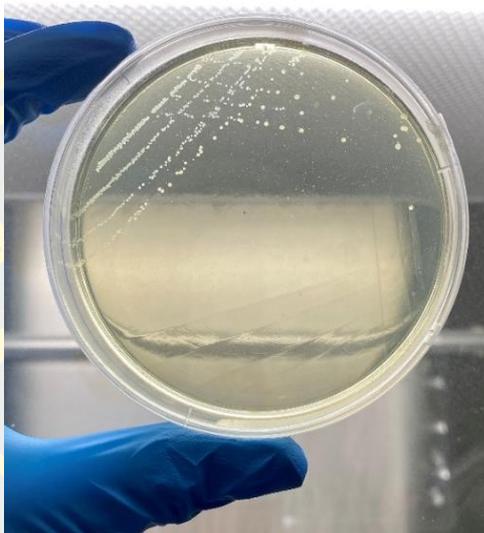
ตารางที่ 3-2 องค์ประกอบของอาหาร PCM

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
Glucose solution	20.00
Trypticase peptone	10.00
Yeast extract	6.00
Sodium hydrogen carbonate	4.00
Potassium dihydrogen phosphate	3.38
Magnesium sulfate heptahydrate	2.46
Sodium thioglycolate	0.50
Cobalt (II) chloride hexahydrate	0.0119
Resazurin	0.001

2. การกล้ำแบคทีเรีย *P. bif fermentans*

เนื้องด้วยแบคทีเรีย *P. bif fermentans* ถูกเก็บรักษาไว้ในตู้รักษาความเย็น อุณหภูมิติดลบ 80 องศาเซลเซียส จึงจำเป็นต้องนำแบคทีเรียบ่มในน้ำแข็งและเจลเก็บความเย็นที่อุณหภูมิติดลบ 20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำแบคทีเรียบ่มในน้ำแข็งและเจลเก็บความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าแบคทีเรียจะละลาย จากนั้นจึงทำการปิเปตแบคทีเรียปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Cooked meat medium broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นจึงทำการถ่ายโอนแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหาร Cooked meat medium agar โดยทำการปิเปตแบคทีเรียจาก Cooked meat medium broth ที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หยดลงบน Cooked meat medium agar ทำการแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ (Streak plate method) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 2 วัน ดังภาพที่ 3-41 เชื้อแบคทีเรียจำนวน 1 โคโลนี ไปเลี้ยงใน Cooked

meat medium broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการขยายแบคทีเรียให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการหมัก



ภาพที่ 3-41 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *P. bifermentans* ด้วยเทคนิค Streak plate

3. การเก็บรักษาแบคทีเรีย *P. bifermentans*

แบคทีเรีย *P. bifermentans* สามารถทำการขยายจำนวนด้วยการเชี่ยแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยว (Single colony) และนำไปเลี้ยงใน Cooked meat medium broth บ่มในตู้บ่มแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เมื่อเสร็จสิ้นจึงทำการเก็บรักษาแบคทีเรียด้วยการเติม Glycerol ลงไป 25% ของแบคทีเรีย โดยปิเปตแบคทีเรีย *P. bifermentans* ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microcentrifuge tube และเติม Glycerol บริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าแบคทีเรียแล้ว ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการปิดฝา Microcentrifuge tube พลิกหลอด 4 ถึง 5 ครั้งเพื่อให้ Glycerol และแบคทีเรียผสมเข้ากัน และทำการพันฝา Microcentrifuge tube ด้วยแผ่น Parafilm ให้สนิทพอสมควร ใส่ในกล่องเก็บแบคทีเรียและนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้รักษาความเย็นอุณหภูมิติดลบ 80 องศาเซลเซียส

4. การป้องกันการปนเปื้อนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ขั้นตอนป้องกันการปนเปื้อน (Contamination) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมักเนื่องจาก หากเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียอื่น อาจส่งผลให้แบคทีเรีย *P. bifermentans* ไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ สารตั้งต้นที่ใช้ในระบบจะถูกแบคทีเรียชนิดอื่นใช้ร่วมด้วย ดังนั้น ในส่วนของอาหารสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย และอุปกรณ์เครื่อง

แก้วที่เกี่ยวข้องทั้งหมด จะต้องถูกนำไปฆ่าแบคทีเรียภายในเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำ ด้วย อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที แต่อีกส่วนหนึ่งซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ไม่สามารถนำเข้า เครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำได้ เช่น ใบกวน (Impeller) ท่อทางเข้าและออกของสาร วาล์ว ควบคุมสารเข้าออกและท่อทางเข้าออกของแก๊ส แผ่นกั้นการกวน (Baffle) หรือแม้แต่พื้นที่ผิวสัมผัส ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จะใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 3% v/v หรือเอทานอลความเข้มข้น 75% v/v แช่ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 15 นาที ในการทำให้ไม่ปนเปื้อนแบคทีเรียอื่น เมื่อครบเวลา 15 นาที ใช้น้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าแบคทีเรียในเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำล้าง เป็นจำนวนทั้งสิ้น 3 ครั้ง เพื่อขจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกจากระบบ

เมื่อเสร็จสิ้นทั้งกระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียซึ่งใช้ในการหมัก และผ่าน กระบวนการฆ่าแบคทีเรียในระบบ อาหารเพื่อการหมักจะถูกนำไปใส่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและตาม ด้วยอาหารเลี้ยงแบคทีเรียซึ่งมีแบคทีเรีย *P. bifementans* เจริญอยู่ด้วย ทำการปิดฝาถัง ไล่ก๊าซ ออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ออกด้วยการพ่นก๊าซไนโตรเจนปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งปลายท่อทางออกของก๊าซ ออกซิเจนต้องจมอยู่ในน้ำยาฆ่าแบคทีเรีย คือ Dettol โดยใช้ส่วนผสมครึ่งฝา Dettol ต่อน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร ป้องกันแบคทีเรียชนิดอื่นเข้าสู่ระบบทางท่อออกของก๊าซออกซิเจนและสามารถเริ่มต้น กระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพได้ทันที โดยนำตัวอย่างในกระบวนการหมักไปตรวจ วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometre เพื่อวิเคราะห์อัตราการผลิต เจริญเติบโตของแบคทีเรีย

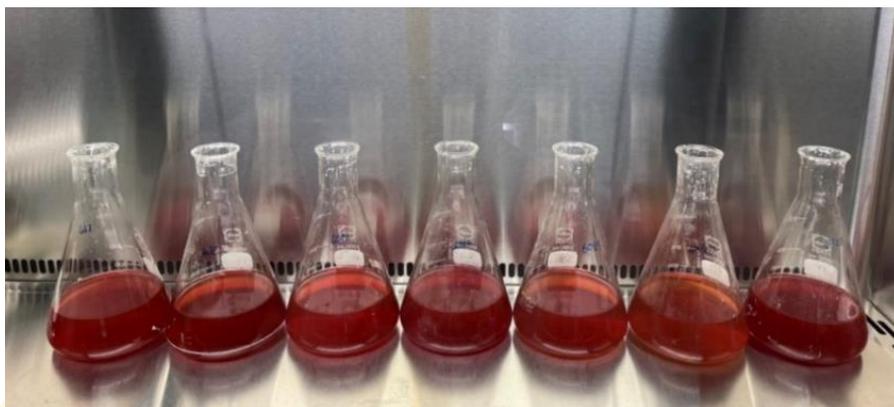
5. การทดลองหมักเพื่อผลิตบิวทานอลในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

เนื่องจากแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) ในอาหารเพื่อการหมัก PCM ถูกแทนที่ด้วยน้ำตาล จากกระบวนการไฮโดรไลซิสที่มีชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่แตกต่างกันในแต่ละวัตถุดิบที่นำมาสกัด ซึ่งอาจส่งผลต่อพฤติกรรมของแบคทีเรียในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงต้องมีการหมักเพื่อศึกษา ความสามารถในการผลิตบิวทานอลของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการกลายพันธุ์ส่งผล ต่อความสามารถในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันออกไป โดยแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยมีจำนวน 6 สายพันธุ์ ดังนี้ Wild type (WT), 45-20, 45-21, 60-12, 60-17 และ 60-25 (ตัวเลขจำนวน 2 หลัก ด้านหน้าเป็นเวลาสาดแสงยูวีในการกลายพันธุ์แบคทีเรียหน่วยเป็นวินาที ส่วนตัวเลขด้านหลังจำนวน 2 หลักมาจากลำดับของแบคทีเรีย เช่น 45-20 มีความหมายว่า แบคทีเรียถูกสาดแสงยูวีเป็นเวลา 45 วินาที เป็นแบคทีเรียโคลนที่ 20 จากงานวิจัยของเอกชัย ไกลถิ่น, 2018) โดยใช้แบคทีเรีย WT ที่ หมักในอาหาร PCM ที่ไม่ได้เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไลซิส เป็นตัว เปรียบเทียบ (Control) เริ่มต้นด้วยการปิเปตแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน Cooked meat medium broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นปิเปตแบคทีเรียในแต่ละหลอดปริมาตร

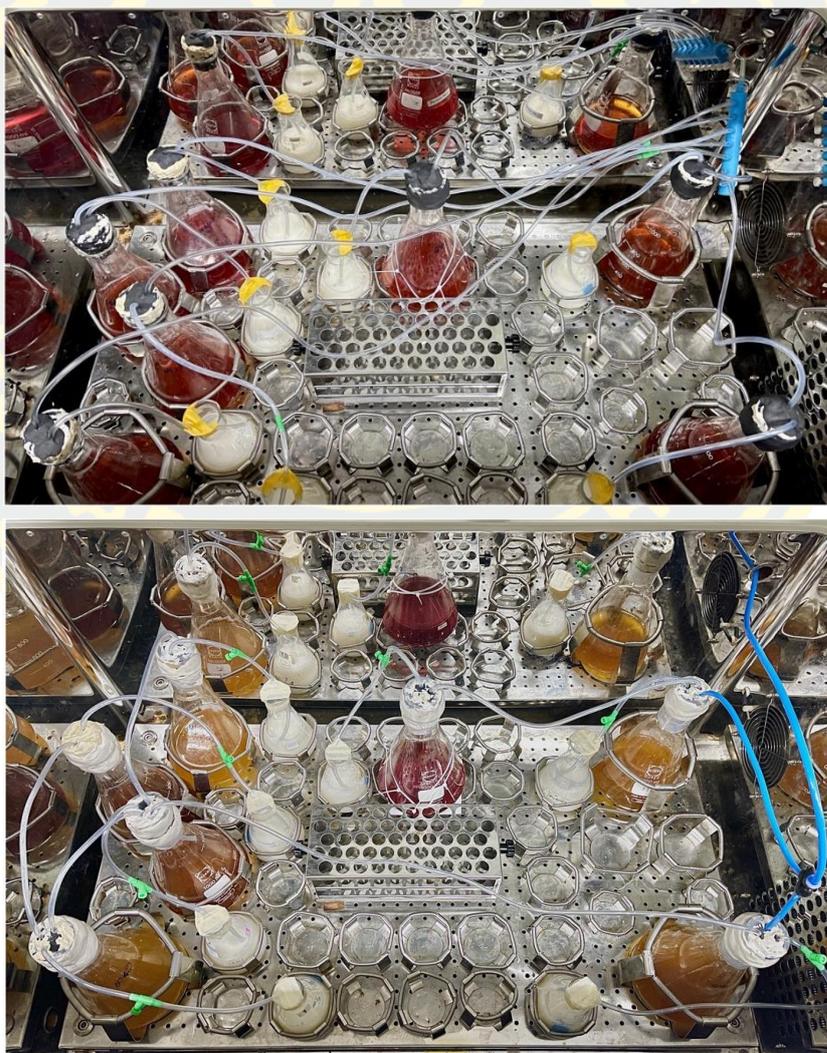
10 มิลลิลิตร ลงใน Cooked meat medium broth ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมในแต่ละขวด คือ 50 มิลลิลิตร รวมทั้งสิ้น 7 ขวด ดังภาพที่ 3-42 จากนั้นนำไปปั่นที่สภาวะเดิม เมื่อครบระยะเวลา จึงนำไปผสมกับอาหารเพื่อการหมัก PCM ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ดังภาพที่ 3-43 ในขวดรูปชมพู่ โดยมีปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร รวมทั้งสิ้น 7 ขวด ปิดฝาขวดรูปชมพู่ให้สนิท ทำการพ่นก๊าซไนโตรเจน ชนิด UHP (Ultra-high purity) เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนในขวดรูปชมพู่ ปลายท่อทางออกของก๊าซจะต้องจมอยู่ในน้ำยาฆ่าแบคทีเรีย Dettol เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียอื่น ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน ดังภาพที่ 3-44 และเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร โดยในวันที่ 1 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ในวันที่ 2 และวันที่ 3 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง ในวันที่ 4 และวันที่ 5 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ซึ่งการหมักในชุดการทดลองนี้ทำด้วยกันทั้งสิ้น 3 ชุดการทดลอง คือ น้ำตาลจากชานอ้อย น้ำตาลจากเปลือกสับปะรด และน้ำตาลจากเปลือกแตงโม ด้วยสภาวะเดิมในทุกชุดการหมัก เมื่อเสร็จสิ้นจึงนำวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย วิเคราะห์หาความเข้มข้นของบิวทานอล และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ



ภาพที่ 3-42 แบคทีเรีย *P. bif fermentans* ใน Cooked meat medium broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3-43 อาหารเพื่อการหมัก PCM ปริมาตร 450 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3-44 การหมักเพื่อผลิตบิวทานอลปริมาณ 500 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่

6. การทดลองหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ ปริมาตร 10 ลิตร ภายในถังประกอบด้วย อาหารเพื่อการหมัก PCM ปริมาตร 9 ลิตร และแบคทีเรียซึ่งเจริญเติบโตใน Cooked meat medium broth ปริมาตร 1 ลิตร การหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ดังภาพที่ 3-45 เริ่มต้นจากการป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดอื่น ดังหัวข้อที่ 4. การป้องกันการปนเปื้อนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการดังกล่าว จึงดำเนินการติดตั้งอุปกรณ์สำหรับตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ เช่น เซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจน เซ็นเซอร์ตรวจวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง หรือ เซ็นเซอร์ตรวจวัดอุณหภูมิให้พร้อมใช้งาน และอาหารเพื่อการหมัก PCM จะถูกเติมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ตามด้วยแบคทีเรียใน Cooked meat medium broth โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักครั้งนี้คือ *P. bif fermentans* รหัส 45-20 ซึ่งผ่านกระบวนการกลายพันธุ์ด้วยแสงยูวี ผ่านกระบวนการทดลองหมักบิวทานอลในขวดรูปชมพู่ และได้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงที่สุด มีการควบคุมสภาวะในการหมักดังนี้ ควบคุมอุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ด้วยการควบคุมอุณหภูมิของน้ำร้อนภายในถังต้มน้ำ ที่ไหลวนในชั้นของแจ็กเก็ตรอบตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่าง ให้อยู่ระหว่าง 5.5 ถึง 6.5 เพื่อให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ใกล้เคียงกับ 6 มากที่สุด โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 M ในการลดค่าความเป็นกรด - ด่าง และใช้สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 M ในการเพิ่มค่าความเป็นกรด - ด่าง ควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยการพ่นก๊าซไนโตรเจนบริเวณผิวหน้าถังหมักเป็นระยะเวลาประมาณ 5 ถึง 10 นาที สายทางออกท่อก๊าซออกซิเจนต้องจมอยู่ในขวดที่บรรจุน้ำยาฆ่าแบคทีเรีย Dettol อัตราส่วน Dettol ครึ่งฝาต่อน้ำสะอาด 500 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันแบคทีเรียชนิดอื่นเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพจากสายทางออกก๊าซออกซิเจน ระยะเวลาในการหมักรวมทั้งสิ้น 16 วัน และทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 1 ถึง วันที่ 5 ทุก 1 ชั่วโมง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นวันที่ 6 ถึงวันที่ 16 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง โดยการเก็บตัวอย่างในลักษณะนี้ เพื่อป้องกันไม่ทำให้ปริมาณน้ำหมักหายไปมากจนกระทบต่อระบบการหมักและกระทบต่อการความสามารถในการตรวจวัดของเซ็นเซอร์บางชนิดที่ต้องจมอยู่ในน้ำหมัก ซึ่งปริมาตรรวมจากการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ในลักษณะนี้รวมทั้งสิ้น 1200 มิลลิลิตร (1.2 ลิตร) ถือว่าเป็นปริมาตรที่ไม่มากและไม่ส่งผลกระทบต่อระบบโดยรวม



ภาพที่ 3-45 ภาพรวมของกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร ทำงานร่วมกับเครื่องเก็บตัวอย่างและระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน

7. การวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมัก

เพื่อให้ทราบถึงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (Growth rate) ของแบคทีเรีย *P. bifermentans* รหัส 45-20 ในระยะเวลาการหมักทั้งสิ้น 16 วัน จึงต้องดำเนินการวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometre ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยนำสารผลิตภัณฑ์ซึ่งได้จากการเก็บตัวอย่างดังที่ได้กล่าวไปข้างต้นในหัวข้อ 3.2.9 นำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นจึงสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์และระยะเวลาในกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ

8. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก

เพื่อให้ทราบถึงปริมาณความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ในแต่ละช่วงระยะเวลาในกระบวนการหมักตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก จึงมีการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง Gas chromatography-flame ionization detector (GC/FID) ใช้ Carrier gas ซึ่งเป็น Mobile phase คือ Helium gas อุณหภูมิ Injection port และส่วนของ Detector เท่ากับ 200 องศาเซลเซียส โดยการนำสารผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักไปวัดความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสคงเหลือด้วยวิธี DNS

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ ต้องมีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคงเหลืออยู่ในกระบวนการหมัก เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียแบคทีเรียใช้น้ำตาลไปมากน้อยเพียงใด เนื่องจากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นและแบคทีเรียใช้ในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ดังนี้

วิธีการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS เป็นวิธีที่อาศัยการเปลี่ยนสีจากการเกิดตะกอนสีตาลจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 3, 5-Dinitrosalicylic acid และน้ำตาลกลูโคส ทำให้สีของสาร DNS เปลี่ยนจากสีเหลืองใสเป็นสีน้ำตาล จากหลักการดังกล่าวจึงสามารถใช้เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงไปในสารละลายน้ำหมักได้ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. ทำการสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ด้วยการนำสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 กรัมต่อลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS โดยปีเตตสารละลายน้ำตาลและสารละลาย DNS มาผสมกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในหลอดทดลองและผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 2 นาที เสร็จแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และทำการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาล และสร้างสมการเส้นตรงของกราฟ

2. เมื่อต้องการทดสอบหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในน้ำหมัก ให้ทำการนำน้ำหมักมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS ดังเช่นข้อที่ 1 โดยเปลี่ยนจากการใช้สารละลายน้ำตาลที่ทราบค่าความเข้มข้นเป็นน้ำหมักตัวอย่างที่ยังไม่ทราบความเข้มข้นของน้ำตาล เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วให้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานหรือแทนค่าในสมการเส้นตรงเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาล

10. การวิเคราะห์ผลได้จากกระบวนการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ

หลังจากเสร็จสิ้นการหมักจะต้องมีการวิเคราะห์ผลได้ อัตราการผลิต (Productivity) และคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth rate; SG) โดยสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3-1, 3-2 และ 3-3 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตบิวทานอลของแบคทีเรียแต่ละรหัสน์ (แบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม และแบคทีเรียกลายพันธุ์) ในอาหารหมักแต่ละสูตรที่แตกต่างกันออกไป

$$\text{อัตราการผลิต} = \frac{\text{ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)}} \quad 3-1$$

$$\text{ผลได้ร้อยละ} = \frac{\text{ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ (กรัม)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัม)}} \quad 3-2$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ} = \frac{(OD)_{t=x} - (OD)_{t=0}}{t \text{ (hr)}}$$

3-3



บทที่ 4

ผลการดำเนินงาน

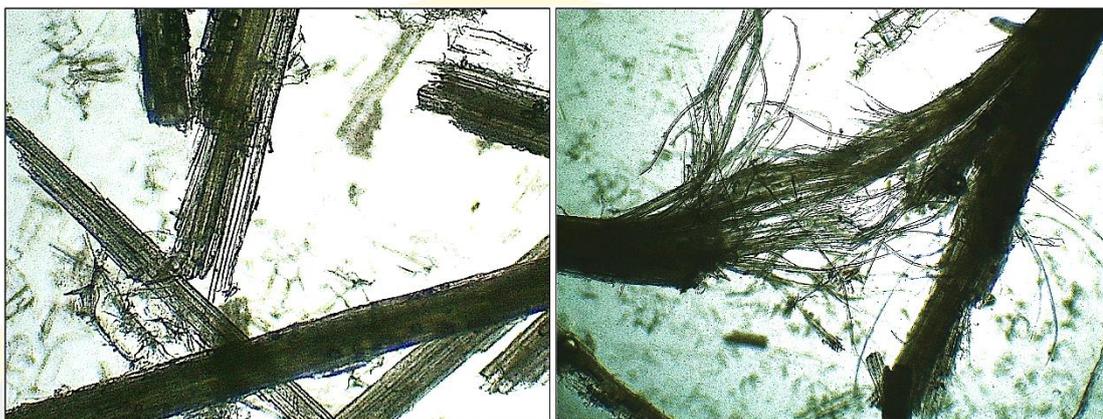
ผลการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

ในงานวิจัยฉบับนี้ใช้วัตถุดิบตั้งต้น 3 ชนิด ได้แก่ ชานอ้อย เปลือกสับปะรด และเปลือกแตงโม สำหรับสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยมีผลการสกัดดังนี้

1. การสกัดน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อย

1.1 ประสิทธิภาพการปรับสภาพชานอ้อยด้วยวิธี Alkaline pretreatment สิ่งที่ใช้วัดประสิทธิภาพการปรับสภาพชานอ้อย คือ ปริมาณลิกนินของชานอ้อยที่หายไป ซึ่งทำการวัดปริมาณลิกนินทั้งก่อนปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และหลังการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ปริมาณลิกนินในชานอ้อยก่อนปรับสภาพเท่ากับ $19.78 \pm 0.48\%$ และปริมาณลิกนินหลังการปรับสภาพเท่ากับ $9.44 \pm 0.54\%$ วัตถุประสงค์หลักในการปรับสภาพชานอ้อย คือ การกำจัดลิกนิน ซึ่งลิกนินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Ndaba, Roopnarain, Daramola, & Adeleke, 2020) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องกำจัดลิกนินออกให้ได้มากที่สุด และด้วยองค์ประกอบของชานอ้อย ลิกนินเป็นองค์ประกอบมีความแข็งแรง และอยู่ชั้นนอกสุดห่อหุ้มเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลที่จะทำการสกัดในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากหากไม่สามารถกำจัดปริมาณลิกนินออกได้มากเพียงพอหรือกำจัดออกได้น้อย ความสามารถในการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก็จะน้อยลงตามไปด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Wunna, Nakasaki, Auresenia, Abella, & Gaspillo, 2017) ที่ทำการศึกษา ผลการปรับสภาพชานอ้อยด้วยวิธี Alkali pretreatment เพื่อกำจัดลิกนินจากชานอ้อย พบว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 2% wt ดำเนินการในเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที สามารถกำจัดลิกนินออกได้มากถึง 87.3% กลไกการกำจัดลิกนินด้วยวิธี Alkaline pretreatment เรียกว่า Saponification เป็นการทำลายพันธะ Ester bonds ที่จับอยู่ระหว่างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส (Ratanasumarn & Chitprasert, 2020) ด้วยการแตกตัวของโซเดียมไฮดรอกไซด์ระหว่าง Na^+ และ OH^- ส่งผลให้ Ester bonds ซึ่งทำหน้าที่ยึดระหว่างลิกนินและเฮมิเซลลูโลสขาดออกจากกัน เกิดการบวมของชานอ้อย เป็นผลดีต่อการนำไปเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิส เนื่องจากการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้แก่ชานอ้อยเอง (W. Wang et al., 2020) เมื่อนำชานอ้อยส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound light microscope) ที่กำลังขยาย 100X จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า (ก) ชานอ้อยก่อนปรับสภาพมีลักษณะเป็นชั้น ยึดติดกันแน่นอย่างชัดเจน แต่เมื่อ (ข) ผ่านกระบวนการปรับสภาพจะเห็นว่า ชานอ้อยแตกออกจากกัน และมีลักษณะเป็นเส้นใยมากขึ้นจากการ

หายไปของลิกนินดังภาพที่ 4-1 ซึ่งส่วนที่เป็นเส้นใยนั้นเรียกอีก Amorphous cellulose และส่วนที่ยึดติดกันแน่นของชานอ้อยจะถูกเรียกว่า Crystalline cellulose (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2013)



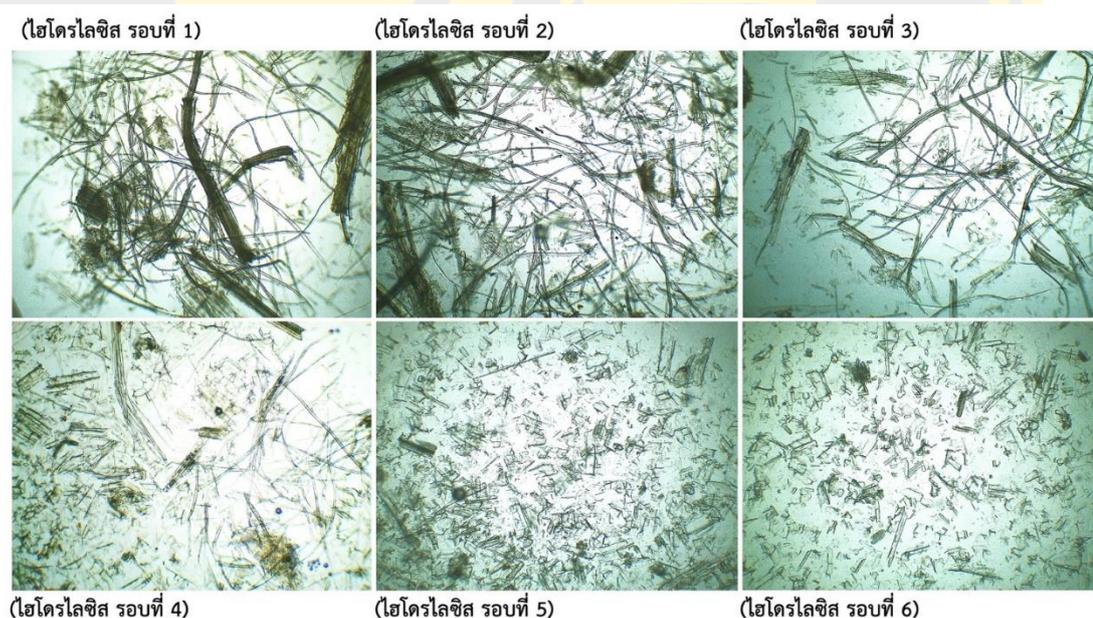
(ก)

(ข)

ภาพที่ 4-1 ลักษณะชานอ้อย (ก) ก่อนปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ (ข) หลังปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.2 ประสิทธิภาพการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Steam hydrolysis ชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพ จะถูกนำมาสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยดำเนินการในเครื่องนึ่งฆ่าแบคทีเรียแรงดันไอน้ำภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที ในอัตราส่วน ชานอ้อย 45 กรัมต่อน้ำปราศจากไอออน 500 มิลลิลิตร เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์จึงนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ในการไฮโดรไลซิสครั้งที่ 1 มีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่ามีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงเกินกว่า 20 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในสูตรอาหารเพื่อการหมักบิวทานอล ผู้วิจัยจึงนำชานอ้อยจากกระบวนการไฮโดรไลซิสครั้งที่ 1 ออบให้แห้งในตู้อบรมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักของชานอ้อยจะคงที่ นำชานอ้อยไปไฮโดรไลซิสในอัตราส่วนเดิมอีกครั้ง และตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ในการไฮโดรไลซิสครั้งที่ 2 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 25.32 กรัมต่อลิตร ไฮโดรไลซิสครั้งที่ 3, 4, 5, และ ครั้งที่ 6 พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 22.92, 22.16, 19.00, และ 16.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำชานอ้อยหลังการไฮโดรไลซิสในรอบที่ 1 ถึง รอบที่ 6 ส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Compound light microscope) ที่กำลังขยาย 100X ดังภาพที่ 4-2 จะสังเกตเห็นว่าเส้นใยเดี่ยว หรือ Amorphous cellulose ที่มีลักษณะยาวเรียวของชานอ้อยในการไฮโดรไลซิสรอบที่

1 และ 2 มีปริมาณใกล้เคียงกัน ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรอบที่ 1 และ 2 ใกล้เคียงกัน เนื่องจากเส้นใยชานอ้อยนี้จะถูกเปลี่ยนจากสายยาวไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนชานอ้อยที่จับตัวกันแน่น หรือที่เรียกว่า Crystalline cellulose ซึ่งยากต่อการเปลี่ยนไปเป็นโมเลกุลของน้ำตาล (Nooshin Rahnema et al., 2013) และในการไฮโดรไลซิสรอบที่ 3 จะพบว่า Amorphous cellulose ของชานอ้อยเริ่มมีปริมาณลดน้อยลง แต่ Crystalline cellulose ของชานอ้อยยังคงมีอยู่ สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างต่อเนื่องในรอบที่ 3 ส่วนการไฮโดรไลซิสรอบที่ 4 และ 5 พบว่า ปริมาณ Amorphous cellulose ลดน้อยลงอย่างต่อเนื่อง จนถึงรอบการไฮโดรไลซิสรอบที่ 6 พบว่า เหลือเพียง Crystalline cellulose อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยน Amorphous cellulose ของชานอ้อยไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละรอบของการไฮโดรไลซิส โดยหลักการคือ เมื่อน้ำเกิดการแตกตัวเป็นละอองไอน้ำ ได้โมเลกุลของ H^+ และ OH^- ส่งผลให้พันธะ Ester bonds ซึ่งทำหน้าที่ยึดระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลแต่ละโมเลกุลต่อกันเป็นสายยาวขาดออกจากกัน และเกิดเป็นโมเลกุลเดี่ยวของน้ำตาล การที่ Ester bonds ขาดออกจากกันได้ในขณะที่เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส



ภาพที่ 4-2 ลักษณะชานอ้อยที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสรอบที่ 1 ถึง รอบที่ 6

