ศักยภาพการผลิตแก๊สมีเทนของใบอ้อยและกิจกรรมจำเพาะการผลิตแก๊สมีเทนของกลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศในมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมน

Biochemical Methane Potential of Sugarcane Leaves and the Specific Methanogenic Activity of Anaerobic Mixed Cultures in Cow Dung and Rumen Fluid

อรณัฐ สุพันธมาตย์ (Oranut Suphantamat)* ดร.อลิศรา เรืองแสง (Dr.Alissara Reungsang)**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของใบอ้อยสำหรับการผลิตแก๊สมีเทนโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศในมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมน และเพื่อศึกษากิจกรรมจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทน ผลการทดลองพบว่า ใบอ้อยมีศักยภาพในการใช้เป็นสับสเตรทสำหรับผลิตแก๊สมีเทน และการใช้มูลโคร่วมกับของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถเพิ่มผลผลิตแก๊สมีเทนจากใบอ้อยได้เป็นอย่างดี โดยชุดการทดลองมูลโคเจือจางและของเหลวจากกระเพาะรูเมนร้อยละ 10 เป็นชุดการทดลองที่มีการผลิตมีแก๊สเทน (2,629 mL-CH_4/L) และค่าผลได้แก๊สมีเทนสูงที่สุด (262.91 mL-CH_4/g-VS) และจากการหากิจกรรมจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทนพบว่ามูลโคเจือจางและของเหลวจากกระเพาะรูเมนร้อยละ 10 (10RF) มีกิจกรรมจำเพาะของจุลินทรีย์ในกลุ่มไฮโดรไลติกและกลุ่มอะซิโตคลาสติกสูงสุด

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the potential of sugarcane leaves to produce methane by anaerobic mixed cultures in cow dung and rumen fluid. Additionally, the specific methanogenic activity of the anaerobic mixed cultures was conducted. Results revealed that sugarcane leaves have the potential to be used as the substrate to produce methane. Diluted cow dung and the optimum percentage of rumen fluid enhanced the methane production from sugarcane leaves. Methane production from sugarcane leaves by cow dung and 10% rumen fluid showed the maximum methane production and methane yield of 2629 mL-CH_4/L and 262.91 mL-CH_4/g-VS, respectively. Analysis of specific methanogenic activity of anaerobic mixed cultures in cow dung and 10% rumen fluid exhibited the maximum specific activity of hydrolytic bacteria and acetoclastic bacteria.

คำสำคัญ: การย่อยแบบไร้อากาศ หัวเชื้อผลิตแก๊สมีเทน ใบอ้อย

Keywords: Anaerobic digestion, Methane inoculum, Sugarcane leaves

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**ศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

แก๊สชีวภาพเป็นพลังงานทดแทนที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย แก๊สชีวภาพสามารถผลิตได้จากของเสียทางการเกษตรและมูลสัตว์โดยกระบวนการย่อยแบบไร้อากาศ องค์ประกอบหลักของแก๊สชีวภาพคือแก๊สมีเทนซึ่งเป็นแก๊สที่ติดไฟได้จึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ดี ประโยชน์ของแก๊สชีวภาพ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้เพื่อให้ความร้อน ใช้ในการผลิตกระแสไฟฟ้า ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ และใช้ทดแทนแก๊สหุงต้ม เป็นต้น (Kapoor et al., 2020) นอกจากนี้ กระบวนการผลิตแก๊สชีวภาพสามารถบำบัดค่าความต้องการของออกซิเจนทางเคมี (Chemical oxygen demand: COD) ของของเสียที่นำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตแก๊สชีวภาพได้อีกด้วย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งประชากรกว่าร้อยละ 60 ทำอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก (โศภชา, 2560) ทำให้หลังกระบวนการเก็บเกี่ยวมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือมวลชีวภาพประเภทลิกโนเซลลูโลสที่เหลือตกค้างหลังกระบวนการเก็บเกี่ยวเป็นจำนวนมาก ในจังหวัดขอนแก่นมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากเป็นอันดับ 3 ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีปริมาณอ้อยทั้งหมดถึง 8,231,437 ตันต่อปี (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2561) ดังนั้น วัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการเก็บเกี่ยวอ้อยโดยเฉพาะใบอ้อย (Sugarcane leaves) จึงเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีปริมาณมากในจังหวัดขอนแก่น ใบอ้อยถูกกำจัดด้วยการเผา ส่งผลให้เกิดแก๊สเรือนกระจกรวมถึงฝุ่นควันที่เป็นพิษต่อสุขภาพของประชาชน ใบอ้อยจัดเป็นวัสดุเศษเหลือที่เป็นมวลชีวภาพประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic biomass) มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Lee et al., 2008) จึงสามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ไร้อากาศเปลี่ยนไปเป็นแก๊สชีวภาพ งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาศักยภาพการผลิตแก๊สมีเทนจากมวลชีวภาพประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น Gallegos et al. (2017) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตแก๊สมีเทนจากฟางข้าว โดยฟางข้าวขนาด 0.2 เซนติเมตร ให้ผลได้แก๊สมีเทนสูงที่สุด เท่ากับ 224.0 mL-CH_4/g- volatile solid (VS) นอกจากนี้งานวิจัยของ Sthembiso (2018) ได้ศึกษาผลของการผลิตแก๊สชีวภาพจากชานอ้อยบดผสมกับมูลวัวในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่า การหมักมูลวัว 4.6 กรัม ร่วมกับใบอ้อย 5.7 กรัม ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 และความชื้นเท่ากับร้อยละ 80 ให้ผลได้มีเทนสูงสุดเท่ากับ 28.8 mL-CH_4/g-VS งานวิจัยของ Huang et al. (2020) ได้รายงานการผลิตแก๊สชีวภาพจากใบอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพโดยการลดขนาดและใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่าให้ผลผลิตมีเทนสูงสุดเท่ากับ 141.0 mL-CH_4/g-total solid (TS) ผลจากการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของมวลชีวภาพประเภทลิกโนเซลลูโลสในการนำไปผลิตแก๊สมีเทน ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจนำใบอ้อยมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตแก๊สมีเทน ซึ่งนอกจากจะได้แก๊สมีเทนเป็นพลังงานทดแทนแล้ว ยังจะช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการเผาใบอ้อยอีกด้วย