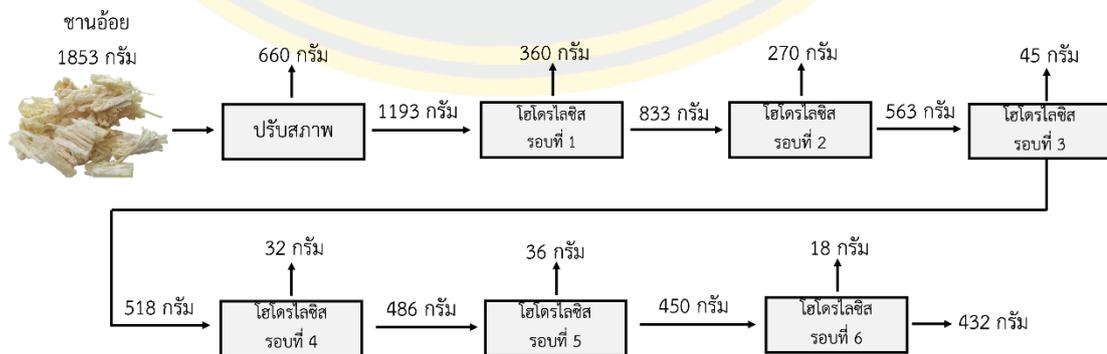
เมื่อดำเนินการวิเคราะห์ผลได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสทั้ง 6 รอบ พบว่า กระบวนการไฮโดรไลซิสรอบที่ 2 มีผลได้ (Y) มากที่สุด คือ 16.88% รองลงมาคือ รอบที่ 1 ผลได้ 15.46% และรอบที่ 3, 4, 5, และ 6 เท่ากับ 15.26%, 14.50%, 11.33%, และ 10.03% ตามลำดับ ดังรูปที่ 4-3 ทำการคำนวณสมดุลมวลสาร (Mass balance) ตั้งแต่กระบวนการปรับสภาพชานอ้อย จนถึง

กระบวนการไฮโดรไลซิสรอบที่ 6 พบว่า มีชานอ้อยตั้งต้นเข้าสู่ระบบทั้งหมด 1,853 กรัม และเหลือออกจากกระบวนการไฮโดรไลซิสในรอบที่ 6 เท่ากับ 432 กรัม คำนวณเป็นชานอ้อยที่หายไปเท่ากับ 1,421 กรัม แสดงดังภาพที่ 4-4 และในท้ายที่สุดจากกระบวนการไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นทั้ง 6 รอบ จึงสามารถสรุปได้ว่า หากต้องการที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร การไฮโดรไลซิสเพียง 2 รอบ ถือว่าเพียงพอสำหรับการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาจากชานอ้อย หากไฮโดรไลซิสมากกว่า 3 รอบ จะส่งผลให้ผลได้ลดน้อยลงซึ่งหมายความว่า ไม่มีความคุ้มค่าแต่อย่างใด ดังนั้นกระบวนการไฮโดรไลซิสไม่ควรดำเนินการมากกว่า 3 รอบ

ปริมาณน้ำตาลจากกระบวนการไฮโดรไลซิสชานอ้อย



ภาพที่ 4-3 ผลได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสชานอ้อยทั้ง 6 ครั้ง



ภาพที่ 4-4 การคำนวณสมดุลมวลสารในกระบวนการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสชานอ้อย

2. การสกัดน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับประรดและเปลือกแตงโม พบว่า สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับประรดได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 23.74 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ (Casabar, Unpaprom, & Ramaraj, 2019) ซึ่งการทำหมักเพื่อผลิตเอทานอลด้วยการนำเปลือกสับประรดมาผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และนำเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิส พบว่า การไฮโดรไลซิสเปลือกสับประรดด้วยน้ำสะอาดส่งผลให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 279.05 ± 20.67 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามถึงแม้ในงานวิจัยที่นำมาเปรียบเทียบจะได้น้ำตาลรีดิวซ์ในความเข้มข้นที่สูงกว่าในงานวิจัยฉบับนี้ แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านเวลาที่ใช้ในกระบวนการไฮโดรไลซิสที่นานถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งในการผลิตเชิงอุตสาหกรรมมีความจำเป็นต้องผลิตในระยะเวลาที่รวดเร็ว ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้พัฒนากระบวนการสกัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ระยะเวลาเพียง 30 นาที และได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพียงพอต่อการนำไปใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งจัดเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพื่อการหมัก PCM สำหรับแบคทีเรีย *P. bifementans* เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเพื่อการหมักใช้ความเข้มข้นที่ 20 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการที่งานวิจัยฉบับนี้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยน้ำสะอาดในเวลาเพียง 30 นาที และได้ความเข้มข้นมากถึง 23.74 กรัมต่อลิตร จึงเพียงพอต่อการนำไปใช้งานเพื่อแทนแหล่งคาร์บอนเดิมในอาหารหมัก

ในส่วนการผลิตน้ำตาลจากเปลือกแตงโมสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 30.19 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรไฮโดรไลซิสด้วยกรดในงานวิจัยของ (Chaudhary et al., 2021) ซึ่งใช้กรดในการไฮโดรไลซิสเปลือกแตงโมและได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 25.8 ± 0.06 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงการใช้สารละลายทั้งหมดและต่างในกระบวนการไฮโดรไลซิส พบว่า การใช้ น้ำสะอาดในกระบวนการปรับสภาพและไฮโดรไลซิสทั้งเปลือกสับประรดและแตงโมส่งผลให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงมากกว่า การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และการใช้สารละลายกรดเนื่องจาก เมื่อใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในกระบวนการปรับสภาพหรือไฮโดรไลซิส หลังเสร็จสิ้นกระบวนการจำเป็นต้องทำการปรับสภาพของเหลวให้เป็นกลางด้วยสารละลายกรดหรือต่าง ซึ่งโดยปกติแล้วนั้นเมื่อกรดและด่างทำปฏิกิริยากันจะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นเกลือหรือสารที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาอื่น เช่น ฟิวแรนส์ ฟีนอล และ กรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสและกระบวนการผลิตสารสำคัญทั้งสิ้น (Klinke, Thomsen, & Ahring, 2004)

ผลการพัฒนาถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ

1. ผลการสร้างเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ เพื่อนำมาใช้งานร่วมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งถูกสร้างโดย (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) ถูกคำนวณในทางทฤษฎีดังแสดงในบทที่ 3 และขึ้นรูปโดย ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอส เค แมชชีน แอนด์ เวลดีง จังหวัดระยอง ซึ่งมีลักษณะโดยรวมใกล้เคียงกับโครงร่างที่ออกแบบไว้ ดังภาพที่ 4-5 โดยมีรายละเอียดเครื่องเก็บตัวอย่างที่ถูกขึ้นรูปจริง ดังต่อไปนี้

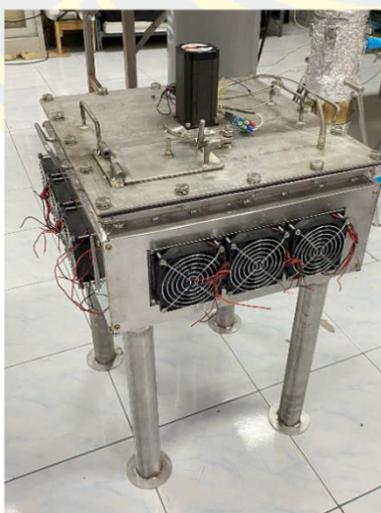
1.1 ด้านบนมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมด้านเท่าขนาด 430.00 × 430.00 มิลลิเมตร และยังประกอบด้วย ช่องเปิดสำหรับเก็บหลอดตัวอย่างมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 80.00 × 120.00 มิลลิเมตร มีท่อสำหรับจ่ายสารตัวอย่างเชื่อมต่อกับข้อต่อนิวเมติกส์ (pneumatic fitting) แบบตรงกันกลับเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.00 มิลลิเมตร ต่อกับสายยางซึ่งมีเส้นรอบวงด้านนอก 6.00 มิลลิเมตร และมีเส้นรอบวงด้านใน 4.00 มิลลิเมตร เพื่อลำเลียงสารตัวอย่างลงในหลอดเก็บตัวอย่างดังภาพที่ 4-6 (ก)

1.2 ด้านข้างทั้ง 4 ด้าน ติดตั้งชุดทำความเย็น ซึ่งมีขนาด 160.00 × 420.00 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 4-6 (ข)

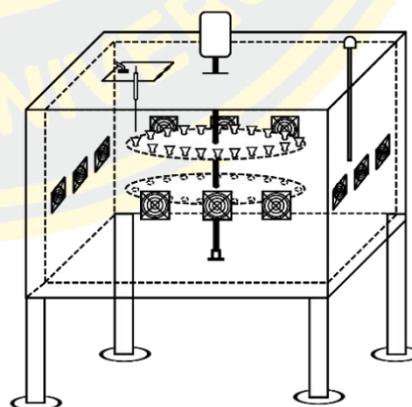
1.3 ขาตั้งเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติมีขนาด 400.00 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 4-6 (ข)

1.4 ด้านในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติเป็นสี่เหลี่ยมด้านเท่าขนาด 370.00 × 370.00 มิลลิเมตร มีฉนวนกันความร้อน ส่วนทำความเย็น แผ่นจานใส่หลอดเก็บตัวอย่าง และแท่งแกนหมุนติดตั้งอยู่ภายในดังภาพที่ 4-56 (ค)

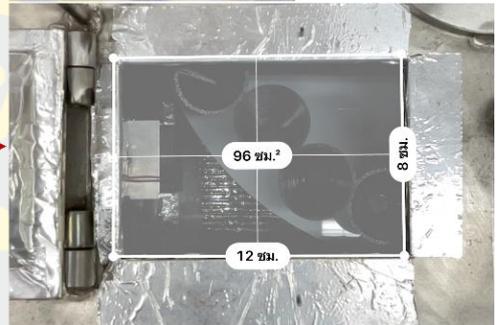
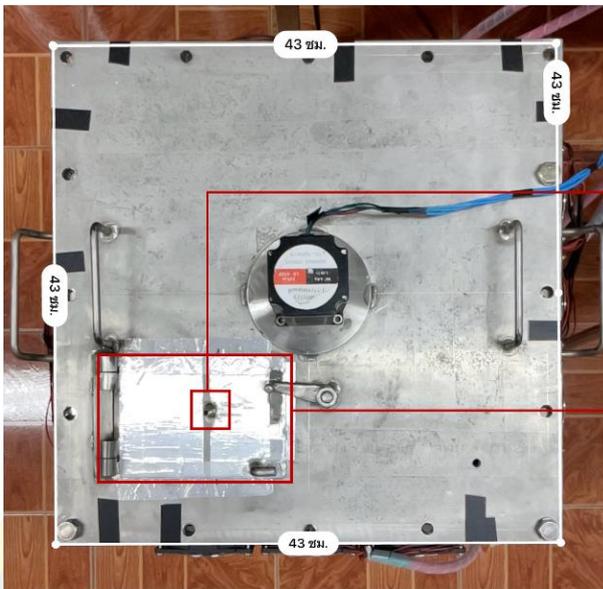
เครื่องเก็บตัวอย่างจากการสร้างจริง



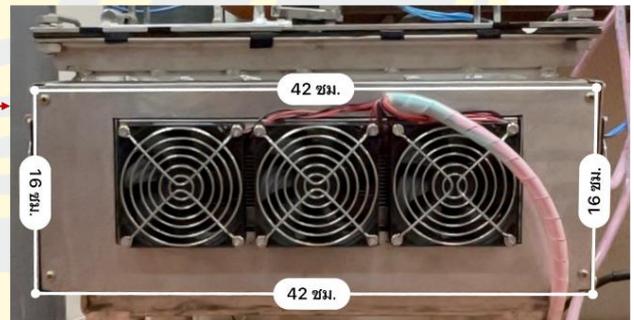
เครื่องเก็บตัวอย่างจากการออกแบบ



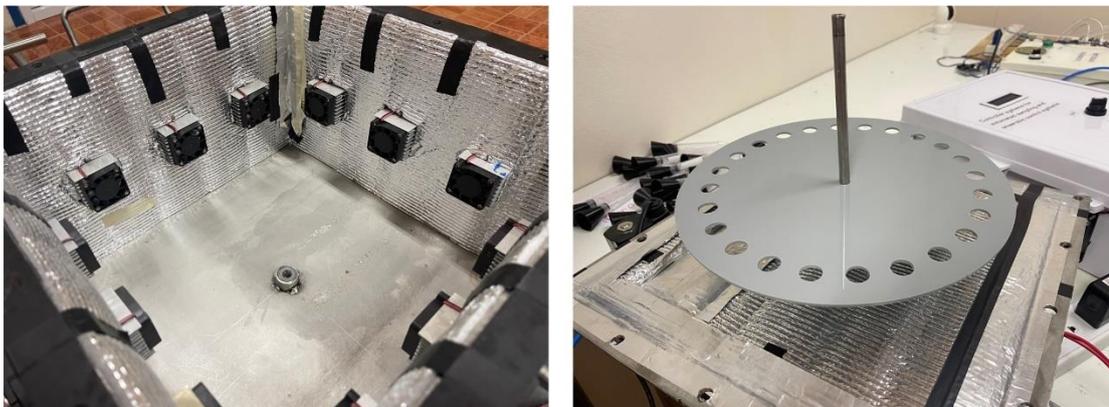
ภาพที่ 4-5 ลักษณะโดยรวมของเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติที่สร้างขึ้นเปรียบเทียบกับที่ถูกออกแบบ



(ก)



(ข)

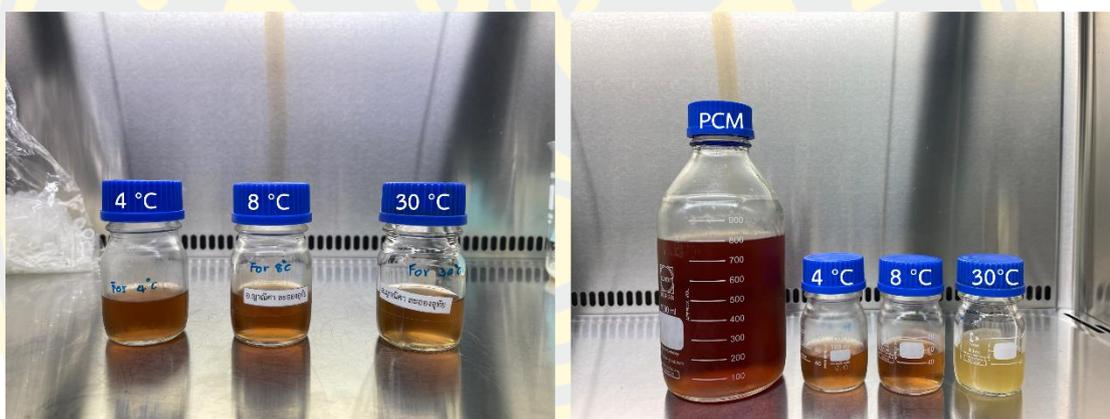


(ค)

ภาพที่ 4-6 สัดส่วนเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติจากการใช้เทคโนโลยี Light detection and ranging (LiDAR) วัดจากเครื่องเก็บตัวอย่างจริง (ก) สัดส่วนและอุปกรณ์ด้านบนของเครื่อง (ข) ความสูงของขาตั้งและชุดทำความเย็นด้านข้าง (ค) สัดส่วนและอุปกรณ์ด้านในเครื่อง

2. ผลการทดสอบความสามารถในการรักษาสภาพสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ ABE ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ โดยปกติในการชะลออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือรักษาสภาพของตัวอย่างในช่วงเวลาหนึ่งจะต้องทำการเก็บรักษาไว้ยังตู้แช่ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 4 องศาเซลเซียส แต่เนื่องด้วยชุดทำความเย็นซึ่งถูกติดตั้งเข้าไปกับเครื่องเก็บตัวอย่างมีความสามารถในการทำอุณหภูมิต่ำเพียง 7 องศาเซลเซียส (จากการทดสอบเดินระบบในสัปดาห์แรกหลังจากได้รับเครื่องมา) และด้วยลักษณะจำเพาะของอาหารเพื่อการหมัก PCM คือ หากแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตและผลิตรดอกออกมาเพื่อย่อยสลายสารอาหารเข้าสู่เซลล์ อาหารเพื่อการหมัก PCM จะทำปฏิกิริยากับกรด และเปลี่ยนจากสีน้ำตาลส้ม (Burnt orange) ซึ่งเป็นสีอาหารปกติไปเป็นสีเหลืองจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย Resazurin หนึ่งในองค์ประกอบของสูตรอาหารเพื่อการหมัก PCM เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเกิดเป็น Dihydroresorufin ซึ่งมีสีเหลือง (Srivastava & Pande, 2017) ด้วยลักษณะเด่นเช่นนี้ ผู้วิจัยจึงทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *P. bifementans* และนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อการหมัก จากนั้นนำน้ำหมักไปแช่ไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิทั้ง 3 ตู้คือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรีย *P. bifementans* ที่ถูกนำไปบ่มยังอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเจริญเติบโต และผลิตรดอกออกมา ส่งผลให้สีของอาหารเพื่อการหมัก PCM เปลี่ยนเป็นสีเหลืองใส ส่วนขวดที่ถูกนำไปเก็บรักษาไว้ยังตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียสพบว่า สีของอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง ยังคงเป็นสีน้ำตาลส้มเหมือนเช่นเดิม และเมื่อนำ ขวด

ทดลองทั้งหมดเปรียบเทียบกับสีของอาหารเพื่อการหมักในขวดทดลอง 1000 มิลลิลิตร พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สีของอาหารเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีเหลืองอย่างชัดเจน ส่วนขวดทดลองที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส ยังคงมีสีใกล้เคียงกับสีมาตรฐานของอาหารเพื่อการหมัก PCM ดังภาพที่ 4-7 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติที่มีความสามารถในการลดและควบคุมอุณหภูมิได้ระหว่าง 7.00 ถึง 9.50 องศาเซลเซียส จะสามารถรักษาสภาพตัวอย่างและชะลออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในหลอดตัวอย่าง ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องด้วยตัวอย่างที่ถูกเก็บมาจากกระบวนการหมัก ต้องถูกทิ้งไว้ในเครื่องเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรืออาจนานมากกว่านั้น หากเครื่องเก็บตัวอย่างไม่สามารถชะลออัตราการเจริญเติบโตและรักษาสภาพตัวอย่างไว้ได้ จะส่งผลให้เมื่อนำไปวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต และวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดความคลาดเคลื่อนจากค่าจริง รวมทั้งส่งผลต่อการวิเคราะห์ในส่วนอื่นอีกด้วย

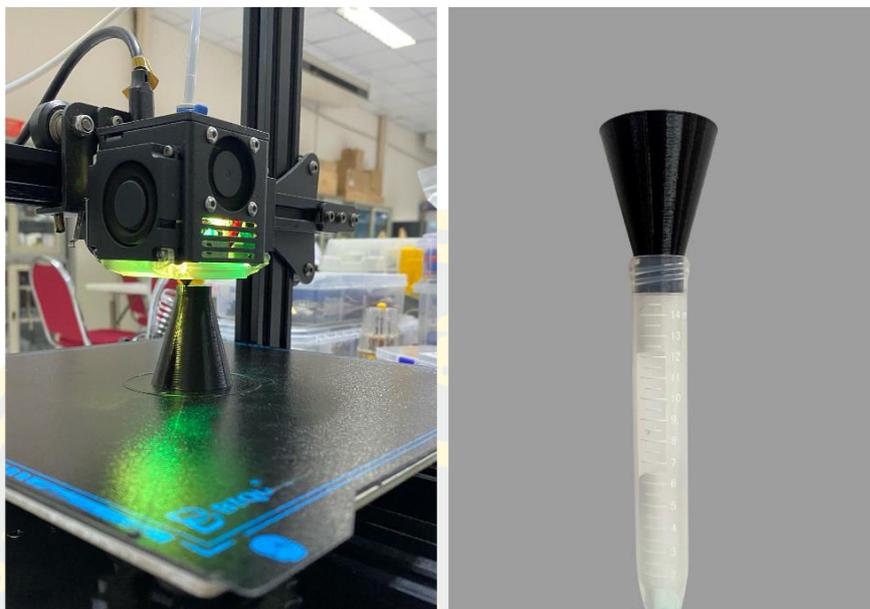


(ก)

(ข)

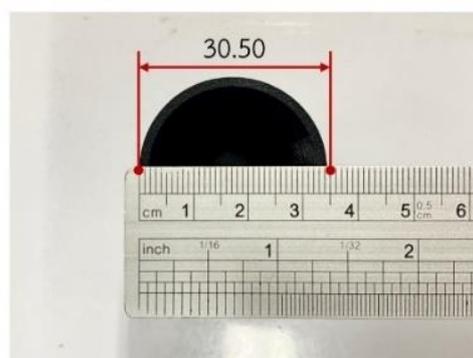
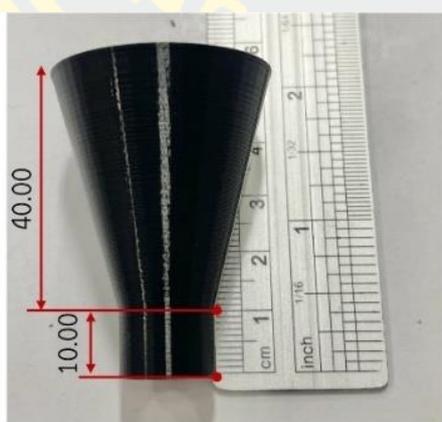
ภาพที่ 4-7 การทดสอบความสามารถในการชะลอการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ก) ก่อนนำตัวอย่างไปเก็บรักษายังตู้ควบคุมอุณหภูมิ (ข) หลังนำตัวอย่างเก็บรักษาไว้ยังตู้ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสีจากอาหาร PCM

3. ผลการสร้างกรวยสำหรับใส่ในหลอดเก็บตัวอย่าง เมื่อคำนวณตามทฤษฎีเสร็จสิ้น ผู้วิจัยจึงใช้โปรแกรม AutoCAD ในการร่างแบบ สั่งขึ้นรูปด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ BIQU B1 3D printer TFT35 B1 V3.0 dual operation system FDM และใช้ Filament ชนิด Polylactic acid (PLA) ในการขึ้นรูปจริงดังภาพที่ 4-8



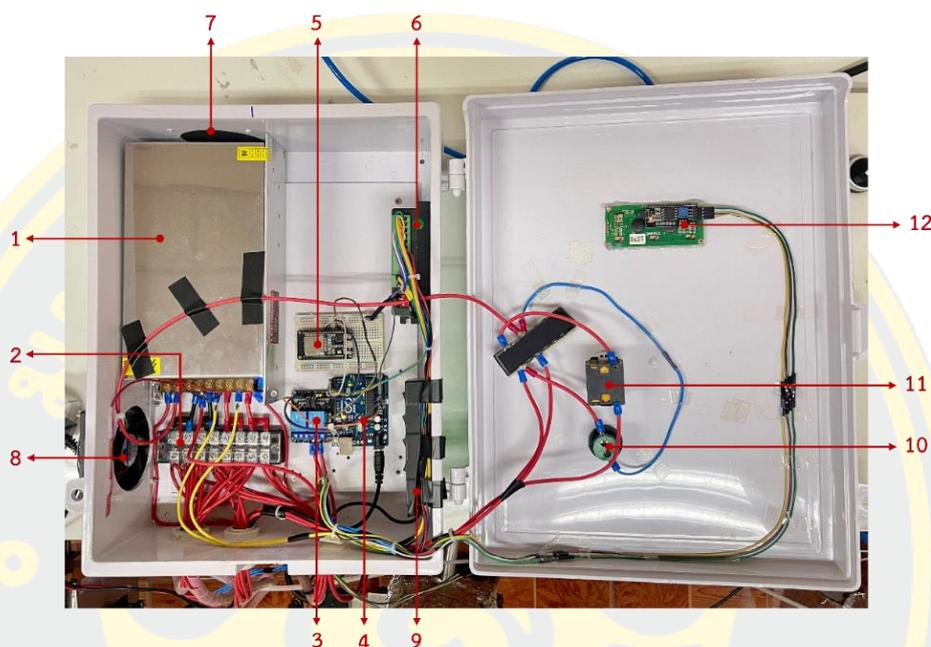
ภาพที่ 4-8 เครื่องพิมพ์ 3 มิติซึ่งใช้ชิ้นรูปกรวยใส่หลอดเก็บตัวอย่าง

เนื่องจากปากหลอดเก็บตัวอย่างเดิมมีขนาดเล็ก กรวยที่ถูกขึ้นรูปจะถูกนำไปสวมใส่กับหลอดเก็บตัวอย่างเพื่อเพิ่มพื้นที่ปากหลอดเก็บตัวอย่างให้มีขนาดใหญ่ขึ้น อีกทั้งยังเป็นการป้องกันการล้นหรือกระเด็นของสารตัวอย่างไม่ให้ปนกับหลอดอื่น โดยมีรายละเอียดเมื่อขึ้นรูปจริง คือ ความสูงโดยรวม 50.00 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 30.50 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 4-9



ภาพที่ 4-9 ขนาดสัดส่วนจริงของกรวยสำหรับใส่หลอดเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

4. ผลการติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมต่าง ๆ ในกล่องควบคุม จากการออกแบบไว้ข้างต้นในบทที่ 3 สามารถนำอุปกรณ์ควบคุมทั้งหมดจัดวางในกล่องควบคุมได้ดังภาพที่ 4-10 โดยการควบคุมของกล่องควบคุมสัมพันธ์กันทั้งหมด โดยมีรายละเอียดดังนี้



ภาพที่ 4-10 อุปกรณ์ในกล่องควบคุมเครื่องเก็บตัวอย่างและระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน

ก่อนเริ่มต้นระบบ ผู้ใช้งานต้องทำการเสียบปลั๊กเพื่อจ่ายไฟฟ้ากระแสสลับให้ หมายเลข 4 บอร์ด Arduino หมายเลข 9 บอร์ด ESP โดยที่หมายเลข 4 และ 9 จะใช้ไฟฟ้ากระแสสลับ จากนั้นเสียบปลั๊กไฟฟ้าให้กับหมายเลข 1 สวิตซ์เพาเวอร์ซัพพลาย แต่ไฟจะยังไม่ถูกจ่ายให้อุปกรณ์ใด ๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหมายเลข 4 และ 9 เนื่องจากสาเหตุด้านความปลอดภัย ผู้ใช้งานจะต้องทำการหมุนเปิดหมายเลข 11 Selector switch ไฟฟ้ากระแสตรงจะถูกจ่ายให้กับหมายเลข 10 Pilot lamp แสดงสถานะว่า ระบบพร้อมใช้งาน ในขณะเดียวกันหมายเลข 1 จะทำหน้าที่แปลงไฟฟ้ากระแสสลับไปเป็นไฟฟ้ากระแสตรง และจ่ายให้กับหมายเลข 2 Terminal block กระจายให้กับชุดทำความเย็นที่ติดตั้งกับเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติต่อไป อีกทั้ง หมายเลข 2 ยังจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงให้กับหมายเลข 3 รีเลย์โมดูล ซึ่งทำหน้าที่เปิดหรือปิดปั๊มจ่ายสารตัวอย่าง และเปิดหรือปิดระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน ท้ายที่สุดหมายเลข 1 ยังทำหน้าที่จ่ายไฟฟ้ากระแสตรงให้กับหมายเลข 6 ตัวขับเคลื่อนมอเตอร์เพื่อควบคุมสเต็ปมอเตอร์หมุนแกนหมุนซึ่งมีงานใส่หลอดเก็บตัวอย่างติดตั้งอยู่ และหมายเลข 12 LCD display จะได้รับไฟฟ้าจากบอร์ด Arduino 5 โวลต์ และรับค่าอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่าง

เพื่อนำมาแสดงยังหน้าจอ LCD พร้อมกับส่งค่าอุณหภูมิเครื่องเก็บตัวอย่างให้กับหมายเลข 5 บอร์ด ESP ซึ่งจะส่งค่าไปบันทึกไว้ยัง Google sheet และแจ้งเตือนผ่านทาง Line notify อีกด้วย

ผลการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ

1. ผลการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.1 แหล่งคาร์บอนในอาหารหมัก PCM เป็นน้ำตาลรีดิฟจากชานอ้อย ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เริ่มต้นการหมัก มีระยะเวลาการหมักในขวดรูปชมพู่ 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ในวันที่ 1 ของการหมัก วันที่ 2 และ 3 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วันที่ 4 และ 5 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง สาเหตุของการเก็บตัวอย่างในลักษณะนี้ เนื่องจาก ในช่วงแรกของการหมัก แบคทีเรียจะมีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมอย่างรวดเร็ว จึงต้องเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อให้ทราบถึงพฤติกรรมแบคทีเรียในช่วงแรกโดยละเอียด จากนั้นพฤติกรรมของแบคทีเรียจะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จึงลดความถี่ในการเก็บตัวอย่างลงได้ และผู้วิจัยเริ่มต้นวัดค่าดูดกลืนแสง ณ เวลาที่ 0 นาที เพื่อตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการวัดความหนาแน่นของเซลล์จากการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometre ประจำภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ยี่ห้อ Aligent USA รุ่น Carry-60 ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้ตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร พบว่า แบคทีเรียทั้ง 6 รหัส มีลักษณะการเจริญเติบโตดังนี้

1. แบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild Type; WT) มีระยะ Lag phase เท่ากับ 6 ชั่วโมงในระยณะนี้แบคทีเรียจะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ สังเกตได้จากความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลในช่วง 6 ชั่วโมงแรกไม่ได้ลดลงมากนักอยู่ที่ 19.09 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงจะเข้าสู่ Exponential phase ระหว่างชั่วโมงที่ 9 ถึง 48 ในช่วงนี้แบคทีเรียจะมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอัตราค่อนข้างคงที่ด้วยเหตุนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลจึงลดลง ณ ชั่วโมงที่ 48 เหลือเพียง 15.19 กรัมต่อลิตร และท้ายที่สุดในชั่วโมงที่ 54 ถึง ชั่วโมงที่ 120 แบคทีเรียเข้าสู่ Stationary phase เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีจำนวนสูงสุดและค่อนข้างคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนหรือหากเพิ่มก็อาจจะไม่มากนัก ความสำคัญของช่วงนี้คือ เป็นช่วงที่แบคทีเรียจะผลิตสารผลิตภัณฑ์ทั้ง อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลออกมา จากกระบวนการเมทาบอลิซึม ซึ่งสารละลายอินทรีย์เหล่านี้ถือว่ามีค่าความเป็นพิษต่อตัวเซลล์เอง ในท้ายที่สุดชั่วโมงที่ 120 ของกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.19 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.63 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1857, 0.0532 และ 0.2383 ตามลำดับ

2. แบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild Type Control; WTC) ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบกับมีน้ำตาลกลูโคสผงเป็นแหล่งคาร์บอน (Control) มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่สังเกตได้จากใน 3 ชั่วโมงนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ 19.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่าลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากนั้นจึงจะเข้าสู่ Exponential phase ระหว่างชั่วโมงที่ 6 ถึง 36 ซึ่งในระยะนี้แบคทีเรียเจริญเติบโตและทำการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลถูกใช้ไปอย่างมากและเหลืออยู่เท่ากับ 15.94 กรัมต่อลิตร และท้ายที่สุดในชั่วโมงที่ 42 ถึง ชั่วโมงที่ 120 แบคทีเรียเข้าสู่ Stationary phase เมื่อเข้าสู่ระยะนี้แบคทีเรียจะมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจจะมีเซลล์ที่ตายลงบ้างเล็กน้อย แต่จะผลิตสารผลิตภัณฑ์ออกมา ท้ายที่สุดในชั่วโมงที่ 120 ส่งผลให้ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลืออยู่ที่ 11.10 กรัมต่อลิตร หากสังเกตจะเห็นได้ว่า พฤติกรรมของแบคทีเรียสาย WT และ WTC ทั้งในน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยและในน้ำตาลกลูโคสผง ค่อนข้างมีลักษณะพฤติกรรมที่คล้ายคลึงกัน รวมทั้งในชั่วโมงที่ 120 ของกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลยังคงเหลือใกล้เคียงกัน ในที่นี้อาจเป็นผลมาจากส่วนประกอบหลักของชานอ้อย คือ เซลลูโลส ซึ่งมีมากถึง 41.6% Dry weight ซึ่งเซลลูโลสมีองค์ประกอบเป็นโมเลกุลเดี่ยวของน้ำตาลเรียงต่อกันเป็นสายยาว (Kim & Day, 2011) เมื่อถูกนำมาผ่านกระบวนการปรับสภาพและกระบวนการไฮโดรไลซิส จึงเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคส) และถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ใช้ น้ำตาลไปทั้งหมด 8.70 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1808, 0.0512 และ 0.2361 ตามลำดับ

3. แบคทีเรียสายพันธุ์รหัส 45-20 มีระยะ Lag phase น้อยกว่า 3 ชั่วโมงความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ 19.77 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงจะเข้าสู่ Exponential phase อย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ถึง 36 ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงเหลือ 12.80 กรัมต่อลิตร และแบคทีเรียเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 42 และชั่วโมงที่ 120 น้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.05 กรัมต่อลิตร ใช้ น้ำตาลไปทั้งหมด 9.72 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1107, 0.8506 และ 0.6723 ตามลำดับ

4. แบคทีเรียสายพันธุ์รหัส 45-21 มีระยะ Lag phase น้อยกว่า 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ 19.72 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงจะเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ถึง 36 ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงเหลือ 14.64 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 42 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 น้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.28 กรัมต่อลิตร ใช้ น้ำตาลไปทั้งหมด 9.44 กรัมต่อลิตร

5. แบคทีเรียสายพันธุ์รหัส 60-12 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 6 ชั่วโมงความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.23 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงจะเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึง 36

ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 14.32 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 42 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.33 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.45 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.5100, 0.3451 และ 0.4721 ตามลำดับ

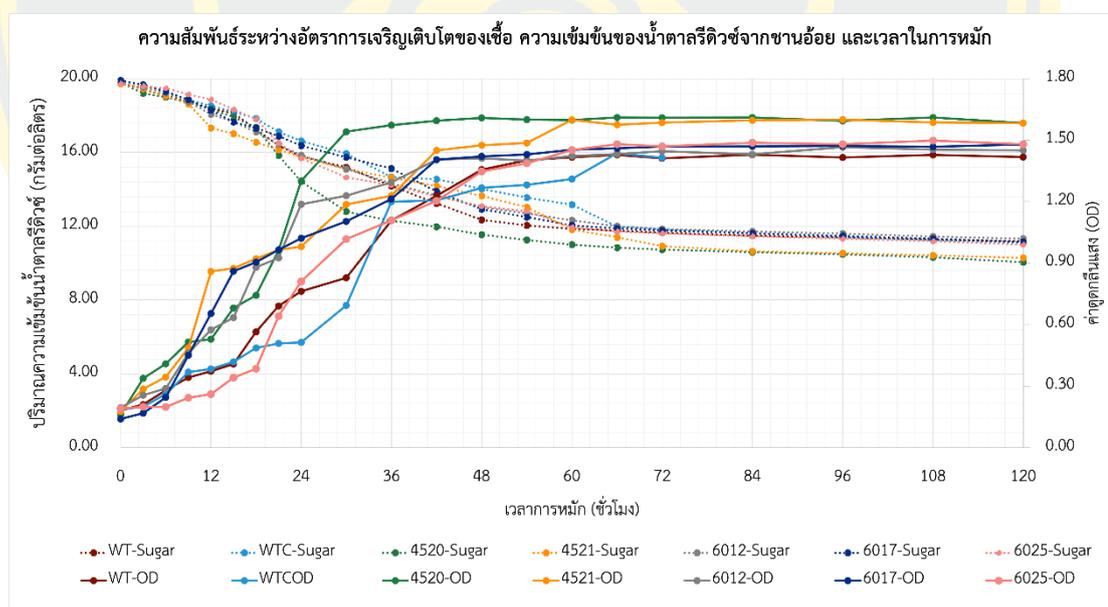
6. แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-17 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.67 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงจะเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 36 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 15.12 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 42 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.15 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.75 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1441, 0.2738 และ 0.2822 ตามลำดับ

7. แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-25 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 6 ชั่วโมงความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.48 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงจะเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึง 54 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 12.81 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 60 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.00 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.72 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1219, 0.0073 และ 0.3671 ตามลำดับ

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยได้อธิบายถึงลักษณะการใช้สารตั้งต้น คือ น้ำตาลจากชานอ้อยของแบคทีเรียทุกรหัสโดยละเอียด และเมื่อนำข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 6 รหัส รวมทั้งแบคทีเรีย WTC มาวิเคราะห์ เพื่อให้ทราบถึงพฤติกรรมของแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า แบคทีเรียที่มีระยะ Lag phase สั้นที่สุด คือ 45-20 และ 45-21 ส่วนแบคทีเรียที่มีระยะ Lag phase นานที่สุด คือ WT, 60-12 และ 60-25 จากนั้นจึงเข้าสู่ Exponential phase โดยแบคทีเรียที่เข้าสู่ Exponential phase เร็วที่สุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 และ 45-21 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารผลิตภัณฑ์สูงสุดจากงานวิจัยของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) และ (สรุดา พันโย และ อทิตยา นุ่มนัม, 2565) โดยจากพฤติกรรมของแบคทีเรีย หากแบคทีเรียเข้าสู่ Stationary phase ได้เร็ว จะส่งผลให้แบคทีเรียสามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมทาบอลิซึมออกมาได้เร็วและมีปริมาณความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์สูงตามไปด้วย หากแบคทีเรียรหัสใดมีระยะเวลา Lag phase นาน เข้าสู่ Exponential phase และ Stationary phase ช้า ก็มีแนวโน้มที่จะผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ความเข้มข้นต่ำตามไปด้วย ซึ่งความหนาแน่นของเซลล์เมื่อนำไปวิเคราะห์พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 มีความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุด เท่ากับ 1.6108 รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-25, 60-17, 60-12, WTC และ WT มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1.6005,

1.4980, 1.4786, 1.4650, 1.4367, 1.4295 ตามลำดับ ในส่วนของความเข้มข้นคงเหลือของน้ำตาล เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 120 พบว่า แบคทีเรียรหัส 45-20 มีความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือน้อยที่สุด เท่ากับ 10.05 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-25, WTC, 60-17, WT, 60-12 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.28, 11.00, 11.10, 11.15, 11.19 และ 11.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียกลายพันธุ์ทุกรหัสกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมทั้ง WT และ WTC พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เข้าสู่ Exponential phase และ Stationary phase ได้เร็วและนานที่สุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ซึ่งมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า WTC มากถึง 12.12% เมื่อหมักโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลจากชานอ้อย

เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SG) ของแบคทีเรียแต่ละรหัส พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21 มีค่า SG มากที่สุดเท่ากับ 0.1243 รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20, 60-12, 60-25, WT, 60-17 และ WTC ซึ่งมีค่า SG เท่ากับ 0.1130, 0.0873, 0.0854, 0.0844, 0.0688 และ 0.0520 ต่อชั่วโมง ตามลำดับดังภาพที่ 4-11



ภาพที่ 4-11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง ความเข้มข้นของน้ำตาลจากชานอ้อย และเวลาการหมักในขวดรูปชมพู่

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแบบ ABE เป็นเวลา 5 วัน จึงทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ คือ อะซีโตน บิวทานอล และ เอทานอล หลังการหมักของแบคทีเรีย *P. bifementans* ทั้ง 6 รหัส

รวมทั้งตัวควบคุม ด้วยเทคนิค Gas chromatography flame ionization detector (GC-FID) ณ ภาควิชาวิศวกรรมศาสตร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น trace 1300 พบว่า

1. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายอะซิโตน (Ace) ได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-12 โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 8.6198 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ WT, WTC, แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-17, 45-20 และ 60-25 ที่ความเข้มข้น 3.2058, 3.1454, 2.8285, 2.5211, 2.1524, 2.1265 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายบิวทานอล (BuOH) ได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 16.5353 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-12, 60-17, WT, WTC และ 60-25 ที่ความเข้มข้น 8.7990, 5.8328, 4.8697, 0.9185, 0.8910, 0.1280 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

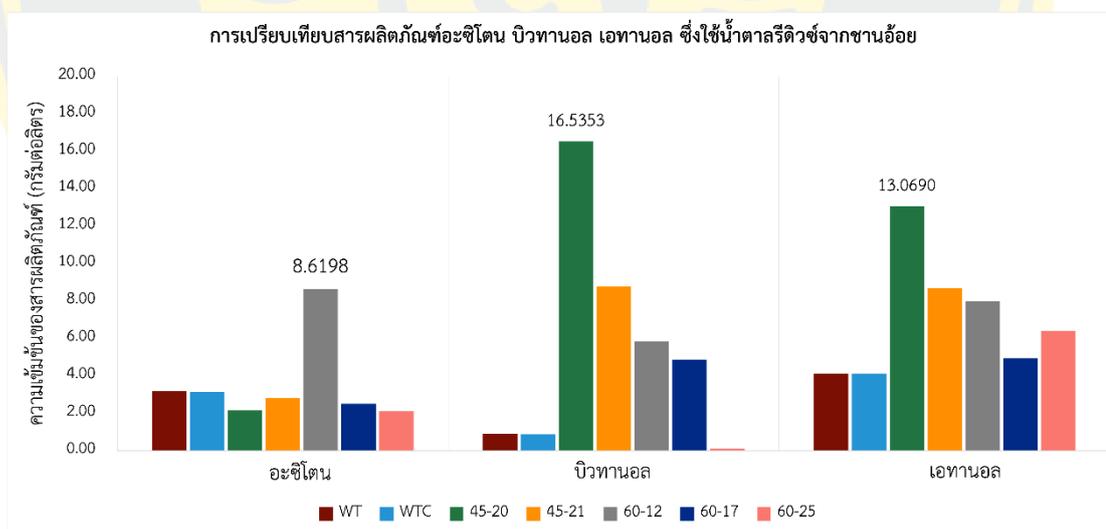
3. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายเอทานอล (EtOH) ได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 13.0690 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-12, 60-25, 60-17, WT และ WTC ที่ความเข้มข้น 8.6947, 7.9782, 6.4022, 4.9383, 4.1135, 4.1080 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อย

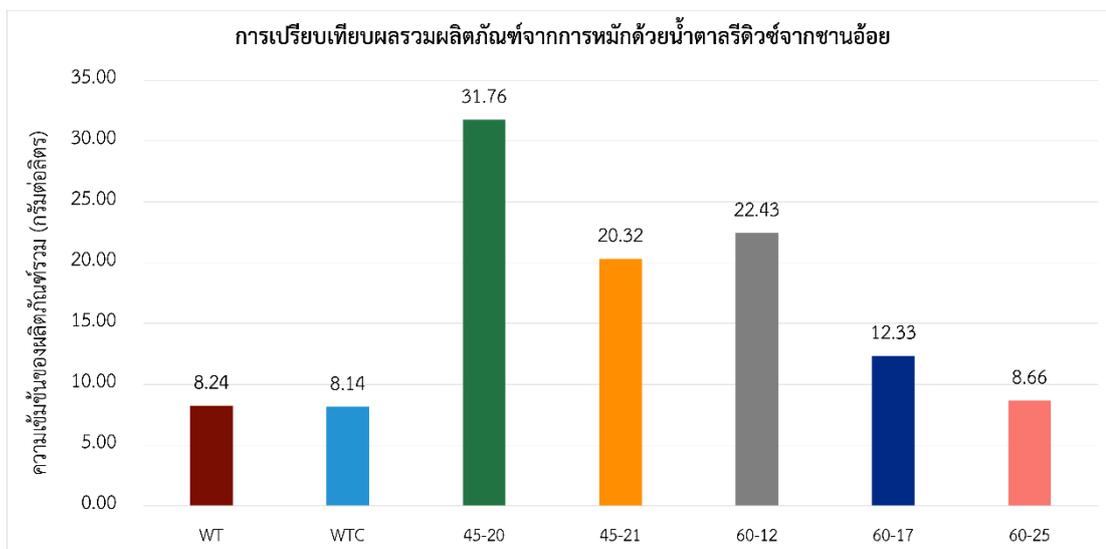
รหัสแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)		
	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
WT	3.2058	0.9185	4.1135
WTC	3.1454	0.8910	4.1080
45-20	2.1524	16.5353	13.0690
45-21	2.8285	8.7990	8.6947
60-12	8.6198	5.8328	7.9782
60-17	2.5211	4.8697	4.9383
60-25	2.1265	0.1280	6.4022

เมื่อนำข้อมูลผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดหลังกระบวนการหมักมาเปรียบเทียบกันทั้งหมดที่แบคทีเรียสามารถผลิตได้ พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-12 ผลิตอะซิโตนได้ความเข้มข้นสูงที่สุด

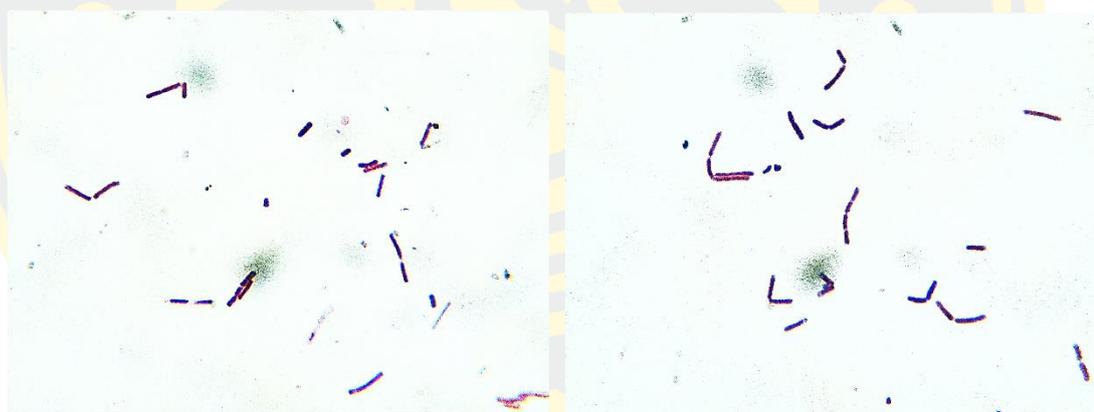
เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่อื่น รวมทั้ง WTC ส่วนสารละลายบิวทานอลและเอทานอล พบว่าแบคทีเรียที่เรียกว่าพันธุ์รหัส 45-20 ผลิตได้ความเข้มข้นสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่อื่น รวมทั้ง WTC ดังภาพที่ 4-13 และนำมาคำนวณผลรวมสารละลายของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด พบว่าแบคทีเรียที่เรียกว่าพันธุ์รหัส 45-20 สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นมากที่สุดคือ 31.76 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียที่เรียกว่าพันธุ์รหัส 60-12, 45-20, 60-17, 60-25, WT และ WTC โดยมีความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์รวมเท่ากับ 22.43, 20.32, 12.33, 8.66, 8.24 และ 8.14 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-14 ท้ายที่สุดในชั่วโมงที่ 120 ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างน้ำหมักจากทุกขวดย้อมสีด้วยเทคนิคย้อมสีแบคทีเรีย (gram staining) และส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อตรวจสอบลักษณะพื้นฐานโดยคร่าวของแบคทีเรีย พบว่า ในชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก แบคทีเรียยังคงมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) เรียวยาว ย้อมติดสีม่วงเนื่องด้วยไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์สูญเสียน้ำจากการล้างด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% เกิดการเหี่ยวและหดตัวของผนังเซลล์ส่งผลให้รูของผนังเซลล์มีขนาดเล็ก สารประกอบของสีย้อม crystal violet ที่มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถละลายออกมาได้ ผนังเซลล์ชั้น peptidoglycan จึงติดสีม่วง แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียทุกรหัสไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียอื่นในระหว่างการหมักดังภาพที่ 4-15



ภาพที่ 4-12 การเปรียบเทียบสารผลิตภัณฑ์อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยในกระบวนการหมัก

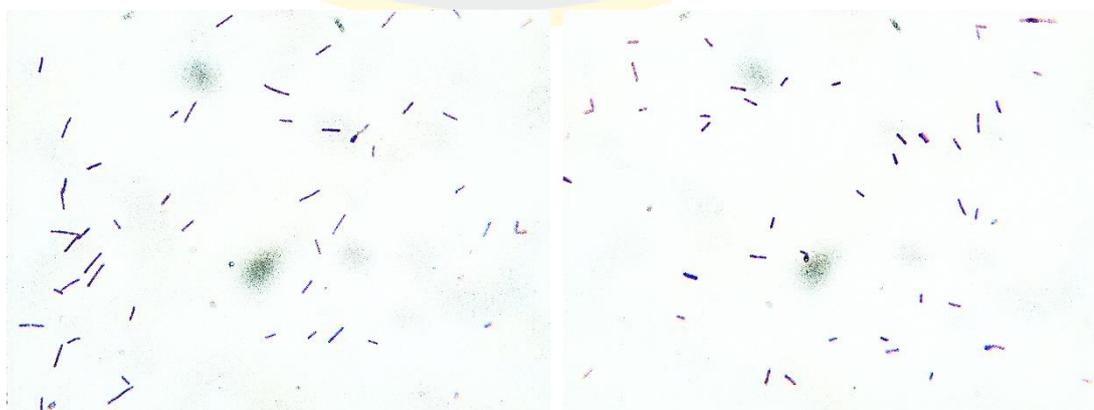


ภาพที่ 4-13 ผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อย



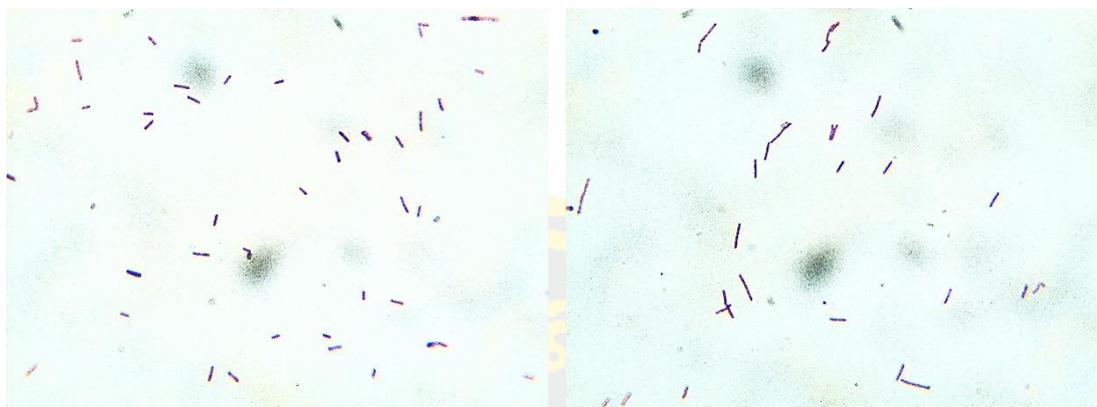
(WT)

(WTC)



(45-20)

(45-21)



(60-12)

(60-17)

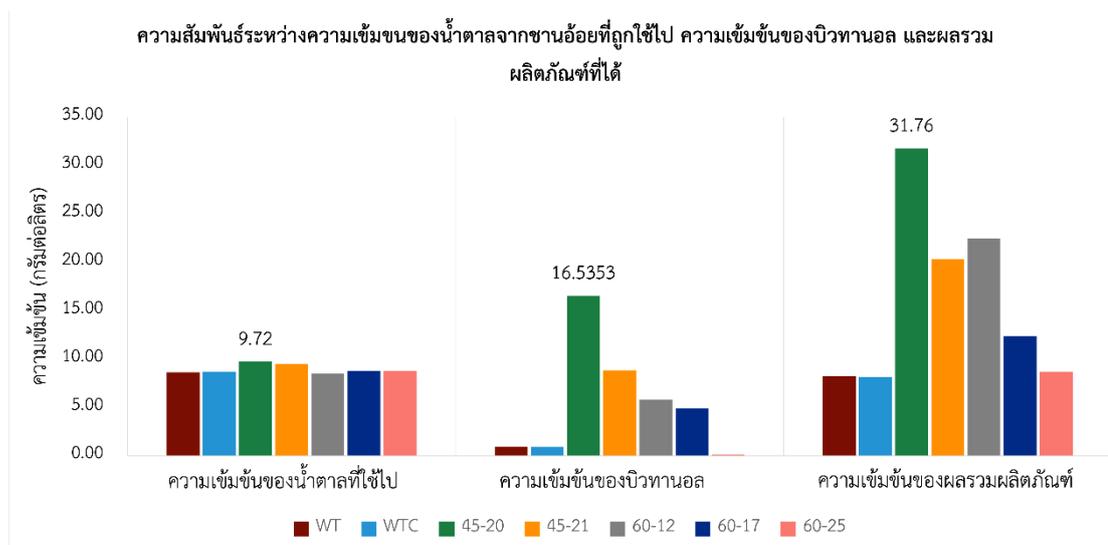


(60-25)

ภาพที่ 4-14 ลักษณะสัณฐานโดยคร่าวหลังย้อมสีด้วยเทคนิค Gram stain แบคทีเรียทุรหัตสหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักด้วยน้ำตาลจากชานอ้อย

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยที่ถูกใช้ไปในกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้ และความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์รวม พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยในระหว่างกระบวนการหมักได้มาก มีแนวโน้มที่จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ และเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ทั้งอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลได้มากกว่าแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์น้อย จากภาพที่ 4-16 แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ใช้น้ำตาลในกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ มากถึง 9.72 กรัมต่อลิตร และผลิตสารละลายบิวทานอลรวมถึงสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 31.76 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย WTC ซึ่งใช้น้ำตาล 8.70 กรัมต่อลิตร โดยแบคทีเรีย WTC ผลิตบิวทานอล

รวมถึงสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นเพียง 8.14 กรัมต่อลิตร แต่ถึงอย่างไรก็ตามแบคทีเรียอาจมีพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงไปเมื่อถูกเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน หรือเปลี่ยนอาหารในการเจริญเติบโต ซึ่งอาจส่งผลให้แบคทีเรียใช้น้ำตาลไปในปริมาณมาก แต่ไม่ได้ผลิตสารผลิตภัณฑ์ออกมาตามไปด้วย ดังเช่น แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-12 ในงานวิจัยของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) เมื่อพิจารณาถึงแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-12 ในงานวิจัยฉบับนี้ ซึ่งถูกเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อย พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-12 ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.45 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ไปและถูกรายงานไว้ในงานวิจัยของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) และ (ศรุดา พันธโย และ อติทยา นุ่มนึ่ง, 2565) พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-12 มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป คือ ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไปมาก และเปลี่ยนแปลงเป็นสารละลายบิวทานอล รวมถึงสารผลิตภัณฑ์รวมมากถึง 22.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์รวมที่มีความเข้มข้นสูงสุดรองลงมาจากแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 อย่างไรก็ตามท้ายที่สุดไม่สามารถนำปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลที่ถูกใช้ไปมาสรุปว่าแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลไปในความเข้มข้นมาก มีแนวโน้มที่จะผลิตสารผลิตภัณฑ์รวมได้มาก เนื่องด้วยเมื่อน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย จะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารอื่น ๆ ต่อไปเป็นลำดับขั้นตามกระบวนการและปฏิกิริยาภายในเซลล์ โดยการที่เซลล์ของแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตสารได้ในความเข้มข้นมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการผลิตภายในเซลล์ ดังนั้น น้ำตาลรีดิวซ์ที่เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นสารผลิตภัณฑ์และขับออกนอกเซลล์ในอัตราส่วนหรือปริมาณความเข้มข้นและถูกกำหนดด้วยพันธกรรมของเซลล์ (Li et al., 2011)



ภาพที่ 4-15 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลจากขานอ้อยที่ถูกใช้ไป ความเข้มข้นของบิวทานอล และผลรวมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก

1.2 แหล่งคาร์บอนในอาหารหมัก PCM เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับประรด พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 รหัส มีลักษณะการเจริญเติบโตดังนี้

1. แบคทีเรีย WT มีระยะ Lag phase เท่ากับ 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 19.18 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเข้าสู่ Exponential phase ระหว่างชั่วโมงที่ 9 ถึง 54 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 13.74 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 60 ถึง ชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.32 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.43 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.5135, 0.0616 และ 0.2453 ตามลำดับ

2. แบคทีเรีย WTC มีระยะ Lag phase เท่ากับ 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.27 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Exponential phase ระหว่างชั่วโมงที่ 9 ถึง 48 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 13.42 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 54 ถึง ชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.16 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.54 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.5060, 0.0641 และ 0.2481 ตามลำดับ

3. แบคทีเรียรหัส 45-20 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.59 กรัมต่อลิตร จากนั้นเข้าสู่ Exponential phase อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6 ถึง 30 ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงเหลือ 13.41 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 36

และชั่วโมงที่ 120 น้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.00 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 9.72 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.2160, 0.9774 และ 0.7099 ตามลำดับ

4. แบคทีเรียรหัส 45-21 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ 19.45 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 54 ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงเหลือ 13.14 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 60 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 น้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.68 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 9.01 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1617, 0.6044 และ 0.5645 ตามลำดับ

5. แบคทีเรียรหัส 60-12 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมงความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.57 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึง 18 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 17.67 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 21 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 13.24 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 6.49 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.5114, 0.3121 และ 0.6076 ตามลำดับ

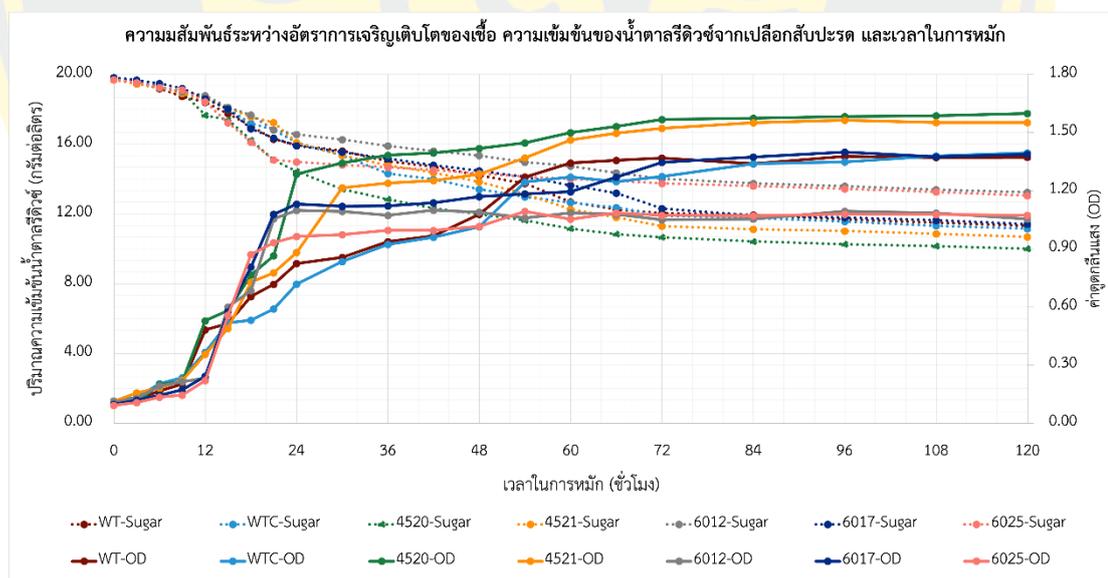
6. แบคทีเรียรหัส 60-17 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.67 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 24 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 15.91 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.42 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 6.49 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1702, 0.2899 และ 0.2939 ตามลำดับ

7. แบคทีเรียรหัส 60-25 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมงความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.52 กรัมต่อลิตร จากนั้นเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 42 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 14.52 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 13.05 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 6.65 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1898, 0.1022 และ 0.5084 ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งหมดมาวิเคราะห์ เพื่อให้ทราบถึงลักษณะพฤติกรรมการเจริญเติบโต พบว่า แบคทีเรียที่มีระยะ Lag phase สั้นที่สุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20, 45-21, 60-12, 60-17 และ 60-25 ส่วนแบคทีเรียที่มีระยะ Lag phase นานที่สุด คือ WT และ WTC จากนั้นจึงเข้าสู่ Exponential phase โดยแบคทีเรียที่เข้าสู่ Exponential phase เร็วที่สุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20, 45-21, 60-17 และ 60-25 เมื่อนำไปวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 มีความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุด เท่ากับ 1.5980 รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-17, WTC, WT, 60-12 และ 60-

25 มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1.5630, 1.3990, 1.3950, 1.3770, 1.0990, 1.0931 ตามลำดับ ในส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 120 พบว่า แบคทีเรียรหัส 45-20 มีความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือที่น้อยที่สุด เท่ากับ 10.00 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, WTC, 60-17, WT, 60-25, 60-12 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเท่ากับ 10.68, 11.16, 11.42, 11.32, 13.05 และ 13.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียกลายพันธุ์ทุกรหัสกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมทั้ง WT และ WTC พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เข้าสู่ Exponential phase และ Stationary phase ได้เร็วและนานที่สุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ซึ่งมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า WTC มากถึง 14.55% เมื่อหมักโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลจากเปลือกสับปะรด

เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SG) ของแบคทีเรียแต่ละรหัส พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 มีค่า SG มากที่สุดเท่ากับ 0.1407 รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-12, 60-25, 60-17, WT, 45-21 และ WTC ซึ่งมีค่า SG เท่ากับ 0.1237, 0.1123, 0.1107, 0.0932, 0.0797 และ 0.0507 ต่อชั่วโมง ตามลำดับดังภาพที่ 4-17



ภาพที่ 4-16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสง ความเข้มข้นของน้ำตาลจากเปลือกสับปะรด และเวลาการหมักในขวดรูปชมพู่

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแบบ ABE เป็นเวลา 5 วัน จึงทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ คือ อะซิโตน บิวทานอล และ เอทานอล หลังการหมักของแบคทีเรีย *P. bif fermentans* ทั้งหมด 6 รหัส รวมถึงแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม WTC ด้วยเทคนิค GC-FID พบว่า

1. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายอะซิโตน (Ace) ได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ WT โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 8.6582 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ WTC, แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-12, 45-20, 45-21, 60-17 และ 60-25 ที่ความเข้มข้น 8.6433, 6.6376, 4.1989, 2.9135, 2.8591, 2.5242 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายบิวทานอล (BuOH) ได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 19.0010 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-17, 60-12, 60-25, WTC และ WT ที่ความเข้มข้น 10.8921, 4.8697, 4.0508, 1.3592, 1.0951, 1.0392 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

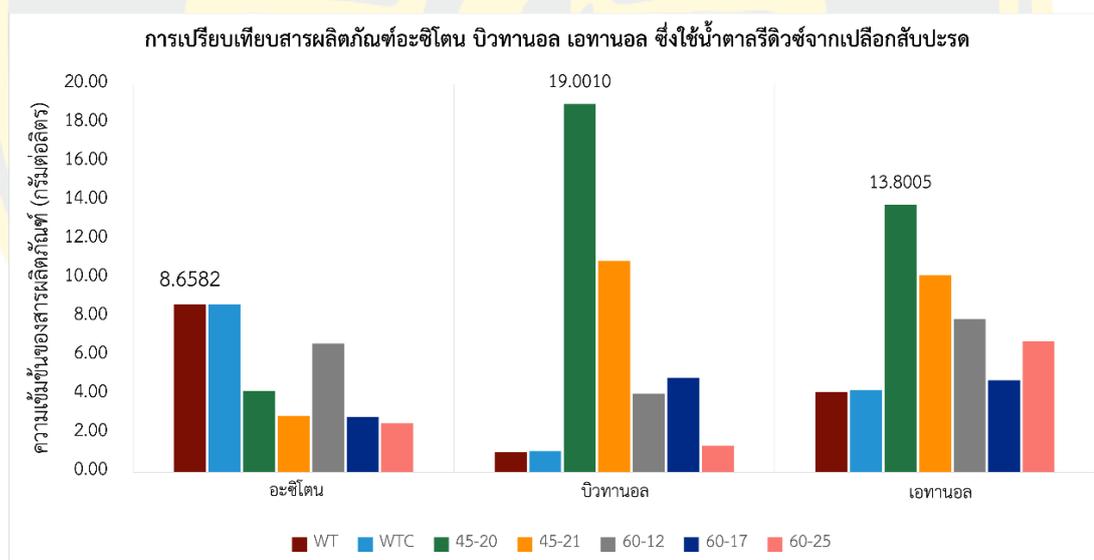
3. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายเอทานอล (EtOH) ได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 13.8005 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-12, 60-25, 60-17, WTC และ WT ที่ความเข้มข้น 10.1728, 7.8862, 6.7616, 4.7400, 4.2376, 4.1364 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ผลของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับปะรด

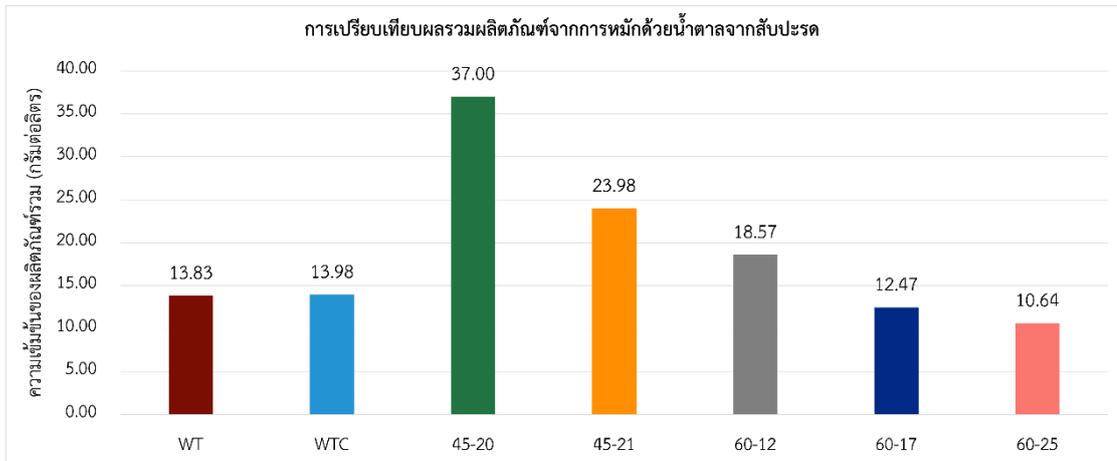
รหัสแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)		
	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
WT	8.6582	1.0392	4.1364
WTC	8.6433	1.0951	4.2376
45-20	4.1989	19.0010	13.8005
45-21	2.9135	10.8921	10.1728
60-12	6.6376	4.0508	7.8862
60-17	2.8591	4.8697	4.7400
60-25	2.5242	1.3592	6.7616

เมื่อนำข้อมูลผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดหลังกระบวนการหมักมาเปรียบเทียบกันทั้งหมดที่แบคทีเรียสามารถผลิตได้ พบว่า แบคทีเรีย WT ผลิตอะซิโตนได้ความเข้มข้นสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบ

กับแบคทีเรียรหัสอื่น รวมทั้ง WTC ส่วนสารละลายบิวทานอลและเอทานอล พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ผลิตได้ความเข้มข้นสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียรหัสอื่น รวมทั้ง WTC ดังภาพที่ 4-18 และนำมาคำนวณผลรวมสารละลายของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์กลายพันธุ์รหัส 45-20 สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ 37.00 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-12, WTC, WT, 60-17 และ 60-25 โดยมีความเข้มข้นของผลรวมสารผลิตภัณฑ์เท่ากับ 23.98, 18.57, 13.98, 13.83, 12.47 และ 10.64 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-19 ท้ายที่สุดในชั่วโมงที่ 120 ของกระบวนการหมัก ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างน้ำหมักจากทุกขวดย้อมสี ด้วยเทคนิค gram stain และส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานโดยคร่าวของแบคทีเรีย พบว่า ในชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก แบคทีเรียมีลักษณะเป็น rod shape เรียวยาว ย้อมติดสีม่วงของ crystal violet และไม่พบเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงของ safranin-o แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียทุกรหัสไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแบคทีเรียแกรมลบ หรือแบคทีเรียแบคทีเรียชนิดอื่นระหว่างกระบวนการหมักดังภาพที่ 4-20



ภาพที่ 4-17 การเปรียบเทียบสารผลิตภัณฑ์อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับปะรดในกระบวนการหมัก

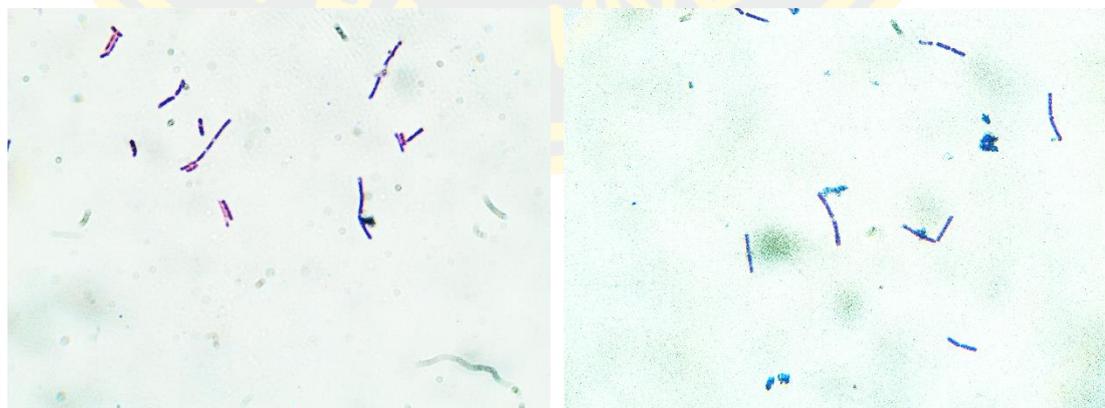


ภาพที่ 4-18 ผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับปะรด



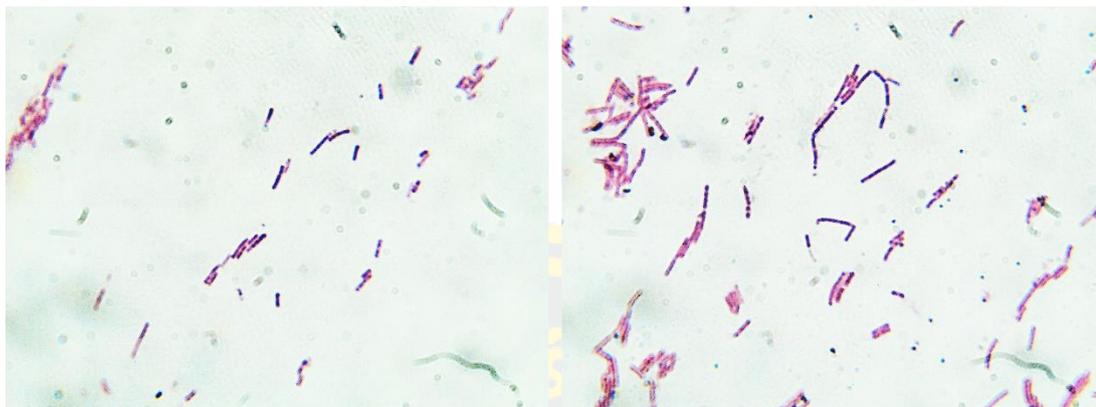
(WT)

(WTC)



(45-20)

(45-21)



(60-12)

(60-17)

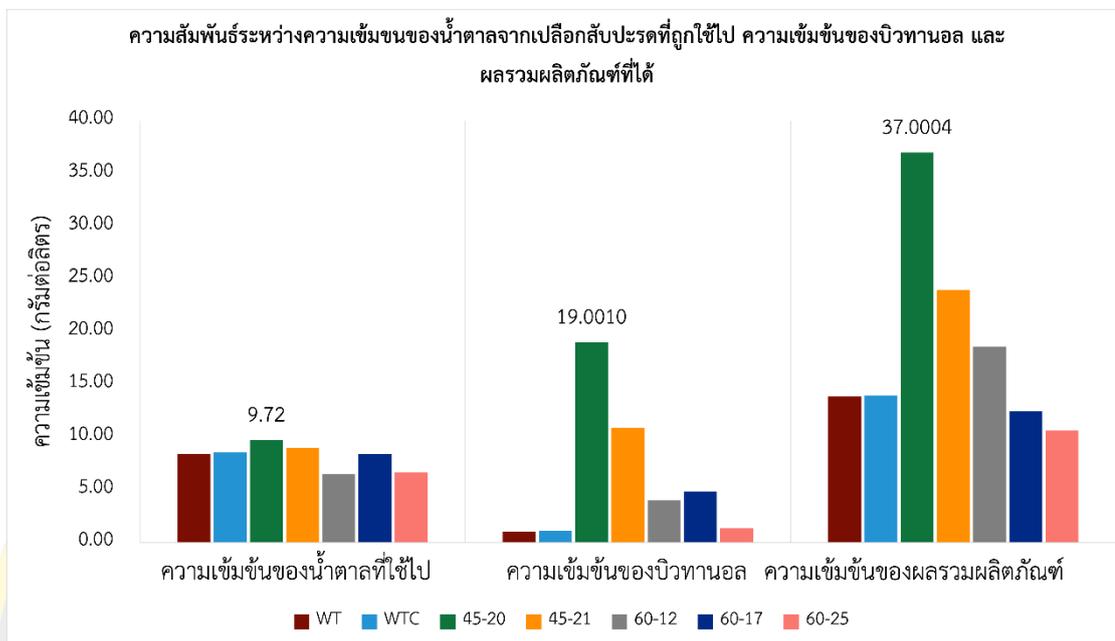


(60-25)

ภาพที่ 4-19 ลักษณะสัณฐานโดยคร่าวหลังย้อมสีด้วยเทคนิค Gram stain แบคทีเรียทุรุษหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักด้วยน้ำตาลจากเปลือกสับประรด

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับประรดที่ถูกใช้ไป เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้ และความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์รวม ดังภาพที่ 4-21 พบว่า แบคทีเรียรหัส 45-20 ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลในกระบวนการของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.72 กรัมต่อลิตร เท่ากับความเข้มข้นของน้ำตาลจากขานอ้อยในหัวข้อ 1.1 และผลิตสารละลายบิวทานอลรวมถึงสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 37.00 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย WTC ซึ่งใช้น้ำตาล 8.54 กรัมต่อลิตร ผลิตบิวทานอล รวมถึงสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นเพียง 13.97 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณสัดส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่าง 45-20 และ WTC พบว่า ใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับประรดแตกต่างกันเพียง 1.18 กรัมต่อลิตร ตลอด 120 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ผลรวมของสารผลิตภัณฑ์กลับมีความเข้มข้นแตกต่างกันมากถึง 23.03 กรัมต่อลิตร โดยบิวทานอลเพียงชนิดเดียวแตกต่างกันมากถึง 17.91 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเป็น

ผลมาจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงยูวีในงานวิจัยของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) ซึ่งพบว่า แบคทีเรียรหัส 45-20 มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลเพิ่มขึ้นหลังผ่านกระบวนการกลายพันธุ์ด้วยแสงยูวี ในขณะที่ความสามารถที่เด่นชัดของแบคทีเรีย WTC ที่เห็นได้จากการหมักด้วยเปลือกสับปะรด คือ การผลิตสารละลายอิซิโตนซึ่งมีความเข้มข้นสูงถึง 8.6433 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตสารละลายอิซิโตนได้มากกว่าแบคทีเรียรหัส 45-20 ถึง 51.42% ดังอธิบายไปในข้างต้นเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสารผลิตภัณฑ์ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งแต่ละรหัส หากเปลี่ยนแปลงอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักก็ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของแบคทีเรียตามไปด้วยเช่นกัน อีกทั้งในการหมักรอบนี้ จะเห็นได้ชัดว่าแบคทีเรีย WT และ WTC มีลักษณะพฤติกรรมการเจริญเติบโต และการผลิตสารผลิตภัณฑ์รวมที่คล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก เนื่องจากเปลือกสับปะรด ประกอบไปด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ มากถึง 14.20% ถึง 16.56% หนึ่งในชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ คือ กลูโคส และกลูโคสถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารหมัก PCM สำหรับแบคทีเรีย WTC จึงส่งผลให้ลักษณะพฤติกรรมของแบคทีเรียมีความคล้ายคลึงกัน (Sarofa & Pertivi, 2023) ในทางกลับกันหากเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายบิวทานอลที่ผลิตได้จากแบคทีเรียรหัส 45-20 และแบคทีเรีย WTC พบว่า แบคทีเรียรหัส 45-20 มีความสามารถในการผลิตสารละลายบิวทานอลมากกว่าแบคทีเรีย WTC มากถึง 1,635% และเมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรีย WT และ WTC ในการผลิตสารละลายบิวทานอล พบว่า มีความเข้มข้นแตกต่างกันเพียง 0.0559 ซึ่งไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด และความเข้มข้นสารผลิตภัณฑ์รวมของแบคทีเรีย WT และ WTC แตกต่างกันเพียง 0.1421 กรัมต่อลิตร จึงสรุปได้ว่า ทั้งแบคทีเรีย WT และแบคทีเรีย WTC ไม่ได้มีความแตกต่างกันเมื่อหมักด้วยน้ำตาลจากเปลือกสับปะรด



ภาพที่ 4-20 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลจากเปลือกสับปรดที่ใช้ไป ความเข้มข้นของบิวทานอล และผลรวมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก

1.3 แหล่งคาร์บอนในอาหารหมัก PCM เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแตงโม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 รหัส มีลักษณะการเจริญเติบโตดังนี้

1. แบคทีเรีย WT มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 19.59 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเข้าสู่ Exponential phase ระหว่างชั่วโมงที่ 6 ถึง 54 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 13.93 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 60 ถึง ชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 12.70 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 7.05 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.2458, 0.0745 และ 0.2917 ตามลำดับ

2. แบคทีเรีย WTC มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.43 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Exponential phase ระหว่างชั่วโมงที่ 6 ถึง 42 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 13.86 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 48 ถึง ชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 12.53 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 7.17 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.2274, 0.2094 และ 0.2865 ตามลำดับ

3. แบคทีเรียรหัส 45-20 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 17.84 กรัมต่อลิตร จากนั้นเข้าสู่ Exponential phase อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6 ถึง 36 ซึ่ง

ความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงเหลือ 12.50 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 42 และชั่วโมงที่ 120 น้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.35 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 9.37 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.2015, 0.9102 และ 0.6937 ตามลำดับ

4. แบคทีเรียรหัส 45-21 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ 18.37 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 48 ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงเหลือ 12.67 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 54 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 น้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.96 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.73 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.2294, 0.7831 และ 0.6308 ตามลำดับ

5. แบคทีเรียรหัส 60-12 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมงความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.57 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 18 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 17.67 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 21 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 13.24 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.29 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.5199, 0.3518 และ 0.4812 ตามลำดับ

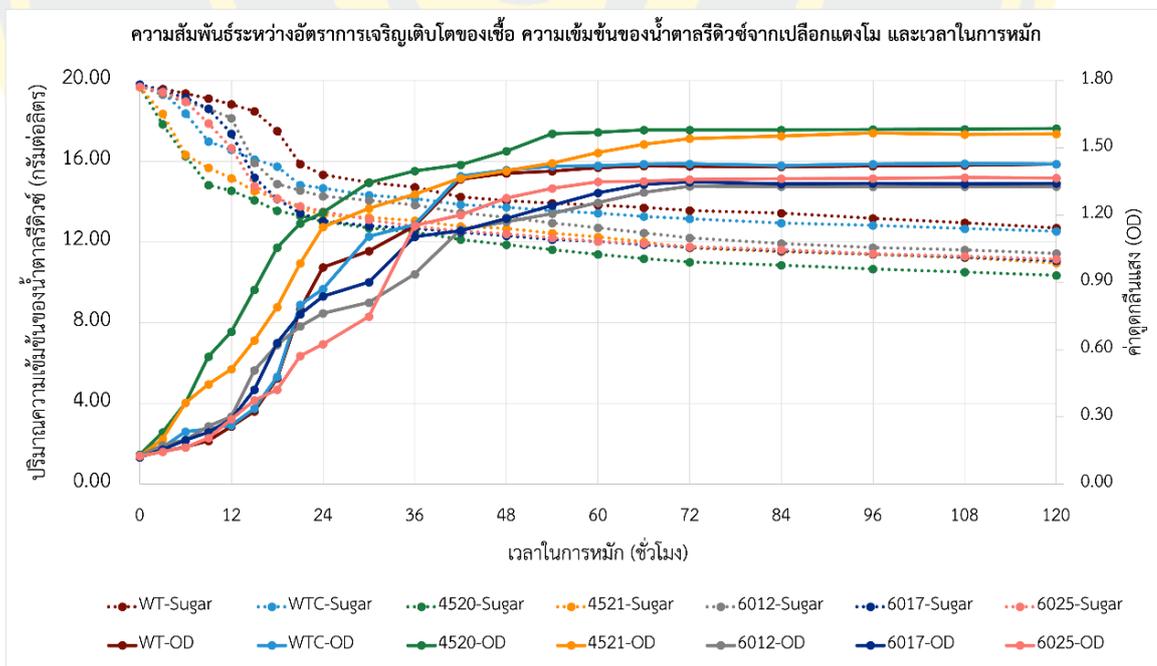
6. แบคทีเรียรหัส 60-17 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.50 กรัมต่อลิตร จากนั้นเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 54 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 12.13 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 60 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.07 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.75 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1847, 0.3199 และ 0.4068 ตามลำดับ

7. แบคทีเรียรหัส 60-25 มีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมงความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 19.46 กรัมต่อลิตร จากนั้นเข้าสู่ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 60 ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 12.03 กรัมต่อลิตร และเข้าสู่ Stationary phase ในชั่วโมงที่ 66 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 120 ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 11.16 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 8.54 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1923, 0.0628 และ 0.4987 ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งหมดมาวิเคราะห์ เพื่อให้ทราบถึงลักษณะพฤติกรรมการเจริญเติบโต พบว่า แบคทีเรียทุกรหัสมีระยะ Lag phase เท่ากับ 3 ชั่วโมงทั้งหมด และเข้าสู่ Exponential phase พร้อมกันในชั่วโมงที่ 6 เมื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์รหัส 45-20 มีความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุด เท่ากับ 1.5870

รองลงมาคือ 45-21, WTC, WT, 60-25, 60-17 และ 60-12 มีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1.5670, 1.4297, 1.4280, 1.3681, 1.3485, 1.3287 ตามลำดับ ความเข้มข้นคงเหลือของน้ำตาลเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 120 พบว่า แบคทีเรียรหัส 45-20 มีความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือน้อยที่สุด เท่ากับ 10.35 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-17, 60-25, 60-12, WTC, WT ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเท่ากับ 10.96, 11.06, 11.16, 11.44, 12.53 และ 12.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียกลายพันธุ์ทุกรหัสกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมทั้ง WT และ WTC พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วปรับตัวได้ดี เข้าสู่ Exponential phase และ Stationary phase ได้เร็วและนานที่สุด คือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ซึ่งมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า WTC มากถึง 11.00% เมื่อหมักโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลจากเปลือกแตงโม

เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SG) ของแบคทีเรียแต่ละรหัส พบว่า แบคทีเรียรหัส WTC มีค่า SG มากที่สุดเท่ากับ 0.1070 รองลงมาคือ แบคทีเรียรหัส WT และแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 60-17, 45-20, 60-12, 60-25, 45-21 ซึ่งมีค่า SG เท่ากับ 0.1027, 0.0697, 0.0690, 0.0690, 0.0677 และ 0.0650 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-22



ภาพที่ 4-21 การเปรียบเทียบผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแตงโม

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแบบ ABE เป็นเวลา 5 วัน จึงทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หลังการหมักของแบคทีเรีย *P. bifermentans* ทั้งหมด 6 รหัส รวมถึง WTC ด้วยเทคนิค GC-FID พบว่า

1. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายอะซิโตน (Ace) ได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ แบคทีเรียสายพันธุ์รหัส 60-12 โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 8.6198 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียรหัส 45-21, 45-20, WT, 60-25, WTC และ 60-17 ที่ความเข้มข้น 4.0059, 3.7753, 3.4655, 3.2843, 3.2615 และ 3.2325 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายบิวทานอล (BuOH) ได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ แบคทีเรียสายพันธุ์รหัส 45-20 โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 17.0570 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียรหัส 45-21, 60-12, 60-17, WTC, 60-25 และ WT ที่ความเข้มข้น 13.6728, 5.8328, 5.5987, 3.0035, 1.0724, 1.0506 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

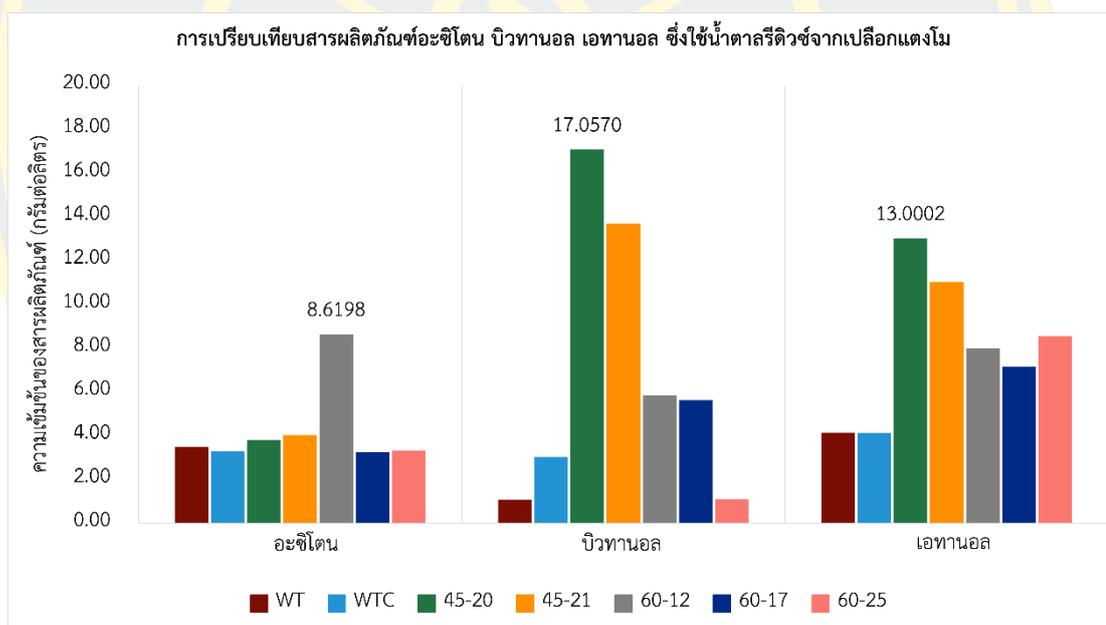
3. แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายเอทานอล (EtOH) ได้ความเข้มข้นสูงสุดคือ แบคทีเรียสายพันธุ์รหัส 45-20 โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับ 13.8005 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียรหัส 45-21, 60-25, 60-12, 60-17, WT และ WTC ที่ความเข้มข้น 11.0142, 8.5170, 7.9782, 7.1165, 4.1135, 4.1080 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ผลของสารผลิตภัณฑ์ ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวิซ์จากเปลือกแตงโม

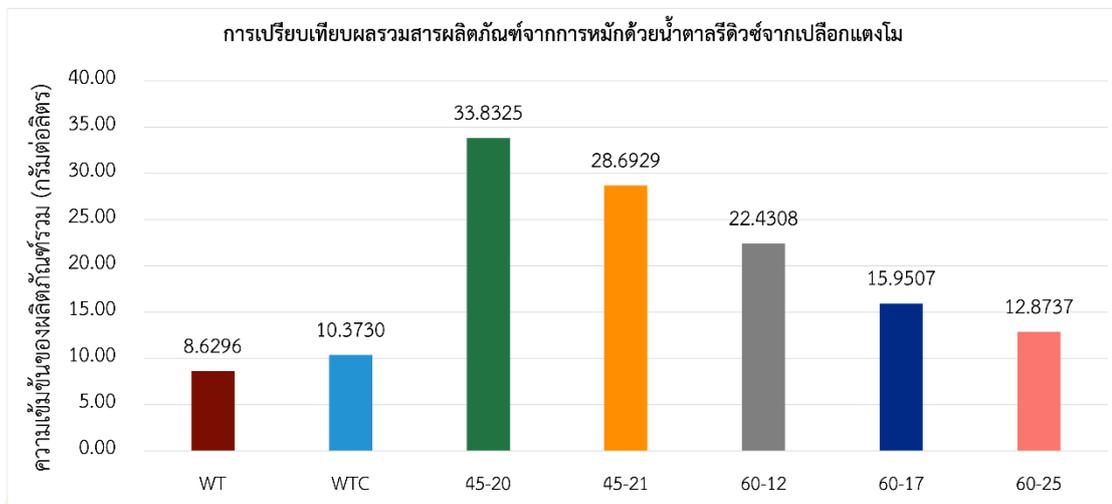
รหัสแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)		
	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
WT	8.6198	1.0506	4.1135
WTC	3.2615	3.0035	4.1080
45-20	3.7753	17.0570	13.0002
45-21	4.0059	13.6728	11.0142
60-12	8.6198	5.8328	7.9782
60-17	3.2325	5.5987	7.1165
60-25	3.2843	1.0724	8.5170

เมื่อนำข้อมูลผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดหลังกระบวนการหมักมาเปรียบเทียบกันทั้งหมด พบว่าแบคทีเรีย WT ผลิตอะซิโตนได้ความเข้มข้นสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียรหัสอื่น รวมทั้ง

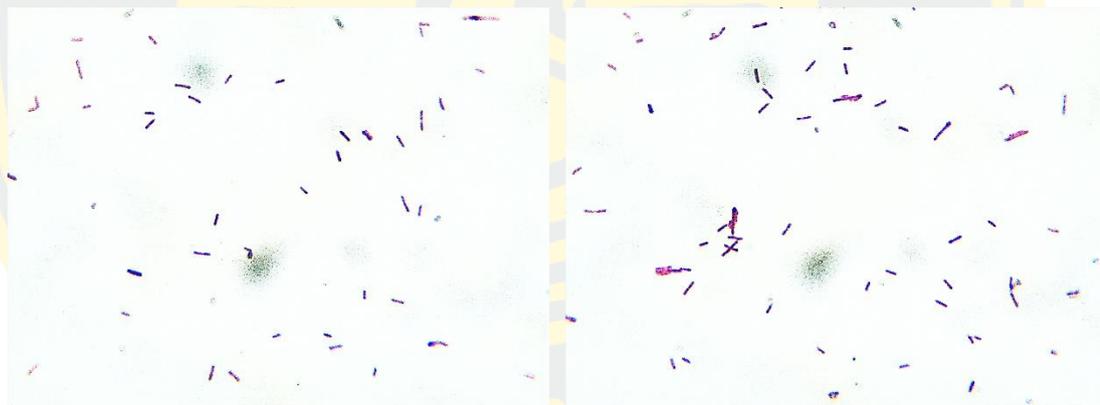
WTC ส่วนสารละลายบิวทานอลและเอทานอล พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ผลิตได้ความเข้มข้นสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียรหัสอื่น รวมทั้ง WTC ดังภาพที่ 4-23 และนำมาคำนวณผลรวมสารละลายของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ผลิตสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นสูงที่สุด คือ 37.00 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-21, 60-12, WTC, WT, 60-17 และ 60-25 มีความเข้มข้นของผลรวมสารผลิตภัณฑ์เท่ากับ 23.98, 18.57, 13.98, 13.83, 12.47 และ 10.64 ตามลำดับดังภาพที่ 4-24 ท้ายที่สุดในชั่วโมงที่ 120 ผู้วิจัยนำตัวอย่างน้ำหมักจากทุกขวดย้อมสี ด้วยเทคนิค gram stain และส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานโดยคร่าว พบว่า แบคทีเรียมีลักษณะเป็น rod shape เรียวยาว ย้อมติดสีม่วงของ crystal violet และไม่พบเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงของ safranin-o แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทุกรหัสไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแบคทีเรียแกรมลบ หรือแบคทีเรียแบคทีเรียชนิดอื่นระหว่างการหมักดังภาพที่ 4-25



ภาพที่ 4-22 การเปรียบเทียบสารผลิตภัณฑ์อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแตงโมในกระบวนการหมัก

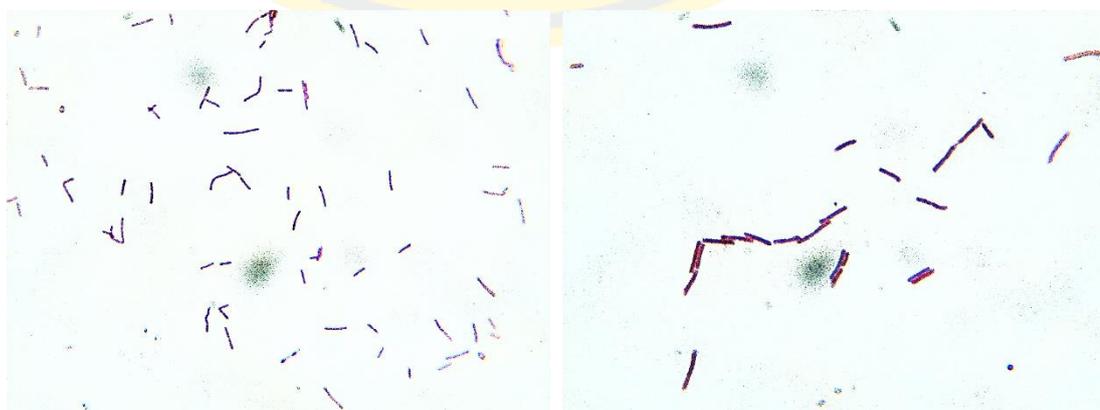


ภาพที่ 4-23 ผลรวมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแดงโม



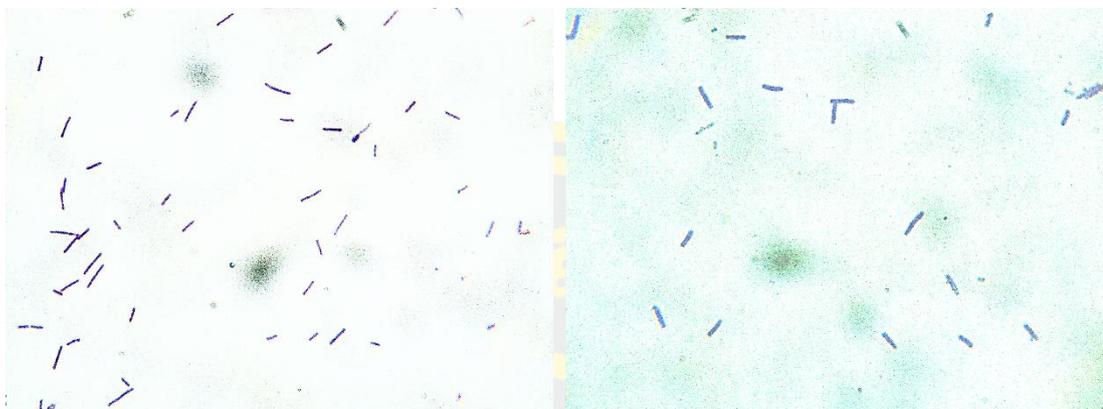
(WT)

(WTC)



(45-20)

(45-21)



(60-12)

(60-17)

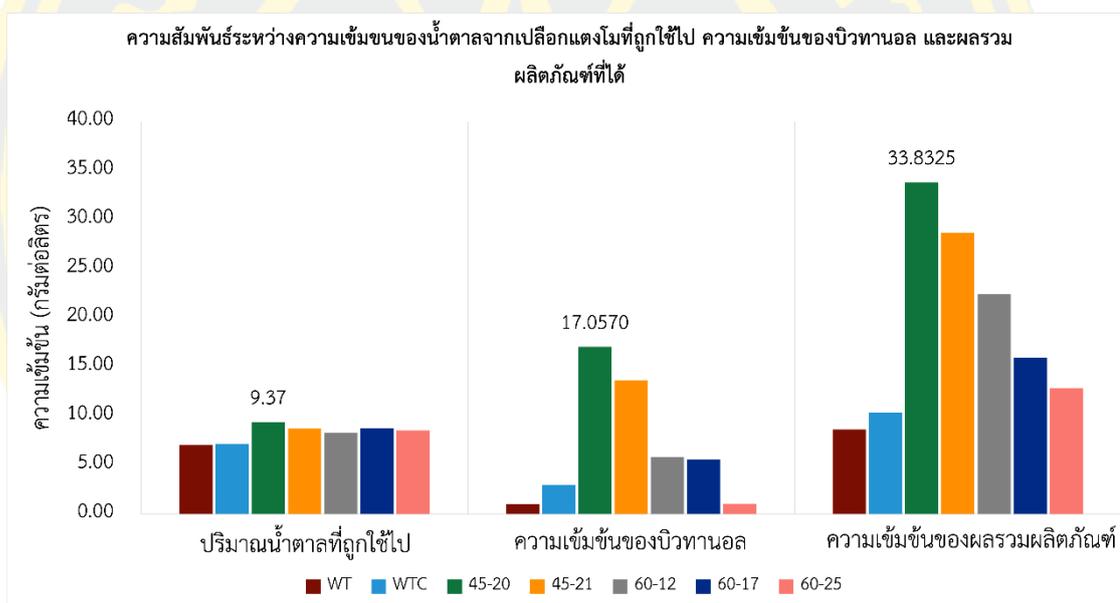


(60-25)

ภาพที่ 4-24 ลักษณะสัณฐานโดยคร่าวหลังย้อมสีด้วยเทคนิคย้อมสีแบคทีเรียของแบคทีเรียทุกรหัส หลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักด้วยน้ำตาลจากเปลือกแตงโม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแตงโมที่ถูกใช้ไป เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้ และความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์รวม พบว่า แบคทีเรียรหัส 45-20 ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลในกระบวนการของเซลล์สูงสุด เท่ากับ 9.37 กรัมต่อลิตร และผลิตสารละลายบิวทานอลรวมถึงสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 33.83 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย WTC ซึ่งใช้น้ำตาล 7.17 กรัมต่อลิตร ผลิตบิวทานอล รวมถึงสารผลิตภัณฑ์รวมได้ความเข้มข้นเพียง 10.37 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณสัดส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่าง 45-20 และ WTC พบว่า ใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแตงโมแตกต่างกันเท่ากับ 2.20 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ถึงผลรวมของสารผลิตภัณฑ์มีความเข้มข้นแตกต่างกันมากถึง 23.46 กรัมต่อลิตร สารละลายบิวทานอลเพียงชนิดเดียวแตกต่างกันมากถึง 14.05 กรัมต่อลิตร

อย่างไรก็ตามในการหมักด้วยเปลือกแดงโมนั้นส่งผลให้แบคทีเรียรหัส 60-12 ผลิตสารละลายอะซิโตน ความเข้มข้นสูงถึง 8.6198 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตสารละลายอะซิโตนได้มากกว่าแบคทีเรียรหัส 45-20 และ แบคทีเรีย WT รวมถึง WTC มากถึง 128.32%, 148.73% และ 164.28% ตามลำดับ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) พบว่า จากการหมักด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกแดงโมนีสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์รวมในแบคทีเรียรหัส 45-20 มากกว่าหมักในน้ำตาลกลูโคสถึง 874.92% หรือคิดเป็น 9.95 เท่า ซึ่งงานวิจัยฉบับนี้มีการปรับค่าความเป็นกรด - ต่าง ระหว่างการหมักตลอดเวลา โดยควบคุมไว้ให้อยู่ที่ 6.5 ตลอดการทดลอง แต่ในงานวิจัยของเอกชัย ไม่ได้มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ต่างแต่อย่างใด จึงส่งผลให้แบคทีเรียสามารถผลิตความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้นดังภาพที่ 4-26



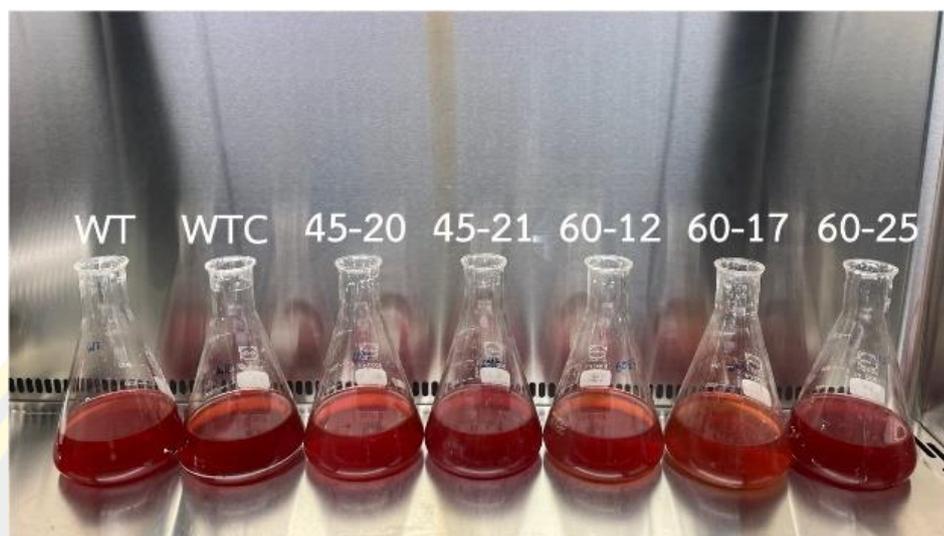
ภาพที่ 4-25 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลจากเปลือกแดงโมนีที่ถูกใช้ไป ความเข้มข้นของบิวทานอล และผลรวมสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก

1.4 ค่าความเป็นกรด - ต่าง ในระหว่างกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล ในกระบวนการหมักปริมาตร 500 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด - ต่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด - ต่าง ทุกรอบพร้อมกับการเก็บตัวอย่าง โดยใช้กระดาษยูนิเวอร์ซอลอินดิเคเตอร์ เพื่อให้ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยที่สุด ในการหมักนี้ผู้วิจัยได้ควบคุมค่าความเป็นกรด - ต่างให้อยู่ระหว่าง 6 ถึง 6.5 เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด - ต่างอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 7.5 แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ออกมาได้ดีที่สุด และจากงานวิจัยฉบับนี้พบว่า แบคทีเรีย

กลายพันธุ์ทุกรหัส เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด - ต่างอย่างรวดเร็ว ในทุก ๆ การหมักด้วย แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ภายในระยะเวลา 3 ถึง 6 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด - ต่างจาก 6.5 ไปเป็น 6 ส่วนแบคทีเรีย WT และ WTC เริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด - ต่าง จาก 6.5 ไปเป็น 6 ภายในชั่วโมงที่ 12 ถึง 18

เริ่มทำการปรับค่าความเป็นกรด - ต่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 M ในแบคทีเรียกลายพันธุ์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 เป็นต้นไปเนื่องจากในชั่วโมงที่ 9 แบคทีเรียกลายพันธุ์ ทุกรหัสมีค่าความเป็นกรดต่ำกว่า 6 จากนั้นในชั่วโมงที่ 18 ผู้วิจัยจึงทำการปรับค่าความเป็นกรด - ต่างของแบคทีเรีย WT และ WTC เมื่อถึงชั่วโมงที่ 21 เป็นต้นไป ผู้วิจัยได้ทำการปรับสภาพความเป็นกรด - ต่างอย่างต่อเนื่องในทุกรอบของการดาวจัด เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่า ในชั่วโมงที่ 120 ค่าความเป็นกรด - ต่าง เท่ากับ 5 ในทุกขวด สีของอาหารเพื่อการหมัก PCM เปลี่ยนแปลงจากสี น้ำตาลส้ม ไปเป็นสีเหลืองอย่างชัดเจน ดังภาพที่ 4-27 จากการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย resazurin ไปเป็น dihydroresorifin ซึ่งให้สีเหลือง ส่งผลให้สารละลายในขวดรูปชมพู่มีสีเหลือง

เมื่อพิจารณาถึงช่วงการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด - ต่างของแบคทีเรียกลายพันธุ์ทุกรหัสกับแบคทีเรีย WT และ WTC เปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสง พบว่า แบคทีเรียที่เข้าสู่ Exponential phase ค่าความเป็นกรด - ต่างจะลดลง หรือเรียกช่วงนี้ว่า acidogenesis phase ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด - ต่าง ลดลงอย่างต่อเนื่องก่อนที่จะเริ่มเข้าสู่ช่วง solventogenesis phase ซึ่งเป็นช่วงของการผลิตสารผลิตภัณฑ์และขับออกมาออกเซลล์ ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด - ต่างเป็นอย่างมาก ซึ่งสรุปได้ว่า อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรด - ต่าง ดังที่กล่าวไปข้างต้น เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ Exponential phase ค่าความเป็นกรด - ต่างจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลดลงอย่างต่อเนื่อง และผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมาจากกระบวนการหมักด้วยการควบคุมค่าความเป็นกรด - ต่าง เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ (เอกชัย โกลถิ่น, 2565) เมื่อพิจารณาสาระสำคัญอย่าง บิวทานอล ในงานวิจัยฉบับนี้สามารถผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้นสูงกว่างานวิจัยของเอกชัยที่ไม่ได้มีการควบคุมค่าความเป็นกรด - ต่างในระหว่างการหมักถึง 9.95 เท่า ซึ่งค่าความเป็นกรด - ต่างถือเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อกระบวนการหมักแบบ ABE เพื่อผลิตบิวทานอล เนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป็นอย่างมาก รวมถึงส่งผลต่อการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และส่งผลถึงการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียอีกด้วย (Al-Shorgani, Kalil, Yusoff, & Hamid, 2018)



(ก)

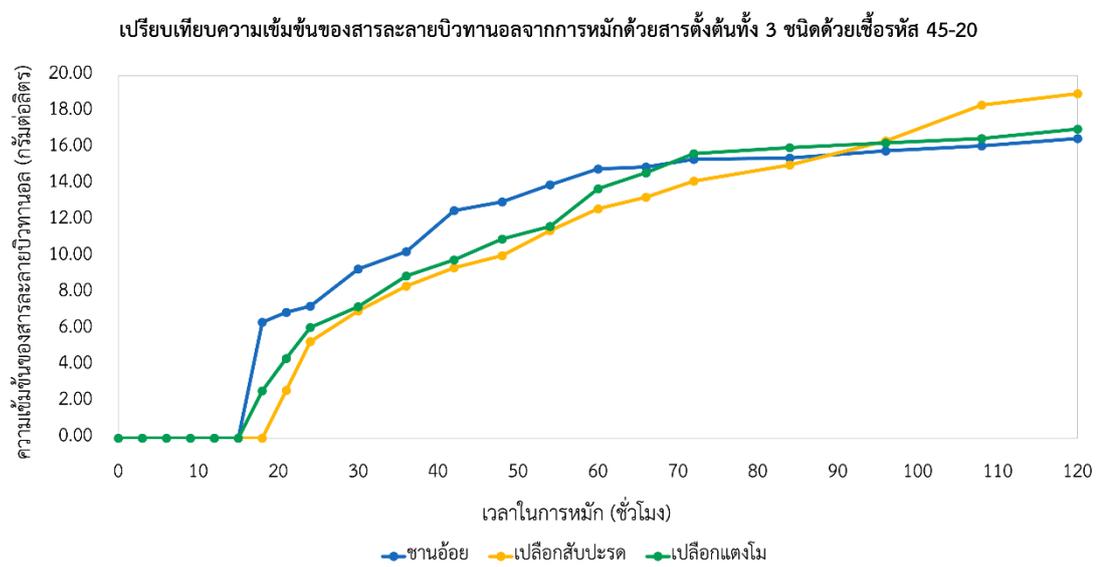


(ข)

ภาพที่ 4-26 ลักษณะอาหารเพื่อการหมัก PCM (ก) ก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 0 (ข) หลังการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 120

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก และเสร็จสิ้นการวิเคราะห์ข้อมูลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในอาหารเพื่อการหมัก PCM ทั้ง 3 ชนิด คือ ชานอ้อย เปลือกสับปะรด และเปลือกแตงโม เมื่อนำข้อมูลของทั้ง 3 ชนิดในกระบวนการหมักทั้งในส่วนของ อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก ผลรวมของกระบวนการหมัก และความเข้มข้นของน้ำตาล หลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก พบว่า การหมักด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อย เปลือกสับประรด และเปลือกแตงโม มีความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์สูงสุดซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 โดยผลิตภัณฑ์รวมจากชานอ้อย เปลือกสับประรด และเปลือกแตงโม เท่ากับ 31.76, 37.00 และ 33.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 10.05, 10.00 และ 10.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1.6180, 1.5980, 1.5870 ตามลำดับ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการเลือกใช้แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 และใช้น้ำตาลจากเปลือกสับประรดเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร เนื่องจากแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 มีความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์รวมสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับหมักด้วยน้ำตาลจากชานอ้อย และเปลือกแตงโมด้วยแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ดังภาพที่ 4-28 มากไปกว่านั้นประเทศไทยยังจัดเป็นผู้ส่งออกสับประรดกระป๋องอันดับหนึ่งของโลก ด้วยเหตุนี้ส่งผลให้มีเกิดของเสียจากกระบวนการผลิตสับประรดออกมาเป็นอย่างมาก จากรายงานของ (Jirapornvaree, Suppadit, & Popan, 2017) ได้ประเมินไว้ว่ามีของเสียจากกระบวนการผลิตมากถึง 2 แสนตันต่อวัน หรือประมาณ 2.7 ล้านตันต่อปี (Apipatpapha, Ongkunaruk, & Chollakup, 2022) โดยหนึ่งในพื้นที่ปลูกสับประรดที่สำคัญของไทย คือจังหวัดระยอง ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีเขตติดต่อกับจังหวัดชลบุรี และในจังหวัดชลบุรีมีพื้นที่การเพาะปลูกสับประรดประมาณ 38,494 ไร่ มีปริมาณการผลิต 115,391 ตัน (เฉลี่ยผลผลิต 5,899 กิโลกรัมต่อไร่) (สำนักงานปลัดกระทรวงการเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดชลบุรี รายงานประจำปี พ.ศ. 2565) ในบางช่วงฤดูการเพาะปลูกส่งผลให้ปริมาณผลผลิตสับประรดสดเกินความต้องการของตลาดเกษตรกรในจังหวัดระยอง และจังหวัดชลบุรีจึงนำสับประรดออกมาจำหน่ายให้กับประชาชนและร้านผลไม้ทั่วไป ด้วยเหตุนี้ จึงส่งผลให้เปลือกสับประรดจากทั้งร้านขายผลไม้ จากโรงงาน เกษตรกร และประชาชนทั่วไปจึงมีปริมาณมากและพบเห็นได้ทั่วไป ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ผู้วิจัยนำเอาเปลือกสับประรดมาเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและใช้ในกระบวนการหมัก และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตรเป็นลำดับถัดไป



ภาพที่ 4-27 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายบิวทานอล จากแบคทีเรียรัทส 45-20 จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในขบวนการหมัก

2. ผลการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลทางชีวภาพในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตร 10 ลิตร หลังจากพัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างจนสามารถใช้งานได้และสกัดน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ทำการหมักโดยพบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รัทส 45-20 ที่การหมักด้วยชานอ้อยให้ผลผลิตบิวทานอลรวมและบิวทานอลความเข้มข้นสูงที่สุด จึงนำมาทำการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร โดยใช้ระบบควบคุมที่ถูกสร้างไว้ในงานวิจัยของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) ดังภาพที่ 4- 29 พบว่า



ภาพที่ 4-28 กระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร

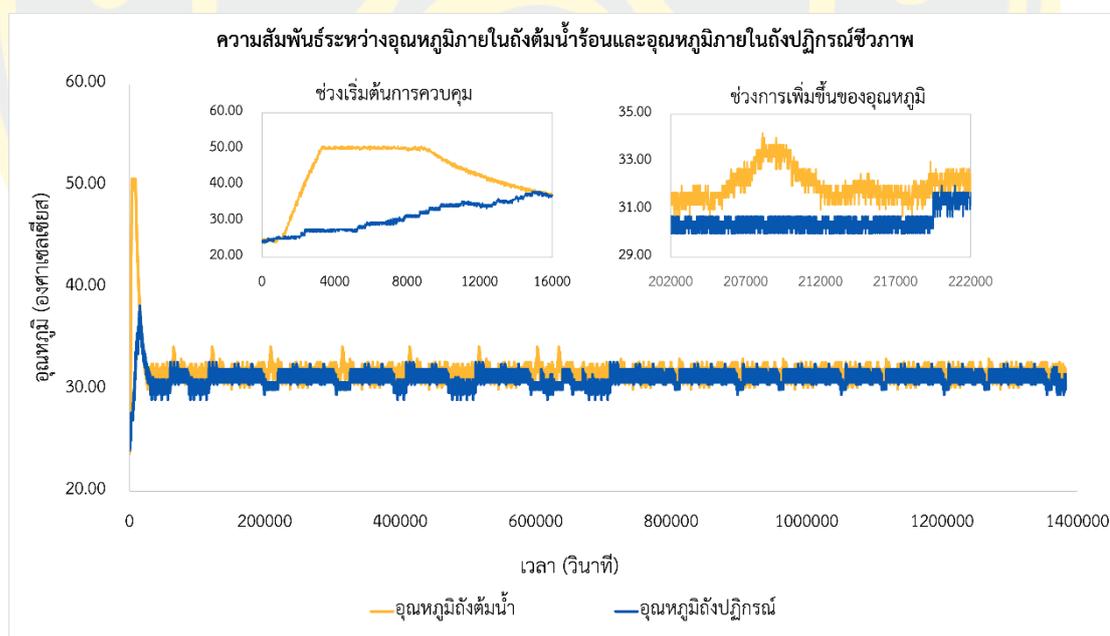
2.1 ผลควบคุมอุณหภูมิภายในถังต้มน้ำร้อนและถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นการให้ความร้อนแก่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเนื่องด้วยในกระบวนการหมักแบบ ABE เพื่อผลิตบิวทานอล อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแบคทีเรีย คือ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มอุณหภูมิให้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อให้อุณหภูมิเหมาะสมต่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์ และวิธีการเพิ่มอุณหภูมิให้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพในงานวิจัยฉบับนี้ใช้ระบบน้ำร้อนจากถังต้มน้ำไหลเวียนรอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (hot water circulation jacket) โดยน้ำร้อนที่ไหลเวียนในชั้นแจ็กเก็ตครอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพถูกส่งมาจากถังต้มน้ำร้อนที่ให้ความร้อนด้วยฮีตเตอร์ กระบวนการควบคุมอุณหภูมิเป็นการควบคุมอุณหภูมิของถังต้มน้ำร้อนและปล่อยให้ น้ำร้อนไหลเวียนรอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพจนกระทั่งอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความร้อนถึง 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะการควบคุมอุณหภูมิแบบ 2 ชุดคำสั่ง คือ

ชุดคำสั่งลำดับที่ 1 ในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมัก อุณหภูมิของน้ำในถังต้มน้ำมีค่าเท่ากับ 24.70 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีค่าเท่ากับ 24.00 องศาเซลเซียส จากนั้นอุณหภูมิในถังต้มน้ำเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงประมาณเวลาที่ 54 อุณหภูมิเปลี่ยนเป็น 50.50 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ 27.50 องศาเซลเซียส ช่วงนี้ระบบจะควบคุมให้ถังต้มน้ำร้อนรักษาอุณหภูมิที่ประมาณ 50.00 องศาเซลเซียสอย่างต่อเนื่อง จนกว่าอุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะเข้าสู่ setpoint ที่ตั้งไว้ คือ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงเข้าสู่เงื่อนไขชุดคำสั่งลำดับที่ 2 ด้วยการปล่อยให้อุณหภูมิของถังต้มน้ำร้อนลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 31 องศาเซลเซียส และรักษาอุณหภูมิของถังต้มน้ำร้อนอย่างต่อเนื่องที่ 31 องศาเซลเซียสไว้จนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก หากอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ระบบจะเปลี่ยนไปใช้ชุดคำสั่งที่ 1 คือให้ความร้อนหม้อต้มน้ำร้อนมากกว่า 31 องศาเซลเซียส ทำซ้ำเช่นนี้ตลอดกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล

ด้วยลักษณะการทำงานเช่นนี้ จากภาพที่ 4-30 จะพบว่า ช่วงแรกอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงเกินค่า setpoint ที่ตั้งค่าไว้เนื่องด้วยผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีการให้ความร้อนถังต้มน้ำจนถึง 50.00 องศาเซลเซียส ส่งผลให้อุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามไปด้วย เกิดลักษณะกราฟเรียกว่า อุณหภูมิสูงเกินกว่าค่า setpoint หรือ overshoot ข้อดีคือ อุณหภูมิเข้าสู่ setpoint เร็วและใกล้เคียง setpoint มากที่สุด แตกต่างจากลักษณะการควบคุมอุณหภูมิในงานวิจัยของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) ที่ใช้ลักษณะการควบคุมแบบ 1 ขั้นตอน คือ ตั้งค่าถังต้มน้ำร้อนไว้ที่ 30.00 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนถึงค่าที่ตั้งไว้ระบบจะตัดการให้ความร้อน และปล่อยให้ น้ำร้อนไหลเวียนรอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพจนกระทั่งอุณหภูมิของทั้งสอง

ถึงเท่ากับที่ 30.00 องศาเซลเซียส ลักษณะการทำงานเช่นนี้จะเกิด overshoot น้อยมากถึงไม่เกิดขึ้นเลย ข้อเสียของลักษณะการควบคุมเช่นนี้ คือ ใช้เวลานานในการเข้าสู่ setpoint ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธีการควบคุมอุณหภูมิแบบ 2 ชุดคำสั่งเพื่อให้อุณหภูมิเข้าสู่ setpoint เร็วที่สุด และไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการหมักเนื่องจากอุณหภูมิในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *P. bifementans* คือ 37.00 องศาเซลเซียส แต่ *P. bifementans* แบคทีเรียจะผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ดีที่อุณหภูมิ 30.00 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาถึงข้อดีโดยรวมแล้วนั้นการควบคุมแบบ 2 ชุดคำสั่งจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยฉบับนี้

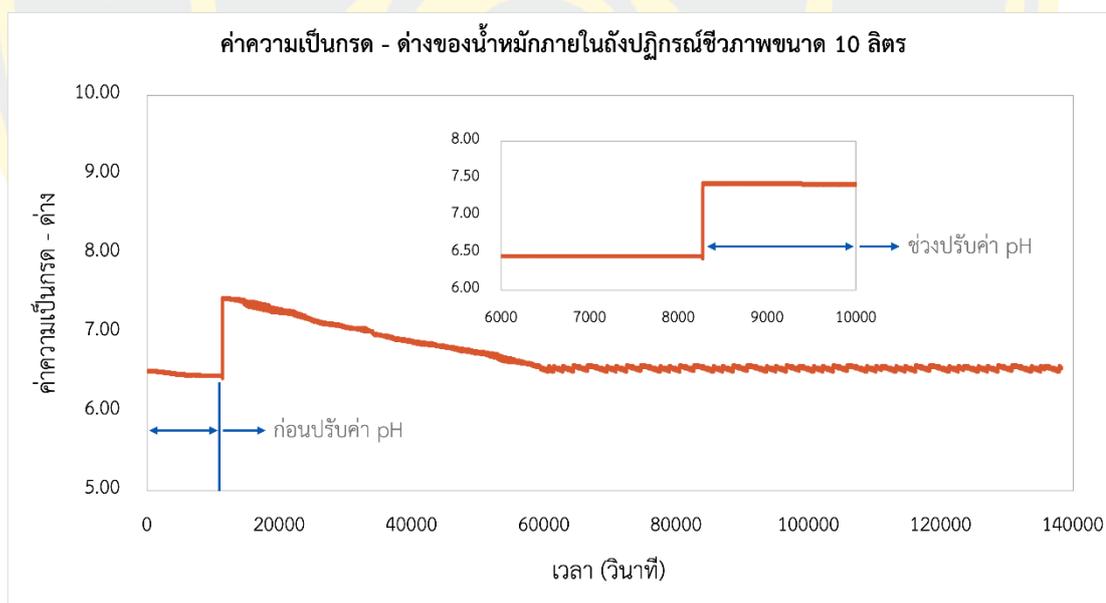
เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยอุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ณ สภาวะอุณหภูมิเริ่มคงที่หลังชั่วโมงที่ 8.64 มีค่าเท่ากับ 31.17 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในถังต้มน้ำร้อนเท่ากับ 31.65 ซึ่งมีผลต่างอุณหภูมิเท่ากับ 0.48 องศาเซลเซียส โดยผลต่างอุณหภูมินี้เป็นผลมาจากการสูญเสียความร้อนในระบบ (heat loss) เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากผู้วิจัยได้ทำการหุ้มฉนวนกันความร้อนจำนวนสองชั้นให้แก่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ถังต้มน้ำร้อน รวมทั้งท่อลำเลียงน้ำทั้งหมดภายในระบบเพื่อป้องกันการสูญเสียความร้อนในระบบให้ได้มากที่สุด



ภาพที่ 4-29 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิภายในถังต้มน้ำร้อนและอุณหภูมิในชั้นแฉักเกิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร

2.2 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด – ด่างในระหว่างกระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากรายงานของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตบิวทานอลได้ดีเมื่อค่า

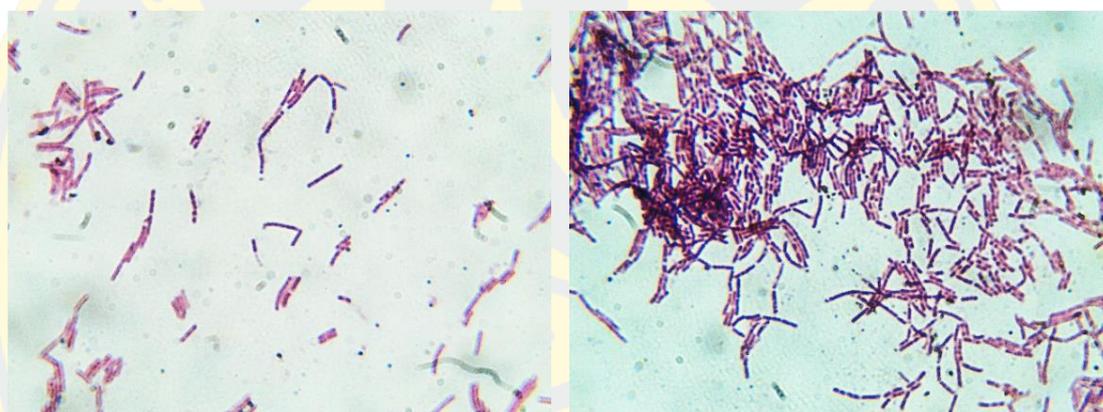
ความเป็นกรด - ด่าง อยู่ระหว่าง 6.50 ถึง 7.50 ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงตั้งค่าชุดคำสั่งให้ควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างให้อยู่ใกล้เคียงกับ 6.50 มากที่สุด ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 M เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 6.5 เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 18 ของกระบวนการหมักค่าความเป็นกรด - ด่างลดลงอยู่ในช่วง 6.42 ระบบจึงทำการปรับสภาพด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด - ด่างเปลี่ยนแปลงไปเป็นอยู่ในช่วง 7.42 และเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่อง ผู้วิจัยจึงตัดสินใจปรับวิธีการเติมสารละลายกรด และสารละลายด่างใหม่ด้วยการเปิดวาล์วการเติมกรดและด่างอย่างช้าที่สุดเท่าที่จะทำได้ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด - ด่าง อยู่ในช่วง 6.67 ถึง 6.50 จนถึงชั่วโมงที่ 384 อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะต้องหมั่นตรวจสอบค่าความเป็นกรด - ด่างอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากหากมีสารละลายกรดหรือด่างหยดลงถึงปฏิกรณ์ชีวภาพมากเกินไปจะส่งผลกระทบต่อระบบทั้งหมด เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์คงเหลือ 900 มิลลิลิตร และสารละลายไฮโดรคลอริกคงเหลือ 940 มิลลิลิตร โดยสารละลายทั้งสองชนิดมีปริมาตรเริ่มต้นเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าระบบพยายามควบคุมให้ค่าความเป็นกรด - ด่างเข้าใกล้เคียง 6.5 มากที่สุดตลอดเวลา การหมักดังภาพที่ 4-31



ภาพที่ 4-30 ผลการควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างของสารละลายภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

2.3 ผลการป้องกันการปนเปื้อนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ก่อนเริ่มต้นกระบวนการหมักผู้วิจัยได้มีการทำความสะอาดอุปกรณ์ทุกชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักเพื่อไม่ให้แบคทีเรียชนิดอื่นรบกวนการทำงานของแบคทีเรีย *P. bifementans* เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 0

และ ณ ชั่วโมงที่ 384 ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก ผู้วิจัยได้นำน้ำหมักตัวอย่างจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพย้อมสีด้วยเทคนิค Gram stain และส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานโดยคร่าว พบว่า แบคทีเรียมีลักษณะเป็น Rod shape เรียวยาว ไม่ได้มีความแตกต่างกันระหว่าง (ก) ชั่วโมงที่ 0 และ (ข) ในชั่วโมงที่ 384 สิ่งที่เห็นได้อย่างชัดเจน คือ ความหนาแน่นของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากในชั่วโมงที่ 384 แต่ลักษณะสัณฐานของเชื้อไม่ได้มีความแตกต่างกันแต่อย่างใด อีกทั้งแบคทีเรียยังย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet และไม่พบเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงของ Safranin-o แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแกรมลบ หรือแบคทีเรียชนิดอื่นระหว่างกระบวนการหมักจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 384 ดังภาพที่ 4-32



(ก)

(ข)

ภาพที่ 4-31 แบคทีเรีย *P. bifementans* (ก) ชั่วโมงที่ 0 ของกระบวนการหมัก (ข) หลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก

2.4 ผลการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล ผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และผลการใช้สารตั้งต้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ระหว่างกระบวนการหมักทำการเก็บตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติในวันที่ 1 ถึง 5 เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง สารละลายภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะลดลงไป 1.2 ลิตร จากนั้นในวันที่ 6 ถึง วันที่ 16 ของกระบวนการหมักทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง รวมสารละลายภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะลดลงไปเพียง 1.6 ลิตร ถือว่าเป็นปริมาณที่น้อยและไม่กระทบกับระบบเนื่องจากเซ็นเซอร์ทุกตัวยังสามารถตรวจวัดค่าได้ตามปกติ นำไปวิเคราะห์ผลความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลด้วยเทคนิค GC-FID พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 สามารถผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้นสูงที่สุด รองลงมา คือ สารละลายเอทานอล และอะซิโตน มีความเข้มข้นเท่ากับ 30.0680, 10.9794 และ 10.2913 ณ ชั่วโมงที่ 120, 318 และ 318 ตามลำดับ

เริ่มตรวจพบสารละลายบิวทานอลในระหว่างกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 37 ความเข้มข้นเท่ากับ 0.0178 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ สารละลายเอทานอล และสารละลายอะซิโตน ความเข้มข้นเท่ากับ 0.0491, 0.0400 ณ ชั่วโมงที่ 102 และ 114 ตามลำดับ

ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 19.84 กรัมต่อลิตร และเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 384 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือเท่ากับ 8.01 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 เมื่อหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร มีระยะ Lag phase ระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ Exponential phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 จนถึงชั่วโมงที่ 75 โดยมีค่าดูดกลืนแสง ณ ชั่วโมงที่ 75 เท่ากับ 1.4431 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 76 เป็นต้นไปแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ Stationary phase ไปจนถึงชั่วโมงที่ 264 จากนั้นจึงค่าดูดกลืนแสงเริ่มลดลง เนื่องจาก ณ ชั่วโมงที่ 264 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือเท่ากับ 8.94 กรัมต่อลิตร ระยะนี้แบคทีเรียเริ่มมีความหนาแน่นของเซลล์ลดลงส่งผลให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงตามไปด้วย เรียกระยะนี้ว่า Death phase เป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนลดลง ซึ่งการลดลงของแบคทีเรีย ดังภาพที่ 4-32 มีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เริ่มลดน้อยลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการหมัก อีกทั้งยังเกิดการสะสมของสารผลิตภัณฑ์ (อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียโดยถูกผลิตมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ อย่างไรก็ตาม ณ ชั่วโมง 384 ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีความเข้มข้นน้อยลงเนื่องจากเซลล์ของแบคทีเรียอาจเปลี่ยนแปลงสารผลิตภัณฑ์บางส่วนไปเป็น Furfural และ 5-hydroxymethyl furfural หรือเรียกว่า HMF ซึ่งถูกรายงานไว้ในงานวิจัยของ (Xiros et al., 2016) และในส่วนของสารละลายบิวทานอลและเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นอย่างมาก แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการทนทานต่อสารละลายจำพวกแอลกอฮอล์แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อมีสารพิษอยู่นอกเซลล์ เซลล์ของแบคทีเรียแบคทีเรียจะสร้างสารกลุ่มแอลกอฮอล์ไลซิส (Alcohololysis) ในการสลายสารกลุ่มแอลกอฮอล์ เช่น กระบวนการสลายสารละลายบิวทานอล (Butanolysis) ด้วยการใช้สารเมตาบอไลต์ของเซลล์ (Microbial metabolites) (Arias-Roblero, Mora-Villalobos, & Velazquez-Carrillo, 2021) ส่งผลให้ความเข้มข้นของสารกลุ่มแอลกอฮอล์ลดลง (Patinios et al., 2020) ซึ่งเป็นเหตุผลในการลดลงของความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลในกระบวนการหมักครั้งนี้

ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า หากต้องการสารละลายบิวทานอลที่ความเข้มข้นสูงสุดต้องทำการหมักเพียง 120 ชั่วโมง หรือ 5 วันเท่านั้น ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 30.00 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 6.5 ถึง 7.5 และหลังจากชั่วโมงที่ 120 เป็นต้นไป ความเข้มข้นของบิวทานอลจะลดลงอย่างต่อเนื่อง หากต้องการความเข้มข้นของอะซิโตนและเอทานอลสูงที่สุดต้องทำการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 318 ดังภาพที่ 4-33

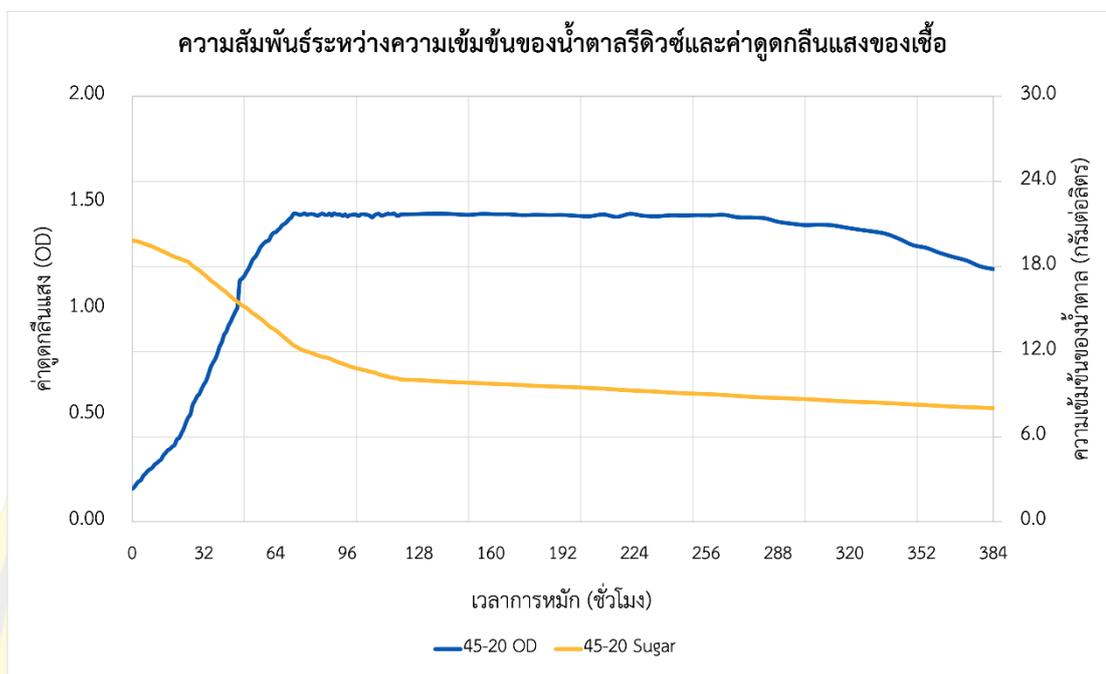
เมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างระหว่างการหมักด้วยแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 0.5 ลิตร และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นแบบพร้อมระบบควบคุมซึ่งถูกสร้างขึ้นจากงานวิจัยของ (เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) ขนาด 10 ลิตร พบว่า การผลิตสารผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันทั้งในด้านความหนาแน่นของเซลล์ โดยความหนาแน่นของเซลล์ในขวดทดลองมีความหนาแน่นสูงสุดเท่ากับ 1.5980 ค่า SG เท่ากับ 0.1407 ต่อชั่วโมง และความหนาแน่นของเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความหนาแน่นสูงสุดเท่ากับ 1.4498 ค่า SG เท่ากับ 0.1199 ต่อชั่วโมง และความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ โดยในขวดทดลองความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 4.1989, 19.0010 และ 13.8005 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 120 ทั้งหมด แต่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 10.29, 30.0680 และ 10.9794 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 318, 120 และ 318 ตามลำดับ ดังตารางที่ 5-4 มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 8.6993, 25.4167 และ 9.2810 ตามลำดับ

หากเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นด้านการผลิตสารละลายบิวทานอลจากกระบวนการหมักแบบ ABE ในตารางที่ 4-4 พบว่า การผลิตบิวทานอลด้วยแบคทีเรีย *P. bif fermentans* 45-20 จากการหมักโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลจากเปลือกสับปะรดมีความเข้มข้นของบิวทานอลมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นในตารางที่ 4-4 ปัจจัยแรกที่ส่งผลต่อความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตสารละลายบิวทานอล คือ ค่าความเป็นกรด - ต่าง จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยของ (Lépiz-Aguilar, Rodríguez-Rodríguez, Arias, & Lutz, 2013) มีความเข้มข้นของบิวทานอล 25.00 กรัมต่อลิตร และในงานวิจัยของ (Blaschek, Annous, Formanek, & Chen, 2002) มีความเข้มข้นของบิวทานอล 20.10 กรัมต่อลิตร งานวิจัยทั้งสองไม่ได้มีการควบคุมค่าความเป็นกรด - ต่าง แตกต่างจากงานวิจัยฉบับนี้ที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด - ต่าง ซึ่งจากงานวิจัยของ (Martinez-Ruano et al., 2024) ได้รายงานไว้ว่า หากค่าความเป็นกรด - ต่างต่ำจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตสารละลายอะซิลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) และสารละลายอะซิเตท (Acetate) เนื่องจากทั้งสองสารละลายนี้เป็นสารตั้งต้นของสารละลายทั้งอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลซึ่งเป็นสาเหตุที่ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์อยู่ในปริมาณที่ต่ำ ในช่วง Acidogenesis ค่าความเป็นกรด - ต่างจะลดลงอย่างรวดเร็วจากการที่แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก (Acetic acid) และบิวทีริก (Butyric acid) และในส่วน of ขั้นตอน Solventogenesis จะเริ่มต้นขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด - ต่างเข้าสู่จุดวิกฤตและเกิดการผลิตสารละลายอะซิโตนและบิวทานอล หากจะสรุปให้เข้าใจโดยง่าย คือ แบคทีเรียจะเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นกรดชนิดต่าง ๆ ซึ่งกรดเหล่านี้ล้วนเป็นสารตั้งต้นของทั้ง อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลในกระบวนการหมักทั้งสิ้น เมื่อถึงจุดที่ค่าความเป็นกรด - ต่างลดลงถึงจุดต่ำที่สุด (Critical point) แบคทีเรียจะเริ่มกระบวนการเปลี่ยนกรดที่กล่าวมาข้างต้นไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงดำเนินการปรับค่าความเป็นกรด - ต่างเพื่อควบคุมให้แบคทีเรียผลิตสารละลายกรดซึ่งเป็น

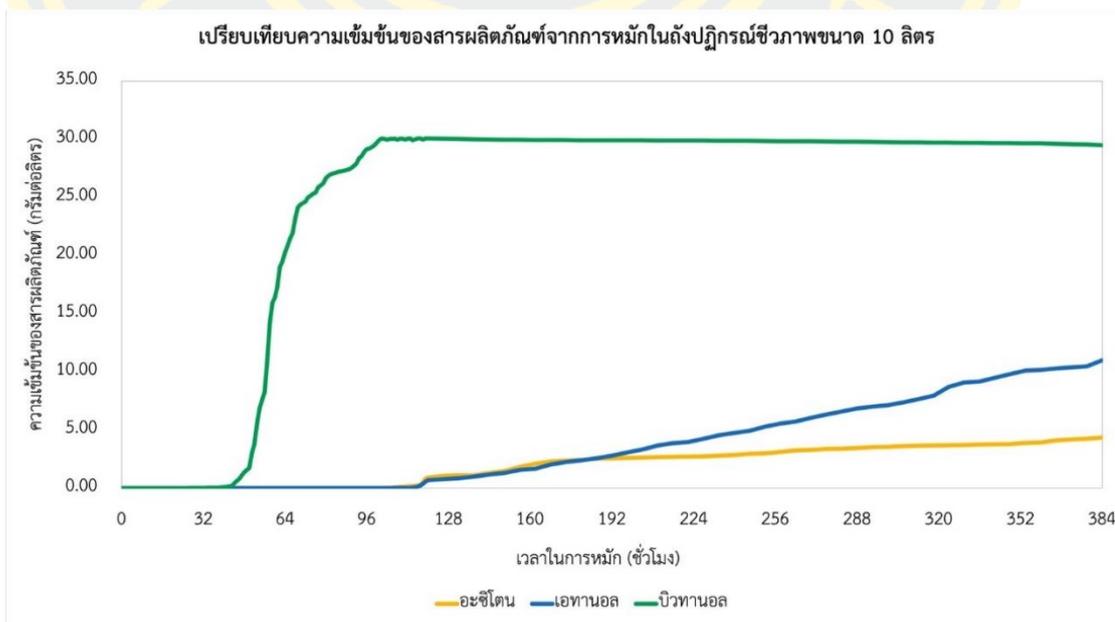
สารตั้งต้นของสารผลิตภัณฑ์ออกมาอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามหากไม่ได้มีการควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างในกระบวนการหมัก เมื่อค่าความเป็นกรด - ด่างลดต่ำลงมากกว่า 4.5 จะส่งผลให้ช่วง Solventogenesis เกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น ๆ และไม่มีประสิทธิภาพ (Lee et al., 2008) ปัจจัยที่สองคือ อุณหภูมิ โดยอุณหภูมิเฉลี่ยที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบ ABE จากตารางที่ 4-4 จะอยู่ในช่วง 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามในงานวิจัยของ (Roy & Dahman, 2023) ใช้อุณหภูมิในการหมัก 45 องศาเซลเซียสจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าได้ความเข้มข้นของสารละลายบิวทานอลในปริมาณเพียง 15.00 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าจะใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *CbCt* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการกลายพันธุ์ด้วยการนำเอาแบคทีเรีย *Clostridia spp.* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *C. beijerinckii* (ATCC BA101) (*Cb*) และ *C. thermocellum* (ATCC 27405) (*Ct*) ผสมเข้าด้วยกัน แต่ด้วยอุณหภูมิในกระบวนการหมักที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงส่งผลต่อความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 4-4 เปรียบเทียบความเข้มข้นสารละลายบิวทานอลในงานวิจัยอื่นด้วยการหมักแบบกะ

แบคทีเรีย (Strain)	สารตั้งต้น (Substrate)	สภาวะ (Conditions)	บิวทานอล (g/L)	อ้างอิง (Ref.)
<i>C. beijerinckii</i> BA101	แป้ง (starch)	ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 30 °C ไม่ควบคุม pH	20.10	(Blaschek et al., 2002)
<i>C. beijerinckii</i> BA101	มันสำปะหลัง	ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 40 °C ไม่ควบคุม pH	25.00	(Lépiz-Aguilar et al., 2013)
<i>C. acetobutylicum</i> NCIMB 13357	อินทผลาล์ม	ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 °C pH 7.0	11.00	(Khamaiseh, Hamid, Abdeshahian, Yusoff, & Kalil, 2014)
<i>C. Cochlearium</i> No.45-20	น้ำตาลกลูโคส	ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 30 °C pH 6.5 ถึง 7.5	20.60	(K. Eakkachai, 2018)
<i>C. acetobutylicum</i> cac3319/cac0323KO	น้ำตาลกลูโคส	ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 °C pH (N/A)	20.60	(G. Du et al., 2021)
<i>CbCt</i>	ฟางข้าวสาลี	ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 45 °C pH 7.0	15.00	(Roy & Dahman, 2023)
<i>P. bifermentans</i> No.45-20	เปลือก สับปะรด	ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 30 °C pH 6.5 ถึง 7.5	30.06	งานวิจัยฉบับนี้ (2024)



ภาพที่ 4-32 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และค่าดูดกลืนแสงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 10 ลิตร



ภาพที่ 4-33 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์และเวลาในการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร

ตารางที่ 4-5 เปรียบเทียบภาพรวมกระบวนการหมักในขวดทดลองและถังปฏิกรณ์ชีวภาพของแบบที่เรียกสายพันธุ์รหัส 45-20 ซึ่งหมักด้วยน้ำตาลจากเปลือกสับประด

ขวดทดลองปริมาตร 0.5 ลิตร			ถังปฏิกรณ์ชีวภาพปริมาตร 10 ลิตร		
เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง (5 วัน)			เวลาหมักการหมัก 384 ชั่วโมง (16 วัน)		
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)
4.1989	19.0010	13.8005	10.2913	30.0680	10.9794
ความเข้มข้นสารผลิตภัณฑ์รวม (กรัมต่อลิตร)		37.00	ความเข้มข้นสารผลิตภัณฑ์รวม (กรัมต่อลิตร)		51.34
ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์		ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์			
เริ่มต้นการหมัก (กรัมต่อลิตร)	สิ้นสุดการหมัก (กรัมต่อลิตร)	เริ่มต้นการหมัก (กรัมต่อลิตร)	สิ้นสุดการหมัก (กรัมต่อลิตร)		
19.72	10.00	19.84	8.01		
ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)		9.72	ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)		11.83
ความหนาแน่นของเซลล์		ความหนาแน่นของเซลล์			
เริ่มต้นการหมัก	สูงสุด (ชั่วโมงที่ 120)	เริ่มต้นการหมัก	สูงสุด (ชั่วโมงที่ 114)		
0.0980	1.5980	0.1543	1.4498		
ค่าความเป็นกรด - ต่าง		ค่าความเป็นกรด - ต่าง			
เริ่มต้นการหมัก	ค่าเฉลี่ยตลอดการหมัก	เริ่มต้นการหมัก	ค่าเฉลี่ยตลอดการหมัก		
6.5	5.19	6.5	6.69		
ผลได้			ผลได้		
อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
0.2160	0.9774	0.7099	8.6993	25.4167	9.2810

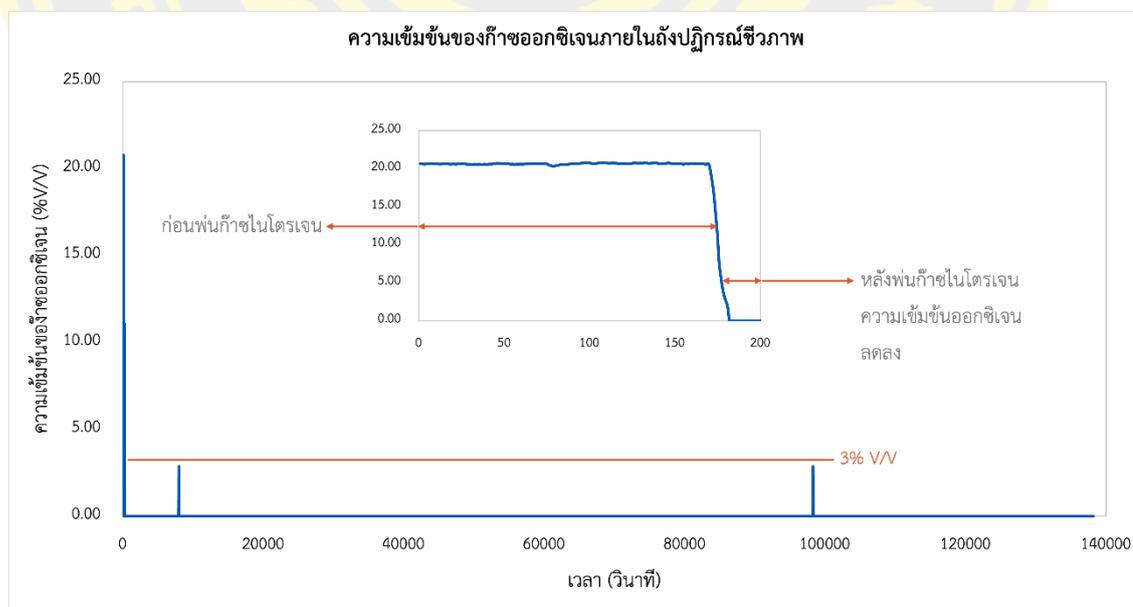
2.5 ผลการควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและผลการบันทึก

ค่ายัง Google sheet ผ่าน IFTTT Platform ถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะถูกติดตั้งเซ็นเซอร์ตรวจวัดก๊าซออกซิเจนจำนวน 1 จุด และใช้ก๊าซไนโตรเจนในการแทนที่ก๊าซออกซิเจนส่งผลให้เกิดสถานะไร้ออกซิเจนขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเซ็นเซอร์ตรวจวัดก๊าซออกซิเจนจะตรวจวัดค่าทุกวินาที แต่

ผู้วิจัยได้เขียนชุดคำสั่งควบคุมให้ระบบอ่านค่าและส่งไปบันทึกผลทุก 10 วินาที ทำการหมักเป็นระยะเวลา 16 วัน ข้อมูลที่ได้จากการหมักมีทั้งสิ้น 1,382,400 ค่า ซึ่งถูกบันทึกไว้ใน Google sheets พบว่า Google sheets ถูกสร้างขึ้นมาตรงตามข้อมูลที่ผู้วิจัยกรอกไปยัง Platform IFTTT สามารถบันทึกค่าออกซิเจนได้ ดังภาพที่ 4-34 เมื่อผู้วิจัยนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม microsoft excel 365 version 2016 พบว่า ระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เริ่มต้นระบบวันที่ 1 ของการหมักพบว่า มีค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 20.66 %V/V ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณความเข้มข้นของออกซิเจนในอากาศทั่วไป (21.00 %V/V) และระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติใช้เวลา 1800 วินาที หรือ 30 นาที ในการทำให้ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเกิดสถานะไร้ออกซิเจนโดยสมบูรณ์ สาเหตุที่ในวันที่ 1 ของการหมัก ระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนใช้เวลาในการทำให้เกิดสถานะไร้ออกซิเจนเป็นระยะเวลานาน เนื่องจาก ผู้วิจัยได้ใช้ชุดคำสั่ง สั่งการให้เซ็นเซอร์เริ่มทำงานก่อนเป็นระยะเวลา 15 นาทีเพื่อความเสถียรและเที่ยงตรงของเซ็นเซอร์ จากนั้นจึงกดปุ่มสอบเทียบและทิ้งไว้อีก 5 นาที จึงดำเนินการเริ่มต้นการพ่นก๊าซไนโตรเจนเพื่อแทนที่ก๊าซออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ หากวิเคราะห์ตามระยะเวลาที่ได้กล่าวไปข้างต้น ณ วินาทีที่ 1640 ความเข้มข้นของออกซิเจน 20.66 %V/V และลดลงจนถึง 0.00 %V/V อย่างรวดเร็วโดยใช้เวลาเพียง 170 วินาที หรือ 2.83 นาทีเท่านั้นในการทำให้เกิดสถานะไร้ออกซิเจนโดยสมบูรณ์ จากนั้นค่าความเข้มข้นของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพยังคงที่ที่ 0.00 %V/V จนถึงวินาทีที่ 7997 เซ็นเซอร์ตรวจพบความเข้มข้นของออกซิเจน 2.83 %V/V จากนั้นระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนจึงสั่งการเปิดโซลินอยด์วาล์วเพื่อพ่นก๊าซไนโตรเจนอีกครั้ง ในครั้งนี้ระบบใช้เวลา 40 วินาทีในการทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนกลับไป 0.00 %V/V อีกครั้ง โดยค่าความเข้มข้นของออกซิเจนยังคงที่เรื่อยมา และเมื่อเข้าสู่วินาทีที่ 98297 เซ็นเซอร์ตรวจพบความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนอีกครั้งที่ 2.83 %V/V ในครั้งนี้ระบบใช้เวลาเพียง 40 วินาทีในการทำให้ค่าความเข้มข้นของออกซิเจนกลับไปเป็น 0.00 %V/V อีกครั้ง และตรวจไม่พบความเข้มข้นของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ดังภาพที่ 4-35

สเปรดชีตตามชื่อ	คอลง	แก้ไขล่าสุด	
O2_in_reactor	ฉับ	13:42	
O2_in_reactor (1)	ฉับ	13:39	
O2_in_reactor (2)	ฉับ	13:41	
O2_in_reactor (3)	ฉับ	13:42	
O2_in_reactor (4)	ฉับ	13:40	
O2_in_reactor (5)	ฉับ	13:42	
O2_in_reactor (6)	ฉับ	13:43	
O2_in_reactor (7)	ฉับ	13:43	
O2_in_reactor (8)	ฉับ	13:44	
O2_in_reactor (9)	ฉับ	13:44	
O2_in_reactor (10)	ฉับ	13:47	
O2_in_reactor (11)	ฉับ	13:48	
O2_in_reactor (12)	ฉับ	13:48	

ภาพที่ 4-34 ผลการสร้าง sheets ผ่าน platform IFTTT เพื่อบันทึกค่าออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ



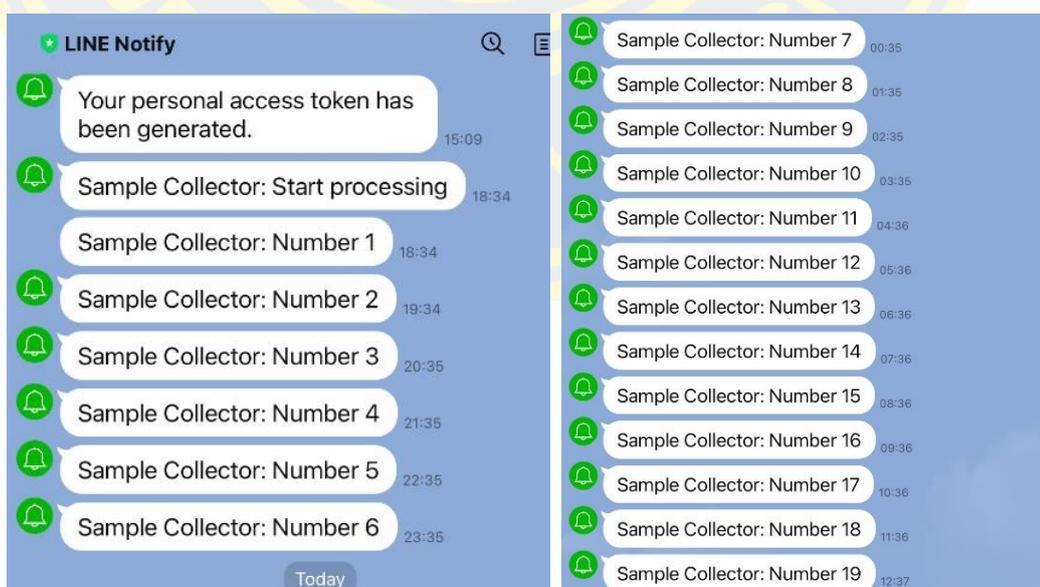
ภาพที่ 4-35 ผลการควบคุมปริมาณก๊าซออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

2.6 ผลการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติและการส่งแจ้งเตือนผู้ใช้งานผ่าน Line notify เมื่อเริ่มเปิดระบบชุดทำความเย็นทั้ง 4 ด้านจะเริ่มทำงานทันที โดยทำงานต่อเนื่องทั้งหมด 16 วันทั้ง 4 ชุด ในเครื่องเก็บตัวอย่างมีเซ็นเซอร์ตรวจวัดอุณหภูมิถูกติดตั้งไว้จำนวน 1 ตัวซึ่งตรวจวัดอุณหภูมิทุกวินาที แต่ผู้วิจัยเขียนชุดคำสั่งให้รับค่าอุณหภูมิและส่งไปบันทึกยัง Google sheets ผ่าน IFTTT platform ทุก 10 วินาที ข้อมูลที่ได้จากการหมักมีทั้งสิ้น 1,382,400 ค่า เซ็นเซอร์ตรวจวัดอุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่างจะไม่ถูกสั่งให้ทำงานก่อนเป็นระยะเวลา 15 นาที เหมือนกับเซ็นเซอร์ตรวจวัดออกซิเจน เนื่องจากเซ็นเซอร์ถูกสอบเทียบ และลบค่าผลต่างออกในขั้นตอนก่อนหน้าแล้ว จึงสามารถนำมาใช้งานได้ทันที เมื่อเริ่มต้นการทำงานของชุดทำความเย็น ณ วินาทีที่ 0 อุณหภูมิภายในห้องปฏิบัติการเท่ากับ 25.00 องศาเซลเซียส (ผู้วิจัยได้นำ thermometer ชนิดที่ของเหลวเป็นแอลกอฮอล์ มาเทียบค่าอุณหภูมิ ผลพบว่า ค่าอุณหภูมิที่เซ็นเซอร์อ่านได้ตรงกับค่าที่แสดงใน thermometer) จากนั้นชุดทำความเย็นใช้เวลา 840 วินาที หรือ 13.83 นาทีในการลดอุณหภูมิลงอยู่ที่ 9.00 องศาเซลเซียส และค่าอุณหภูมียังคงแสดงอยู่ระหว่าง 9.00 ถึง 9.75 องศาเซลเซียส จนเมื่อถึงวินาทีที่ 35080 หรือ 584.66 นาที (9.74 ชั่วโมง) อุณหภูมิในเครื่องเก็บตัวอย่างลดลงเป็น 8.00 องศาเซลเซียส และหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง อุณหภูมิภายในเครื่องเก็บตัวอย่างลดลงเป็น 7.00 องศาเซลเซียส ซึ่งถือเป็นอุณหภูมิต่ำสุดเท่าที่ชุดทำความเย็นจะสามารถทำได้ หากนำค่าอุณหภูมิทั้ง 16 วันมาคิดค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิ พบว่า ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิของเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติเท่ากับ 7.50 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 4-36



ภาพที่ 4-36 ผลการทำงานของชุดทำความเย็นในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ

ในส่วนของการแจ้งเตือนผู้ใช้งานผ่านทาง Line notify พบว่า เมื่อทำการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เวลา 15.09 ระบบได้ทำการแจ้งเตือนผู้ใช้งานจริง และแจ้งเตือนตรงตามรอบการเก็บตัวอย่าง คือ ทุก 1 ชั่วโมง แต่เมื่อเข้าสู่รอบการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 11 จะพบว่า เวลาการเก็บตัวอย่างได้เกินไป 1 นาที ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการนับเวลาบนบอร์ด Arduino และบอร์ด ESP เนื่องจากทั้ง 2 บอร์ดเองมีคำสั่งที่ใช้ในการหยุดการทำงานบางช่วง รวมถึงเป็นผลมาจากการส่งข้อมูลเองด้วย ซึ่งการทำงานของทุกส่วน ตั้งแต่การอ่านค่าจากเซ็นเซอร์ ส่งมายังบอร์ด Arduino จากนั้นส่งไปยังบอร์ด ESP ผ่านเซิร์ฟเวอร์ จากนั้นจึงแจ้งเตือนทาง Line กระบวนการทั้งหมดนี้ล้วนมีผลต่อการหมุนของสเต็ปมอเตอร์ และ Time stamp ที่ถูกบันทึกลงในระบบทั้งสิ้น ดังภาพที่ 4-37 อย่างไรก็ตามหากผู้ใช้งานพบว่าเมื่อครบ 1 ชั่วโมงและไม่ได้รับการแจ้งเตือนผ่าน Line notify ผู้ใช้งานควรเข้าไปตรวจสอบระบบทั้งหมด เนื่องจากการนับจำนวนการเก็บอ้างอิงมาจากการเปิดทำงานของปั๊มจ่ายสาร และรอบการหมุนไปในแต่ละครั้งของสเต็ปมอเตอร์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า หากไม่ได้รับการแจ้งเตือนตามเวลาที่ควรจะเป็นหรือตามเวลาที่ตั้งค่าไว้ ระบบควบคุมหรือระบบเก็บตัวอย่างอัตโนมัติอาจเกิดปัญหาบางอย่างขึ้น เช่น ไฟไม่จ่ายไปยังรีเลย์ส่งผลให้รีเลย์ไม่เปิดการทำงานของปั๊ม และสเต็ปมอเตอร์ วายฟายที่เชื่อมกับบอร์ด ESP ขาดการเชื่อมต่อ หรือแม้แต่ในกรณีร้ายแรงที่สุดคือ ไฟฟ้าดับ ดังนั้นระบบการแจ้งเตือนนี้ จึงช่วยอำนวยความสะดวกในด้านการติดตามจำนวนการเก็บตัวอย่าง โดยผู้ใช้งานไม่จำเป็นต้องอยู่ประจำ ณ ที่ตั้งหรือห้องทดลองเพื่อเฝ้าสังเกตการตลอดเวลาการหมัก เป็นการลดภาระหน้าที่ของผู้ปฏิบัติการทดลองได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 4-37 ผลการแจ้งเตือนผู้ใช้งานถึงจำนวนการเก็บตัวอย่างในเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติผ่าน Line notify

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงาน

จากการพัฒนากระบวนการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยแบคทีเรีย *Paraclostridium bifermentans* ร่วมกับการใช้สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการพัฒนาชุดเก็บตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยควบคุมผ่านอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง พบว่า ชานอ้อยเมื่อผ่านกระบวนการปรับสภาพสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.5 M มีปริมาณลิกนินก่อนและหลังปรับสภาพเท่ากับ $19.78 \pm 0.48\%$ และ $9.44 \pm 0.54\%$ เมื่อเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยวิธี Steam hydrolysis พบว่า ครั้งที่ 1 มีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งถือว่ามีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงเกินกว่า 20 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในสูตรอาหารเพื่อการหมักเพื่อสารละลายบิวทานอล และการไฮโดรไลซิสครั้งที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 25.32, 22.92, 22.16, 19.00 และ 16.55 กรัมต่อลิตร เนื่องจาก Amorphous cellulose จากชานอ้อย ถูกเปลี่ยนจากสายยาวไปเป็น Crystalline cellulose ซึ่งยากต่อการเปลี่ยนเป็นโมเลกุลของน้ำตาลรีดิวซ์ และการไฮโดรไลซิสทุกครั้งปริมาณ Amorphous cellulose ลดน้อยลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงในทุกรอบการไฮโดรไลซิส ส่วนการไฮโดรไลซิสเปลือกสับประรด และเปลือกแตงโม พบว่า สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 23.74 และ 30.19 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงดำเนินการนำน้ำตาลรีดิวซ์จากทั้ง 3 แหล่งหมักในขวดรูปชมพู่ด้วยแบคทีเรีย *Paraclostridium bifermentans* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม และแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20, 45-21, 60-12, 60-17 และ 60-25 ตัวควบคุมเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมหมักด้วยน้ำตาลกลูโคสชนิดผง พบว่า แบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ในการหมักด้วยแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับประรดสามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 4.1989, 19.0010 และ 13.8005 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับหมักด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยและเปลือกแตงโม โดยมีผลได้เท่ากับ เท่ากับ 0.2160, 0.9774 และ 0.7099 ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำน้ำตาลจากเปลือกสับประรดและแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 หมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตรในขั้นตอนต่อไป

ในส่วนของการพัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติและระบบควบคุมสถานะไร้ออกซิเจนอัตโนมัติ เพื่อนำมาใช้งานร่วมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตรพร้อมระบบควบคุม ซึ่งถูกออกแบบไว้ในงานวิจัยของ(เอกชัย ไกลถิ่น, 2565) พบว่า เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติสามารถเก็บตัวอย่างได้ตามที่ผู้วิจัยเขียนชุดคำสั่งให้เครื่องทำงานได้ตลอดระยะเวลาการหมัก สามารถส่งการแจ้ง

เดือนให้ผู้ใช้งานรับทราบถึงสถานะการทำงานของเครื่องผ่านทาง Line notify ในทุกรอบของการเก็บตัวอย่าง อีกทั้งชุดทำความเย็นภายในเครื่องเก็บตัวอย่าง ยังสามารถลดอุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 7.50 องศาเซลเซียส ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ และพบว่าสามารถชะลออัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ มากไปกว่านั้นระบบควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจนที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นสามารถควบคุมให้ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตรเกิดสภาวะไร้ออกซิเจนได้ แม้ว่าจะระหว่างการหมักตลอดเวลา 16 วันจะมีการรั่วไหลของก๊าซออกซิเจนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เช่นเซอร์ตรวจวัดก๊าซออกซิเจนสามารถตรวจจับความเข้มข้นของออกซิเจนได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 1% v/v และบอร์ดควบคุมก็สามารถสั่งการให้โซลินอยด์วาล์วเปิดการทำงาน และพนัก๊าซไนโตรเจนเพื่อแทนที่ก๊าซออกซิเจนที่รั่วเข้ามาในถังปฏิกรณ์ได้อย่างทันท่วงที อีกทั้งยังบอร์ด Arduino ที่ทำงานร่วมกับบอร์ด ESP 32 สามารถส่งค่าสภาวะต่าง ๆ เช่น ค่าออกซิเจน ค่าอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด - ด่าง ไปบันทึกไว้ยัง Google sheets ผ่าน IFTTT platform ได้อย่างรวดเร็ว เชื่อมต่อกับ NETPIE2020 ได้และแสดงข้อมูลได้เป็นอย่างดี ส่งผลให้ผู้ใช้งานสามารถติดตามและนำข้อมูลสภาวะการหมักไปวิเคราะห์ผลได้อย่างสะดวก

เมื่อพิจารณาถึงผลจากกระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร ด้วยแบคทีเรียกลายพันธุ์รหัส 45-20 ซึ่งใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร PCM พบว่า สามารถผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้นสูงที่สุด รองลงมา คือ สารละลายเอทานอล และสารละลายอะซิโตน มีความเข้มข้นเท่ากับ 30.0680, 10.9794 และ 10.2913 ณ ชั่วโมงที่ 120, 318 และ 318 มีผลได้ของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 8.6993, 25.4167 และ 9.2810 ตามลำดับ

จากผลการทดลองทั้งภายในงานวิจัยฉบับนี้ พบว่า การพัฒนาการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพด้วยแบคทีเรีย *Paraclostridium bifermentans* ร่วมกับการใช้สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และการพัฒนาชุดเก็บตัวอย่างเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยควบคุมผ่านอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่ง จึงเป็นการนำเอาอินเทอร์เน็ตของสรรพสิ่งมาประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพตอบสนองนโยบายไทยแลนด์ 4.0 และยังเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาด้านการขาดแคลนพลังงาน ทั้งยังเป็นพลังงานทางเลือกที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มีความยั่งยืน เป็นการเพิ่มมูลค่าแก่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตอบรับต่อแผนพัฒนาทางเศรษฐกิจ (S-curve) ในด้านอุตสาหกรรมแบคทีเรียเพลิงชีวภาพและเคมีชีวภาพ (Biofuels and biochemicals) ตามการพัฒนาเศรษฐกิจแบบองค์รวมใน เศรษฐกิจชีวภาพ เศรษฐกิจหมุนเวียน และเศรษฐกิจสีเขียว (Bio-Circular-Green economy; BCG economy) ได้เป็นอย่างดี

บรรณานุกรม

- Al-Shorgani, N. K. N., Kalil, M. S., Yusoff, W. M. W., & Hamid, A. A. (2018). Impact of pH and butyric acid on butanol production during batch fermentation using a new local isolate of *Clostridium acetobutylicum* YM1. *Saudi journal of biological sciences*, 25(2), 339-348.
- Amiri, H., & Karimi, K. (2018). Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: challenges and perspectives. *Bioresource technology*, 270, 702-721.
- Apipatpapha, T., Ongkunaruk, P., & Chollakup, R. (2022). *Pineapple leaf fiber supply chain analysis for the sustainability of community enterprise: a case study in Thailand*. Paper presented at the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.
- Arduino CC. (n.d.). Arduino MEGA 2560 & Genuino MEGA 2560. Retrieved from <https://www.arduino.cc/en/Main/arduinoBoardMega2560>
- Arias-Roblero, M., Mora-Villalobos, V., & Velazquez-Carrillo, C. (2021). Evaluation of fed-batch fermentation for production of polyhydroxybutyrate with a banana pulp juice substrate from an agro industrial by-product. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 681596.
- Asia Pacific Petrochemical Co., L. (2018). n-Butanol for Safety (Butyl Alcohol). Retrieved from http://www.apcbkk.com/pdf/products/Alcohols/SDS/n-Butanol_TH.pdf
- Assael, M., & Gialou, K. (2003). Measurement of the thermal conductivity of stainless steel AISI 304L up to 550 K. *International Journal of Thermophysics*, 24, 1145-1153.
- AZ-Delivery. (n.d.). ESP32 NodeMCU Module WLAN WiFi Development Board with CP2102. Retrieved from <https://www.az-delivery.de/en/products/esp32-developmentboard>
- Baer, S. H., Blaschek, H. P., & Smith, T. L. (1987). Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*, 53(12),

2854-2861.

- Bankar, S. B., Survase, S. A., Ojamo, H., & Granström, T. (2013). Biobutanol: the outlook of an academic and industrialist. *Rsc Advances*, 3(47), 24734-24757.
- Blaschek, H., Annous, B., Formanek, J., & Chen, C.-K. (2002). Method of producing butanol using a mutant strain of *Clostridium beijerinckii*. In: Google Patents.
- Branco, R. H., Serafim, L. S., & Xavier, A. M. (2018). Second generation bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. *Fermentation*, 5(1), 4.
- Carrico, C. S., Fraga, T., Carvalho, V. E., & Pasa, V. M. (2017). Polyurethane foams for thermal insulation uses produced from castor oil and crude glycerol biopolyols. *Molecules*, 22(7), 1091.
- Casabar, J. T., Unpaprom, Y., & Ramaraj, R. (2019). Fermentation of pineapple fruit peel wastes for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 9, 761-765.
- Chaudhary, A., Akram, A., Ahmad, Q.-u.-A., Hussain, Z., Zahra, S., Minahal, Q., . . . Javed, M. (2021). Optimized biotransformation of acid-treated water melon peel hydrolyzate into ethanol. *Brazilian Journal of Biology*, 83, e253009.
- Development, H. D. o. S., & Transfer, T. (1988). *Occupational Safety and Health Guidelines for Chemical Hazards: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers*
- Devi, S., Dhaka, A., & Singh, J. (2016). Acid and alkaline hydrolysis technologies for bioethanol production: an overview. *International Journal of Advanced Technology in Engineering and Science*, 4(06), 94-106.
- Dharmaraja, J., Shobana, S., Arvindnarayan, S., Vadivel, M., Atabani, A., Pugazhendhi, A., & Kumar, G. (2020). Biobutanol from lignocellulosic biomass: bioprocess strategies. In *Lignocellulosic biomass to liquid biofuels* (pp. 169-193): Elsevier.
- Du, G., Zhu, C., Xu, M., Wang, L., Yang, S.-T., & Xue, C. (2021). Energy-efficient butanol production by *Clostridium acetobutylicum* with histidine kinase knockouts to improve strain tolerance and process robustness. *Green Chemistry*, 23(5), 2155-2168.
- Du, Y., Zou, W., Zhang, K., Ye, G., & Yang, J. (2020). Advances and applications of

- Clostridium co-culture systems in biotechnology. *Frontiers in Microbiology*, 2842.
- Edwards, A. N., Suárez, J. M., & McBride, S. M. (2013). Culturing and maintaining *Clostridium difficile* in an anaerobic environment. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(79), e50787.
- Electric Components datasheet search. (n.d.). Peltier Cooling Module - TEC1-12704. Retrieved from chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.circuitspecialists.com/content/81792/tec1-12704.pdf>
- Electronic, F. (2021, 7 September 2021). Motor, Step motor and Servo motor: Chapter 2 Step motor. Retrieved from <http://fitrox.lnwshop.com/article?tskp=2>
- Ezeji, T., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2007). Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 97(6), 1460-1469.
- Hachuła, B., Grelska, J., Soszka, N., Jurkiewicz, K., Nowok, A., Szeremeta, A. Z., . . . Kaminski, K. (2022). Systematic studies on the dynamics, intermolecular interactions and local structure in the alkyl and phenyl substituted butanol isomers. *Journal of Molecular Liquids*, 346, 117098.
- Holding, F. C. (2019). Stepping Motor Drive. Retrieved from <https://mall.factomart.com/how-to-select-stepping-motor-drive/>
- Ibrahim, M. F., Ramli, N., Bahrin, E. K., & Abd-Aziz, S. (2017). Cellulosic biobutanol by Clostridia: Challenges and improvements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1241-1254.
- Jirapornvaree, I., Suppadit, T., & Popan, A. (2017). Use of pineapple waste for production of decomposable pots. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 6, 345-350.
- Karthick, C., & Nanthagopal, K. (2021). A comprehensive review on ecological approaches of waste to wealth strategies for production of sustainable biobutanol and its suitability in automotive applications. *Energy Conversion and Management*, 239, 114219.
- Khamaiseh, E. I., Hamid, A. A., Abdeshahian, P., Yusoff, W. M. W., & Kalil, M. S. (2014).

- Enhanced butanol production by *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 13357 grown on date fruit as carbon source in P2 medium. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Khedkar, M. A., Nimbalkar, P. R., Gaikwad, S. G., Chavan, P. V., & Bankar, S. B. (2017). Sustainable biobutanol production from pineapple waste by using *Clostridium acetobutylicum* B 527: Drying kinetics study. *Bioresource technology*, 225, 359-366.
- Kim, M., & Day, D. F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 38(7), 803-807.
- Klaithin, E., Glaopo, K., & Laoong-u-thai, Y. (2018). *Development of Clostridium cochlearium by UV- mutation for bio-butanol production*. Paper presented at the The 8th International TIChE Conference (ITIChE 2018), The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand.
- Klinke, H. B., Thomsen, A., & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied microbiology and biotechnology*, 66, 10-26.
- Kondaveeti, H. K., Kumaravelu, N. K., Vanambathina, S. D., Mathe, S. E., & Vappangi, S. (2021). A systematic literature review on prototyping with Arduino: Applications, challenges, advantages, and limitations. *Computer Science Review*, 40, 100364.
- Kutsuna, R., Miyoshi-Akiyama, T., Mori, K., Hayashi, M., Tomida, J., Morita, Y., . . . Kawamura, Y. (2019). Description of *Paraclostridium bifermentans* subsp. *muricolitidis* subsp. nov., emended description of *Paraclostridium bifermentans* (Sasi Jyothsna et al., 2016), and creation of *Paraclostridium bifermentans* subsp. *bifermentans* subsp. nov. *Microbiology and immunology*, 63(1), 1-10.
- Lavanya, G., Venkanteshwarlu, S., Nagaraju, A., & Prasanthi, G. (2016). Cooling and heating of refrigerator jacket by using peltier effect. *Insight Mechanical Engineering*, 1(1).
- Lawson, P. A., & Rainey, F. A. (2016). Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species. *International journal*

- of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), 1009-1016.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and bioengineering*, 101(2), 209-228.
- Lépiz-Aguilar, L., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Arias, M. L., & Lutz, G. (2013). Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) production in fermentation of enzymatically hydrolyzed cassava flour by Clostridium beijerinckii BA101 and solvent separation. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23(8), 1092-1098.
- Li, R.-D., Li, Y.-Y., Lu, L.-Y., Ren, C., Li, Y.-X., & Liu, L. (2011). An improved kinetic model for the acetone-butanol-ethanol pathway of Clostridium acetobutylicum and model-based perturbation analysis. *BMC systems biology*, 5, 1-11.
- Loyarkat, S., Cheirsilp, B., & Umsakul, K. (2013). Direct conversion of sugars and organic acids to biobutanol by non-growing cells of Clostridium spp. incubated in a nitrogen-free medium. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(7), 1726-1738.
- Lu, F., Wang, C., Chen, M., Yue, F., & Ralph, J. (2021). A facile spectroscopic method for measuring lignin content in lignocellulosic biomass. *Green Chemistry*, 23(14), 5106-5112.
- Lucas, F. W., Grim, R. G., Tacey, S. A., Downes, C. A., Hasse, J., Roman, A. M., . . . Holewinski, A. (2021). Electrochemical routes for the valorization of biomass-derived feedstocks: from chemistry to application. *ACS Energy Letters*, 6(4), 1205-1270.
- Makhinova, A. F., & Makhinov, A. N. (2020). Role of humus substances in chemical soil pollution during deposit exploitation in Priokhotye and Priamurye. *Environmental Research*, 188, 109766.
- Maroli, A., Narwane, V. S., & Gardas, B. B. (2021). Applications of IoT for achieving sustainability in agricultural sector: A comprehensive review. *Journal of Environmental Management*, 298, 113488.
- Martínez-Ruano, J. A., Suazo, A., Véliz, F., Otalora, F., Conejeros, R., González, E., & Aroca, G. (2024). Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation and electro-fermentation of xylose by Clostridium autoethanogenum. *Journal of*

Environmental Management, 351, 119918.

McLean, K. M., Pasulka, A. L., & Bockmon, E. E. (2021). A low-cost, accessible, and high-performing Arduino-based seawater pH control system for biological applications. *HardwareX*, 10, e00247.

Mendes, F. B., & Bordignon, S. E. (2020). Renewable energy and the role of biofuels in the current world. In *Recent Developments in Bioenergy Research* (pp. 65-84): Elsevier.

Mitsubishi Chemical Corporation. (n.d.). n-Butanol. Retrieved from https://www.m-chemical.co.jp/en/products/departments/mcc/c3/product/1200988_7916.html

Mocrii, D., Chen, Y., & Musilek, P. (2018). IoT-based smart homes: A review of system architecture, software, communications, privacy and security. *Internet of Things*, 1, 81-98.

Morris, J. G. (1983). *Anaerobic fermentations--some new possibilities*. Paper presented at the Biochemical Society Symposium.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673-686.

Ndaba, B., Chiyanzu, I., & Marx, S. (2015). n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. *Biotechnology Reports*, 8, 1-9.

Ndaba, B., Roopnarain, A., Daramola, M. O., & Adeleke, R. (2020). Influence of extraction methods on antimicrobial activities of lignin-based materials: A review. *Sustainable chemistry and pharmacy*, 18, 100342.

NECTEC, (a member of NSTDA). (2017). An Official Guide to NETPIE. Retrieved from http://203.159.154.241/innogoth/wp-content/uploads/2017/09/NETPIE-WS_v23.pdf

Niemistö, J. (2014). TOWARDS MORE SUSTAINABLE AND EFFICIENT BIOFUELS PRODUCTION—USE OF PERVAPORATION IN PRODUCT RECOVERY AND PURIFICATION.

Nooshin Rahnama, N. R., Suhaila Mamat, S. M., Umi Kalsom, M., Ling FooHooi, L. F., Nor Aini, A., & Ariff, A. (2013). Effect of alkali pretreatment of rice straw on cellulase and xylanase production by local *Trichoderma harzianum* SNRS3 under solid

state fermentation.

Ono, K., & Erhard, A. (2011). *Nondestructive Testing*, 3. Ultrasonics.

Patinios, C., Lanza, L., Corino, I., Franssen, M. C., Van der Oost, J., Weusthuis, R. A., & Kengen, S. W. (2020). Eat1-like alcohol acyl transferases from yeasts have high alcoholysis and thiolysis activity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 579844.

Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2013). Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass techniques, applications and commercialization. InTech*, 119-155.

Rapid Electronics Limited. (2012). Arduino Mega2560 A000067 Board R3. Retrieved from <https://www.rapidonline.com/arduino-mega2560-a000067-board-r3-73-4450>

Ratanasumarn, N., & Chitprasert, P. (2020). Cosmetic potential of lignin extracts from alkaline-treated sugarcane bagasse: Optimization of extraction conditions using response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, 153, 138-145.

Roy, P., & Dahman, Y. (2023). Mutagenesis of novel clostridial fusants for enhanced green biobutanol production from agriculture waste. *Fermentation*, 9(2), 92.

Sanjit S. Chavan, S. P. A., Sadashiv R. Chavan. (2022). Solar Based Thermoelectric Refrigerator Using Peltier Module. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)* 10(I Jan 2022).
doi:<https://doi.org/10.22214/ijraset.2022.39989>

Sarker, T. R., Pattnaik, F., Nanda, S., Dalai, A. K., Meda, V., & Naik, S. (2021). Hydrothermal pretreatment technologies for lignocellulosic biomass: A review of steam explosion and subcritical water hydrolysis. *Chemosphere*, 284, 131372.

Sarofa, U., & Pertiwi, A. P. (2023). Utilization of pineapple cobs and peels for fruit leather processing.

Sen Gupta, S. K. (2017). Proton transfer rate-equilibria in apolar aprotic solvents: a historical perspective. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 30(2), e3605.

Shinha, T., & Hadi, C. (2015). *Clostridium paraputrificum* bacteremia associated with colonic necrosis in a patient with AIDS. *Case Reports in Infectious Diseases*,

2015.

- Sreedevi, A., Harshitha, T. N., Sugumaran, V., & Shankar, P. (2022). Application of cognitive computing in healthcare, cybersecurity, big data and IoT: A literature review. *Information Processing & Management*, 59(2), 102888.
- Srisang, N., & Chavalparit, O. (2014). *Enhancing biogas production from sugarcane bagasse using steam explosion in according with acetic acid pretreatment*. Paper presented at the Advanced Materials Research.
- Srivastava, N., & Pande, M. (2017). Estimating Metabolic Activity of Spermatozoa. *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)*, 123-144.
- Surananee, H. (2018). *Butanol Production from Two-Stage ABE Fermentation of Food Waste*. Prince of Songkla University, Pattani Campus,
- Thai Stainless Steel Development Association. (2014). สแตนเลสคืออะไร? Retrieved from <http://www.tssda.or.th/index.php?actions=about&id=6>
- Thailand factomart industrail product. (2018). คู่มือสวิตชิงเพาเวอร์ซัพพลาย. Retrieved from chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://mcusercontent.com/969d54d965d5d231d4c22bfec/files/bb372f53-38fc-4bcc-a604-b0a5f59dfe3f/Switching_Power_Supply_Manual.pdf
- Vidal-Pardo, A., & Pindado, S. (2018). Design and development of a 5-Channel Arduino-based data acquisition system (ABDAS) for experimental aerodynamics research. *Sensors*, 18(7), 2382.
- Wang, W., Wang, X., Zhang, Y., Yu, Q., Tan, X., Zhuang, X., & Yuan, Z. (2020). Effect of sodium hydroxide pretreatment on physicochemical changes and enzymatic hydrolysis of herbaceous and woody lignocelluloses. *Industrial Crops and Products*, 145, 112145.
- Wang, Y., Wang, J., Pang, J., Zhang, L., Xu, W., & Shao, C. (2020). Introduction of protonic potential of Brønsted–Lowry acids and bases to the quantification of the energy of proton translocation and elucidation of oxidative phosphorylation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 860, 113909.
- Wetzel, D., & McBride, S. M. (2020). The impact of pH on *Clostridioides difficile* sporulation and physiology. *Applied and environmental microbiology*, 86(4),

e02706-02719.

William, B. (2016). History and the teaching of chemistry.

Wunna, K., Nakasaki, K., Auresenia, J. L., Abella, L. C., & Gaspillo, P.-a. D. (2017). Effect of alkali pretreatment on removal of lignin from sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Transactions*, *56*, 1831-1836.

Xiros, C., Janssen, M., Byström, R., Børresen, B., Cannella, D., Jørgensen, H., . . . Tillman, A. (2016). Toward a sustainable biorefinery using high-gravity technology. *Biofuels Bioprod Biorefin* 11: 15–27. In.

Zhao, H., Wang, J., Peng, Y., Cai, X., Liu, Y., Huang, W., . . . Nie, Y. (2022). Genomic insights from *Paraclostridium bifermentans* HD0315_2: General features and pathogenic potential. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 928153.

Zhen, X., Wang, Y., & Liu, D. (2020). Bio-butanol as a new generation of clean alternative fuel for SI (spark ignition) and CI (compression ignition) engines. *Renewable Energy*, *147*, 2494-2521.

กระทรวงอุตสาหกรรม, ส. ส. (2558). พลังงานชีวภาพ (บิวทานอล). Retrieved from <http://asp.plastics.or.th:8001/ArticleKnowledgeListDetail.aspx?id=74>

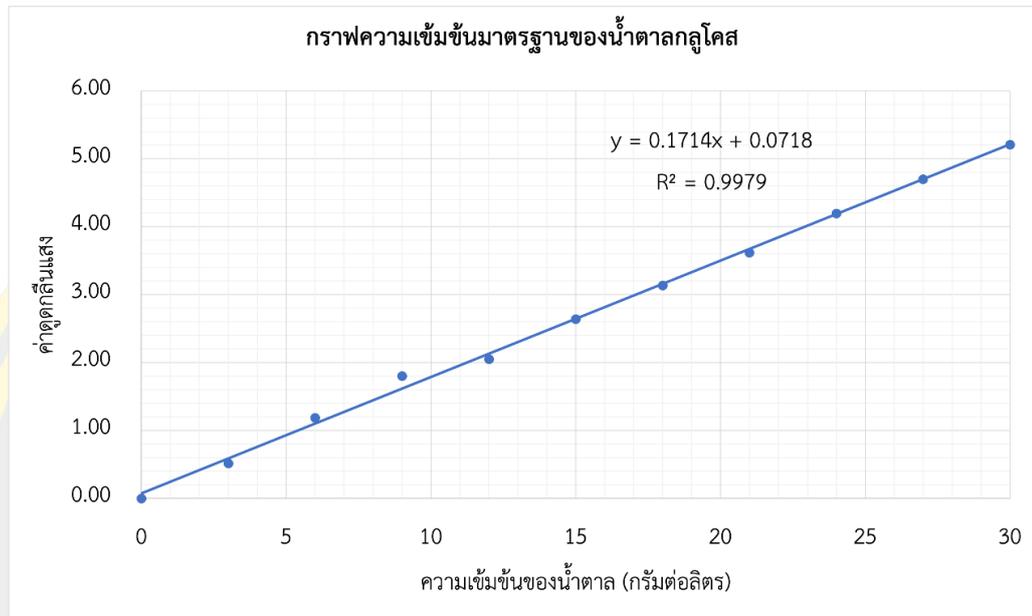
การนิคมอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย. (2559). รายงานการศึกษาความเหมาะสม (Feasibility Study) การจัดตั้งเขตส่งเสริมเศรษฐกิจพิเศษเพื่อกิจการอุตสาหกรรม ภายในนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดและท่าเรืออุตสาหกรรมมาบตาพุด. Retrieved from <https://www.eeco.or.th/web-upload/filecenter/html/establishment/Feasibility/013.pdf>

จีราวุธ วารินทร์. (2563). *Arduino Uno + ตัวอย่างงานด้าน IoT* กรุงเทพมหานคร: ชิมพลิฟาย.

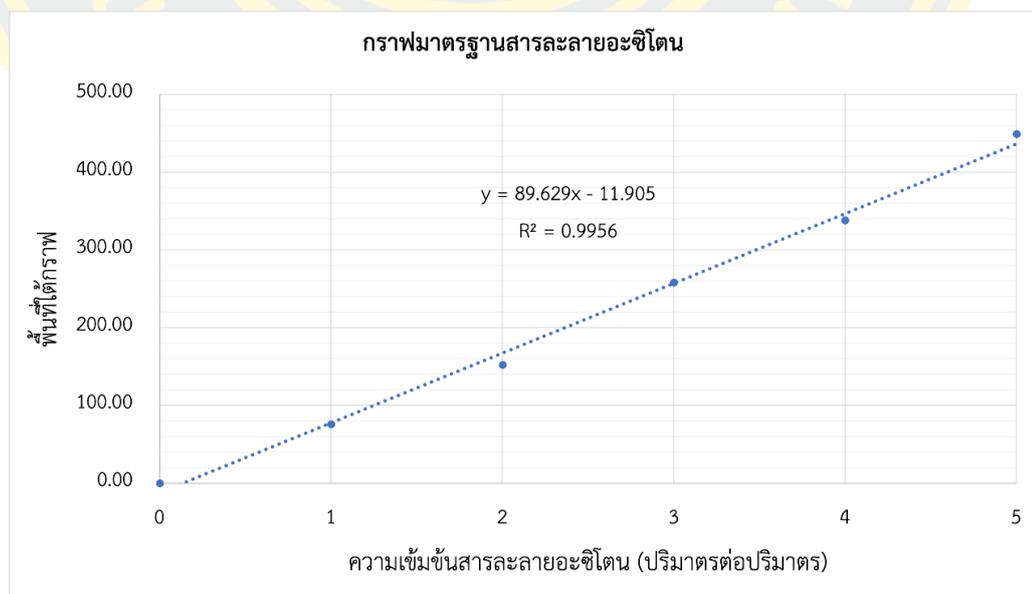
ดอนสัน ปงผาบ. (2563). ไมโครคอนโทรลเลอร์ *Arduino*(pp. 240). Retrieved from <https://images-se-ed.com/ws/Storage/PDF/552284/014/5522840140449PDF.pdf>

มหศักดิ์ เกตุฉ่ำ. (ม.ป.ป.). Internet Of Things (IoT). Retrieved from http://one.bangkok.go.th/info/bmainfo/data_DDS/document/internet-of-things.pdf

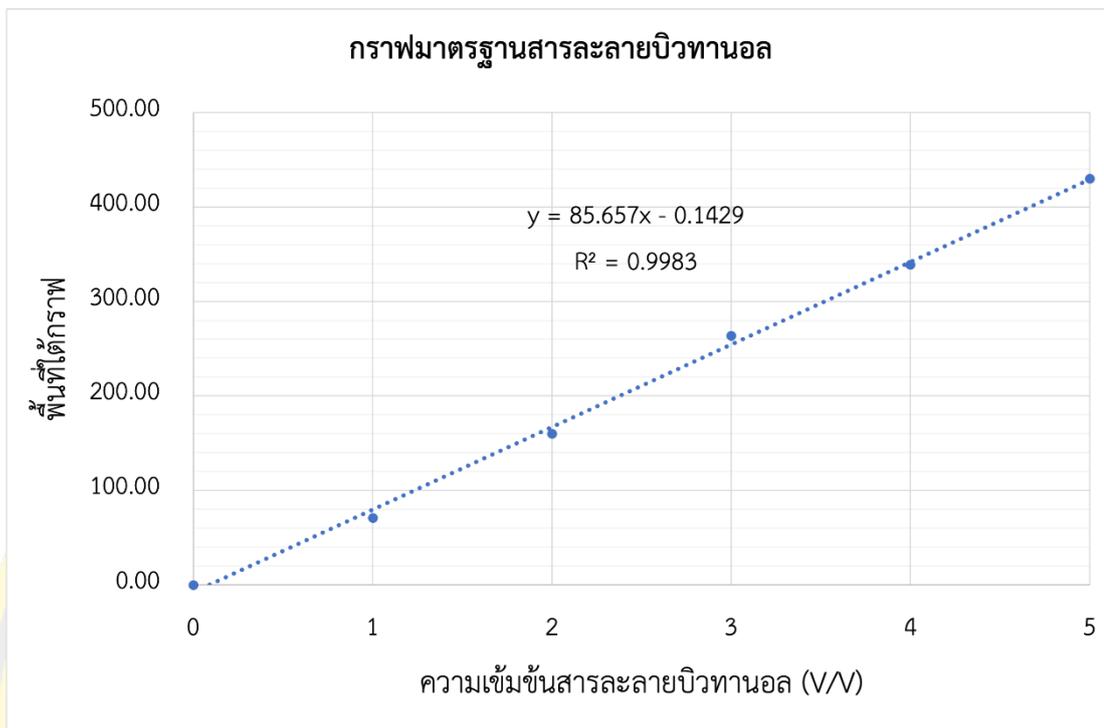
ภาคผนวก



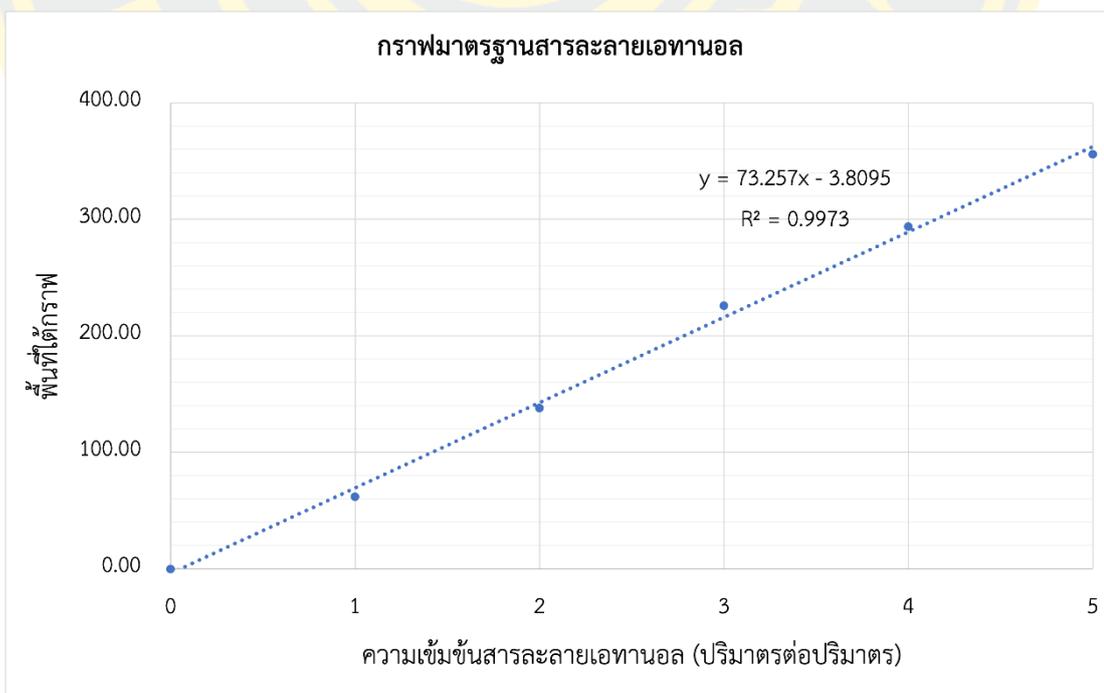
ภาพที่ ก-1 กราฟความเข้มข้นมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



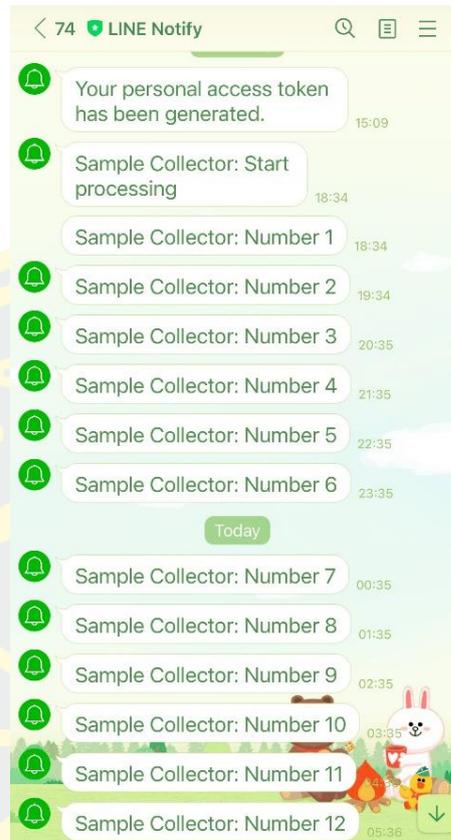
ภาพที่ ก-2 กราฟมาตรฐานสารละลายอะซีโตน



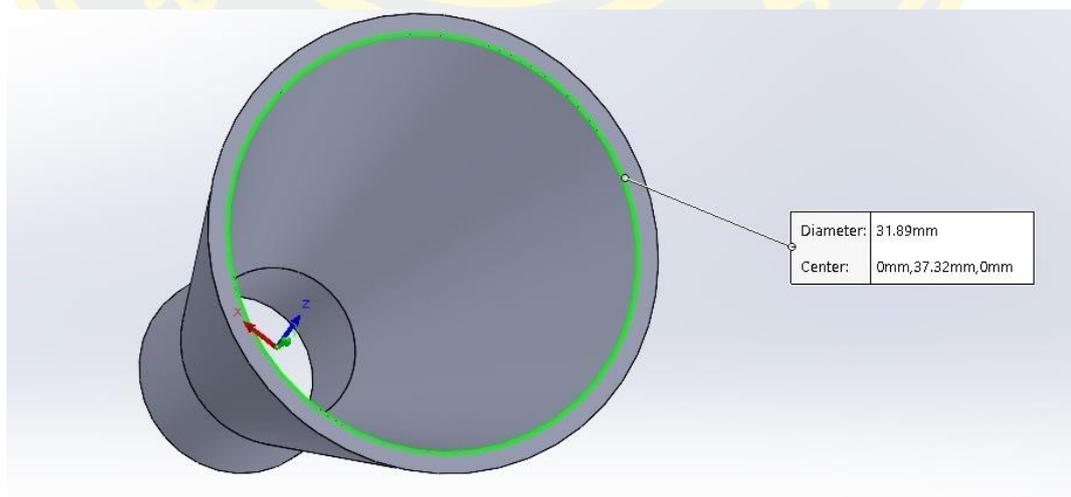
ภาพที่ ก-3 กราฟมาตรฐานสารละลายบิวทานอล



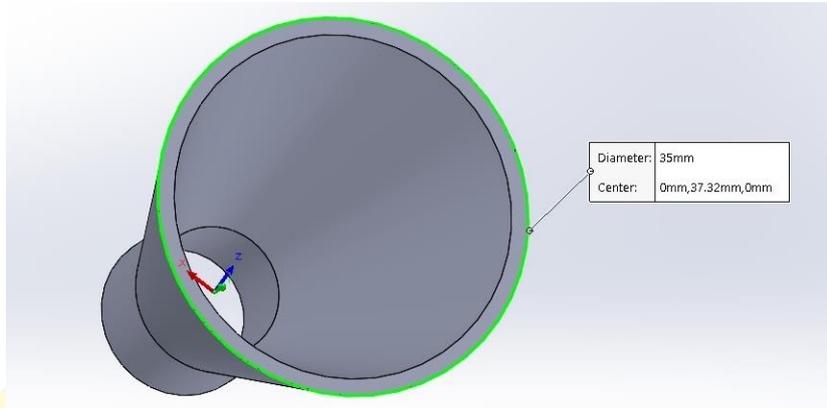
ภาพที่ ก-4 กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอล



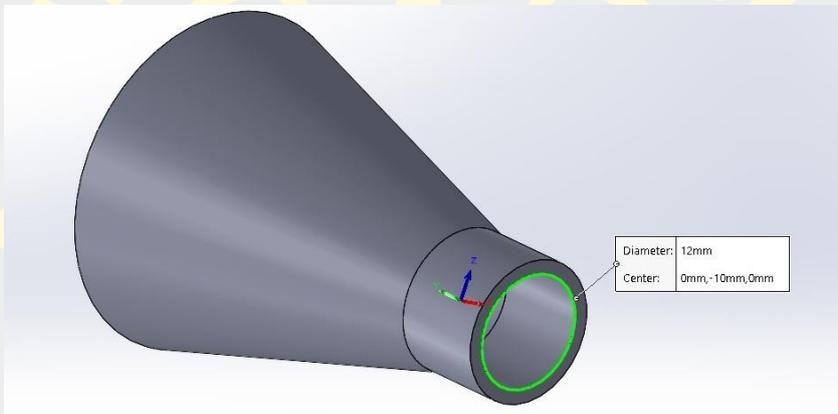
ภาพที่ ก-5 การส่งแจ้งเตือนการเก็บตัวอย่างผ่าน Line notify



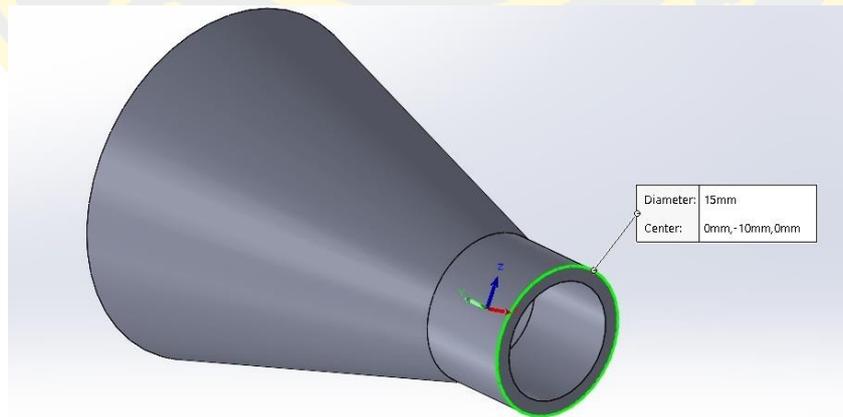
(ก)



(ข)



(ค)

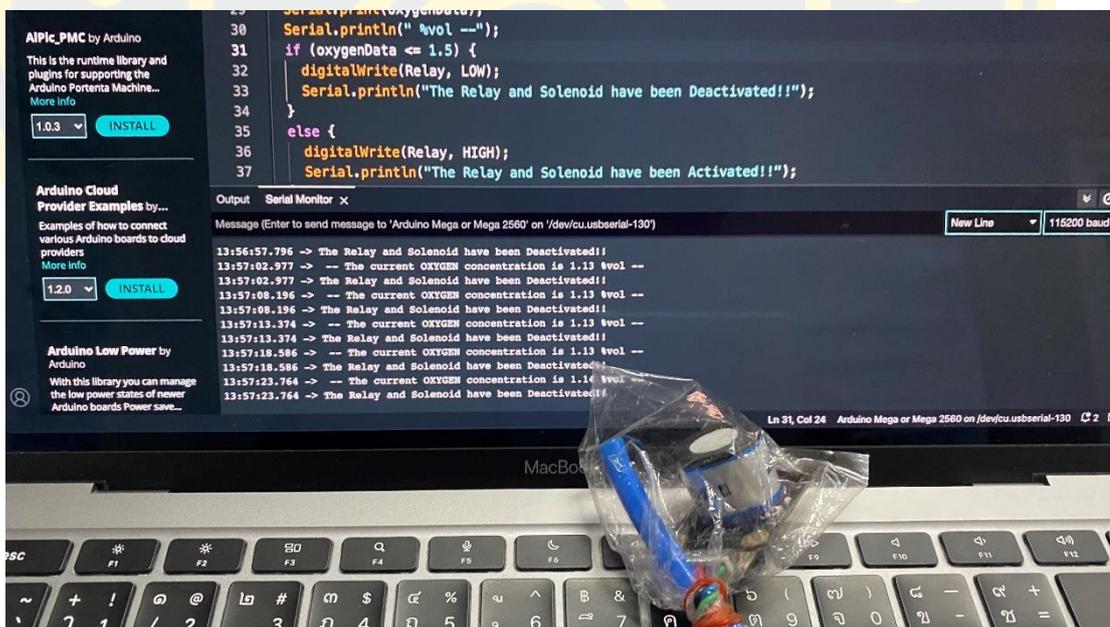


(ง)

ภาพที่ ก-6 ขนาดกรวยจากโปรแกรม AutoCAD (ก) เส้นรอบวงด้านในปากกรวย (ข) เส้นรอบวงด้านนอกปากกรวย (ค) เส้นรอบวงด้านในฐานกรวย (ง) เส้นรอบวงด้านนอกฐานกรวย



ภาพที่ ก-7 ตัวอย่างการปรับสภาพขานอ้อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 M



ภาพที่ ก-8 การสอบเทียบแลตทดสอบการตรวจวัดก๊าซออกซิเจนของเซ็นเซอร์

Bruker MALDI Biotyper Identification Results



Run Info:

Run Identifier: 240222-1619-1019595
Comment: Aj yanisa
Operator: Admin@FLEX-PC
Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337
Number of Tests: 9
Type: Standard
BTS-QC: not present
BTS-QC Position:
Instrument ID: 604674.03320
Server Version: 4.1.100 (PYTH) 174 2019-06-158_01-16-09

Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
C2 (+++)(A)	B.subtilis (Standard)	Bacillus amyloliquefaciens ssp plantarum	2.06	Bacillus amyloliquefaciens	1.97
C3 (+++)(A)	60/12 (Standard)	Paraclostridium bifermentans	2.02	Paraclostridium bifermentans	2.00
C4 (+++)(A)	60/25 (Standard)	Bacillus cereus	2.29	Bacillus cereus	2.16
C5 (+++)(A)	W (Standard)	Paraclostridium bifermentans	2.07	Paraclostridium bifermentans	2.02
C6 (+++)(A)	3/3 (Standard)	Paraclostridium bifermentans	2.11	Paraclostridium bifermentans	2.11
C7 (+++)(A)	45-21 (Standard)	Paraclostridium bifermentans	2.18	Paraclostridium bifermentans	2.11
C8 (-)(C)	3/5 (Standard)	No Organism Identification Possible	1.33	No Organism Identification Possible	1.29

Result overview table--continued on next page

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Result overview table--continued from previous page

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>C9</u> (+++)(A)	60/17 (Standard)	<u>Bacillus cereus</u>	<u>2.31</u>	<u>Bacillus cereus</u>	<u>2.18</u>
<u>C10</u> (+)(B)	45/20 (Standard)	Paraclostridium bifermentans	<u>1.95</u>	Paraclostridium bifermentans	<u>1.90</u>

Matching Hints

Matched Pattern	Comment
Bacillus amyloliquefaciens DSM 1067 DSM	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus amyloliquefaciens ssp amyloliquefaciens CICC 10075 CICC	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus amyloliquefaciens ssp amyloliquefaciens CICC 10079 CICC	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus amyloliquefaciens ssp plantaru m CICC 20037 CICC	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus amyloliquefaciens ssp plantaru m CICC 23985_b CICC	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cereus 4080 LBK	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cereus 994000168 LBK	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cereus CICC 23949 CICC	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cereus DSM 31T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus cytotoxicus 1Z46778_1e MVD	The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
<i>Matching Hints table--continued on next page</i>	

<i>Matching Hints table--continued from previous page</i>	
Matched Pattern	Comment
Bacillus cytotoxicus DSM 22905T DSM	The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus mojavensis DSM 9205T DSM	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus mycooides DSM 11821T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycooides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus mycooides DSM 11821T DSM_2	Bacillus anthracis, cereus, mycooides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus mycooides DSM 2048T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycooides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus pseudomycooides DSM 12442T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycooides, pseudomycooides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus subtilis DSM 5611 DSM	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus subtilis ssp subtilis CICC 23950 CICC	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 10T DSM	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 5660 DSM	is a member of Bacillus subtilis group. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
<i>Matching Hints table--continued on next page</i>	

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

<i>Matching Hints table--continued from previous page</i>	
Matched Pattern	Comment
Bacillus thuringiensis DSM 2046T DSM	Bacillus anthracis, cereus, mycoides, pseudomycoides and thuringiensis are closely related and members of the Bacillus cereus group. In particular Bacillus cereus spectra are very similar to spectra from Bacillus anthracis. Bacillus anthracis is not included in the MALDI Biotyper database. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional. The quality of spectra (score) depends on the degree of sporulation: Use fresh material.
Burkholderia cenocepacia LMG 12614 HAM	is a member of Burkholderia cepacia complex
Burkholderia cepacia LMG 2161 HAM	is a member of Burkholderia cepacia complex
Enterocloster aldenensis DSM 19262T DSM	synonym of Clostridium aldenense
Neisseria meningitidis 24086406 MLD	Non-pathogenic Neisseria species could be misidentified as Neisseria meningitidis. For differentiation an adequate identification method has to be selected by an experienced professional.
Pseudomonas migulae CIP 105470T HAM	is a member of Pseudomonas fluorescens group

Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 1

Sample Name: C2
Sample Description:
Sample ID: B.subtilis
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.347
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoExecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): A
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Bacillus amyloliquefaciens ssp plantarum CICC 20037 CICC	2.06	279145
2 (+)	Bacillus amyloliquefaciens ssp amyloliquefaciens CICC 10079 CICC	1.97	1390
3 (+)	Bacillus amyloliquefaciens ssp amyloliquefaciens CICC 10075 CICC	1.95	1390
4 (+)	Bacillus amyloliquefaciens ssp plantarum CICC 23985 b CICC	1.94	279145
5 (-)	Bacillus amyloliquefaciens DSM 1067 DSM	1.65	1390
6 (-)	Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 10T DSM	1.64	1423
7 (-)	Bacillus mojavenensis DSM 9205T DSM	1.61	72360
8 (-)	Bacillus subtilis ssp subtilis CICC 23950 CICC	1.58	1423
9 (-)	Bacillus subtilis DSM 5611 DSM	1.56	1423
10 (-)	Bacillus subtilis ssp subtilis DSM 5660 DSM	1.56	1423

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 2

Sample Name: C3
Sample Description:
Sample ID: 60/12
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.348
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoExecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): A
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 13560 DSM	2.02	1490
2 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 631 DSM	2.00	1490
3 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 14991T DSM	1.93	1490
4 (+)	Paraclostridium bifermentans 2273_CCUG 35297 BOG	1.80	1490
5 (+)	Paraclostridium bifermentans 1027_NCTC 1341 BOG	1.79	1490
6 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM_2	1.71	1490
7 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM	1.71	1490
8 (-)	Paraclostridium bifermentans CCUG 9279 CCUG	1.58	1490
9 (-)	Paraclostridium bifermentans 2274_CCUG 35556 A BOG	1.56	1490
10 (-)	Paraclostridium bifermentans AB_2 LGL	1.52	1490

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 3

Sample Name: C4
Sample Description:
Sample ID: 60/25
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.350
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoXecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): A
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Bacillus cereus CICC 23949 CICC	2.29	1396
2 (+++)	Bacillus cereus 994000168 LBK	2.16	1396
3 (+++)	Bacillus cereus 4080 LBK	2.12	1396
4 (+++)	Bacillus cereus DSM 31T DSM	2.10	1396
5 (+)	Bacillus mycooides DSM 11821T DSM	1.93	1405
6 (+)	Bacillus mycooides DSM 2048T DSM	1.89	1405
7 (+)	Bacillus mycooides DSM 11821T DSM_2	1.78	1405
8 (-)	Bacillus pseudomycooides DSM 12442T DSM	1.64	64104
9 (-)	Bacillus cytotoxicus DSM 22905T DSM	1.59	1386
10 (-)	Bacillus thuringiensis DSM 2046T DSM	1.52	1428

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 4

Sample Name: C5
Sample Description:
Sample ID: W
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.351
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoXecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): A
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 13560 DSM	2.07	1490
2 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 631 DSM	2.02	1490
3 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 14991T DSM	1.96	1490
4 (+)	Paraclostridium bifermentans 1027_NCTC 1341 BOG	1.88	1490
5 (+)	Paraclostridium bifermentans 2273_CCUG 35297 BOG	1.85	1490
6 (+)	Paraclostridium bifermentans AB_2 LGL	1.83	1490
7 (+)	Paraclostridium bifermentans CCUG 9279 CCUG	1.74	1490
8 (-)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM_2	1.60	1490
9 (-)	Paraclostridium bifermentans 2274_CCUG 35556 A BOG	1.58	1490
10 (-)	Paeniclostridium sordellii CCUG 6329 CCUG	1.54	1505

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 5

Sample Name: C6
Sample Description:
Sample ID: 3/3
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.352
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoExecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): A
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 631 DSM	2.11	1490
2 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 13560 DSM	2.11	1490
3 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 14991T DSM	1.96	1490
4 (+)	Paraclostridium bifermentans AB_2 LGL	1.89	1490
5 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM_2	1.89	1490
6 (+)	Paraclostridium bifermentans 1027_NCTC 1341 BOG	1.85	1490
7 (+)	Paraclostridium bifermentans CCUG 9279 CCUG	1.83	1490
8 (+)	Paraclostridium bifermentans 2273_CCUG 35297 BOG	1.75	1490
9 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM	1.71	1490
10 (-)	Paeniclostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG	1.54	1505

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 6

Sample Name: C7
Sample Description:
Sample ID: 45-21
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.353
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoXecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): A
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 13560 DSM	2.18	1490
2 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 631 DSM	2.11	1490
3 (+++)	Paraclostridium bifermentans DSM 14991T DSM	2.01	1490
4 (+)	Paraclostridium bifermentans 2273_CCUG 35297 BOG	1.86	1490
5 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM	1.84	1490
6 (+)	Paraclostridium bifermentans CCUG 9279 CCUG	1.82	1490
7 (+)	Paraclostridium bifermentans 1027_NCTC 1341 BOG	1.77	1490
8 (+)	Paraclostridium bifermentans 2274_CCUG 35556 A BOG	1.73	1490
9 (-)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM_2	1.55	1490
10 (-)	Paraclostridium bifermentans AB_2 LGL	1.53	1490

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 7

Sample Name: C8
Sample Description:
Sample ID: 3/5
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.355
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoExecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): C
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (-)	Burkholderia cnoocepacia LMG 12614 HAM	1.33	95486
2 (-)	Blautia coccoides 1035_NCTC 11035T BOG	1.29	1532
3 (-)	Staphylococcus xylosus DSM 6179 DSM	1.27	1288
4 (-)	Brevundimonas vesicularis DSM 7226T HAM	1.24	41276
5 (-)	Pseudomonas migulae CIP 105470T HAM	1.20	78543
6 (-)	Neisseria meningitidis 24086406 MLD	1.20	487
7 (-)	Parabacteroides goldsteinii CCUG 63736 CCUG	1.18	328812
8 (-)	Burkholderia cepacia LMG 2161 HAM	1.17	292
9 (-)	Glaessarella parasuis ISU 40736 ISUV	1.16	738
10 (-)	Enterocloster aldenensis DSM 19262T DSM	1.16	358742

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 8

Sample Name: C9
Sample Description:
Sample ID: 60/17
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.356
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoExecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): A
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Bacillus cereus CICC 23949 CICC	2.31	1396
2 (+++)	Bacillus cereus DSM 31T DSM	2.18	1396
3 (+++)	Bacillus cereus 4080 LBK	2.10	1396
4 (+++)	Bacillus cereus 994000168 LBK	2.08	1396
5 (+)	Bacillus mycooides DSM 11821T DSM_2	1.93	1405
6 (+)	Bacillus mycooides DSM 11821T DSM	1.84	1405
7 (+)	Bacillus pseudomycooides DSM 12442T DSM	1.74	64104
8 (-)	Bacillus thuringiensis DSM 2046T DSM	1.55	1428
9 (-)	Bacillus cytotoxicus 1Z46778_1c MVD	1.54	1386
10 (-)	Bacillus mycooides DSM 2048T DSM	1.51	1405

Run Identifier: 240222-1619-1019595

Run Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.337

Sample 9

Sample Name: C10
Sample Description:
Sample ID: 45/20
Sample Creation Date/Time: 2024-02-22T16:25:09.358
Sample Type: Standard
Identification Method: MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1
Preprocessing Method: MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1
ACQ Method: D:\Methods\flexControlMethods\MBT_FC.par
AutoExecute Method: MBT_AutoX
Consistency Category (based on 2 best matches): B
Applied Taxonomy Tree: Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 631 DSM	1.95	1490
2 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 13560 DSM	1.90	1490
3 (+)	Paraclostridium bifermentans 1027_NCTC 1341 BOG	1.89	1490
4 (+)	Paraclostridium bifermentans DSM 14991T DSM	1.86	1490
5 (+)	Paraclostridium bifermentans 2273_CCUG 35297 BOG	1.83	1490
6 (-)	Paraclostridium bifermentans CCUG 9279 CCUG	1.63	1490
7 (-)	Paraclostridium bifermentans 2274_CCUG 35556 A BOG	1.46	1490
8 (-)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM_2	1.46	1490
9 (-)	Paraclostridium bifermentans DSM 630 DSM	1.43	1490
10 (-)	Paeniclostridium sordellii 1070_ATCC 9714T BOG	1.35	1505

Report created at 2024-02-22T18:36:59

Research Use Only

Page 15 of 15

ภาพที่ ก-9 ผลการตรวจแบคทีเรียด้วยเทคนิค เทคนิคมาลดี-ทอป เอฟ เอ็มเอส

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	วิศวกร กิ่งสีดา มะธิมาปะเข
วัน เดือน ปี เกิด	13 ตุลาคม 2540
สถานที่เกิด	หมู่บ้านหล่งประดู่ ต.หล่งประดู่ อ.ห้วยแถลง จ.นครราชสีมา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	55/30 ซ.ภิรมย์ชล ต.แสนสุข อ.เมืองชลบุรี จ.ชลบุรี 20130
ตำแหน่งและประวัติการ ทำงาน	(2560-2562) เจ้าหน้าที่บริการฉุกเฉินการแพทย์ (2561-2561) ผู้ช่วยวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ (2562-2562) เจ้าหน้าที่สิ่งแวดล้อม บริษัท อ่าพลฟูดส์ โพรเซสซิง จำกัด
ประวัติการศึกษา	(2560) ประกาศนียบัตรพนักงานฉุกเฉินการแพทย์ (2559-2562) วท.บ. สาขาการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
รางวัลหรือทุนการศึกษา	(2567) K. Eakkachai, M. Vissavakawn, D. Wachira, L. Yanisa, An Effective Condition Control System and Sample Collector with an IoT System-Based Arduino for Improving Biobutanol Production, IEEE Sensors Journal Manuscript No. Sensors-71380- 2024 (Under review process) (2567) K. Eakkachai, M. Vissavakawn, M. Meta, S. Apichaya, C. Pisak, S. Mattana, A semi-automated and Effective Photobioreactor with Arduino based for Improving Microalgae Cultivation Process: Feasibility and Effectiveness, IEEE Sensors Journal Manuscript No. Sensor-71047-2024 (Under review process) (2567) M. Vissavakawn and L. Yanisa, Biobutanol Feedstock Enhancement: Extract Fermentable sugar from Sugarcane Bagasse via Alkaline Pretreatment and Steam Hydrolysis (EES- 225), The 8th International Conference on Energy and

Environmental Science (ICEES2024), Chongqing, China.

Publication in Environmental Science and Engineering, e-ISSN:
1863-5539.

(2567) รางวัลการแข่งขัน 3 Minutes Thesis (3MT) Graduate School
BUU ลิขสิทธิ์ The University of Queensland, Australia.

(2567) อนุสิทธิบัตร เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติสำหรับกระบวนการผลิต
ทางชีวภาพ (เลขที่คำขอ 2403000250)

(2567) ทุนนำเสนอผลงานทางวิชาการ ณ สาธารณรัฐประชาชนจีน
(ประกาศคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ 032/2567 ประจำปี
งบประมาณ พ.ศ.2567 ครั้งที่ 2)

(2567) ทุนเข้าร่วมงานประชุมวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
(ประกาศบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ 0000/2567)

(2566) ทุนสนับสนุนงานวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย (ประกาศบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ 0140/2566)

(2565) ทุนส่งเสริมและยกระดับคุณภาพบัณฑิตศึกษาเพื่อพัฒนาผู้ช่วย
นักวิจัยที่ยั่งยืน คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปี
งบประมาณ พ.ศ.2565 (อว.8116/760)