งานวิจัยส่วนใหญ่เกี่ยวกับการผลิตแก๊สมีเทนจากมวลชีวภาพประเภทลิกโนเซลลูโลส มุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับการปรับสภาพสับสเตรทด้วยวิธีการต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม หัวเชื้อที่ใช้สำหรับผลิตแก๊สมีเทนซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตแก๊สชีวภาพ ยังไม่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายนัก หัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตแก๊สชีวภาพจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนไฮโดรไลสิส (Hydrolysis) ขั้นตอนผลิตกรด (Acidogenesis) และขั้นตอนผลิตแก๊สมีเทน (Methanogenesis) ของกระบวนการการย่อยสลายแบบไร้อากาศ (Ozbayram et al., 2018) ในงานวิจัยนี้ได้นำมูลโค (Cow manure) มาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตแก๊สมีเทนจากใบอ้อย เนื่องจาก มูลโคนั้นประกอบด้วยเซลลูโลไลติกแบคทีเรีย (Cellulolytic bacteria) ซึ่งสามารถใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตแก๊สมีเทนได้เป็นอย่างดี (Jin et al., 2018) ในรายงานการวิจัยของ Ginjira et al. (2013) พบว่ามูลโคมีกลุ่มจุลินทรีย์ที่โดดเด่น คือ แบคทีเรียเฟอร์มิคิวเทส (Firmicutes bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียในวงศ์ Ruminococcaceae และ Clostridiaceae ที่มีเมแทบอลิซึมในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตได้ นอกจากนั้นแล้ว ยังมีรายงานการใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมน (Rumen fluid: RF) ของโค เพื่อเป็นหัวเชื้อในการผลิตแก๊สชีวภาพอีกด้วย เนื่องจาก กลุ่มจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของโคนั้นมีเมแทบอลิซึมในการ

ย่อยสลายวัสดุลิกเซลลูโลสได้ นอกจากนี้ การหมักวัสดุลิกโนเซลลูโลสภายในทางเดินอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โคและแพะ เป็นต้น มีสภาวะแวดล้อมในกระเพาะรูเมน เช่น ค่าความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิ และศักย์ไฟฟ้ารีดอกซ์ใกล้เคียงกับกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ (Ozbayram et al., 2018; Sholahuddin et al., 2021) ตัวอย่างของงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ของเหลวจากกระเพาะโคร่วมกับหัวเชื้อชนิดอื่น ๆ เช่น การใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคเป็นหัวเชื้อในการผลิตแก๊สมีเทนจากมูลโค พบว่า การใช้มูลโคและของเหลวจากกระเพาะโคที่อัตราส่วน 1:1 นั้นให้ผลผลิตของแก๊สชีวภาพเท่ากับ 191.38 mL/g-VS ซึ่งสูงกว่าการไม่ใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคเป็นหัวเชื้อถึงสองเท่า (Budiyono et al., 2013) งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการใช้มูลโคร่วมกับของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคเป็นหัวเชื้อในกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศเพื่อผลิตแก๊สมีเทนโดยใช้ใบอ้อยเป็นวัตถุดิบ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อศึกษาศักยภาพของใบอ้อยสำหรับการผลิตแก๊สมีเทนโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศในมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมน และศึกษากิจกรรมจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทน (specific methanogenic activity) ของกลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศในมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาศักยภาพการผลิตแก๊สมีเทนจากใบอ้อยโดยมูลโคร่วมกับของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโค
2. เพื่อศึกษากิจกรรมจำเพาะการผลิตแก๊สมีเทนของกลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศในมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโค

วิธีการวิจัย

การเตรียมวัตถุดิบและหัวเชื้อผลิตแก๊สมีเทน

ใบอ้อยสายพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากไร่อ้อยของเกษตรกร อำเภอบ้านฝาง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งมีอายุขณะเก็บเกี่ยวประมาณ 12 เดือน ใบอ้อยถูกเตรียมโดยการนำไปอบในเตาอบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 10 จากนั้นสับใบอ้อยด้วยมีดพร้าให้มีขนาดประมาณ 10 - 15 เซนติเมตร ก่อนบดด้วยเครื่องบดละเอียด (บริษัท เซ็นทรัลแล็บ จำกัด, ประเทศไทย) แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนเบอร์ ¼ (6.30 มิลลิเมตร) และตะแกรงร่อนเบอร์ 6 (3.35 มิลลิเมตร) เพื่อให้ได้ใบอ้อยที่มีขนาดเล็กกว่า 3.35 มิลลิเมตร ใบอ้อยที่บดเสร็จแล้วถูกเก็บรักษาในกล่องที่ปิดสนิท เพื่อป้องกันความชื้นและการปนเปื้อน

มูลโคและของเหลวกระเพาะรูเมนได้รับจากโคสายพันธุ์ Holstein Friesians จากฟาร์มของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อายุโคประมาณ 10 ปี มีการเลี้ยงโดยใช้หญ้าและฟางเป็นอาหาร ตัวอย่างถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้ในการทดลอง

การเตรียมหัวเชื้อผลิตแก๊สมีเทนทำโดยการนำมูลโคผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 และกรองผ่านผ้าขาวบางตะแกรงร่อนเบอร์ 10 เพื่อเอาเศษมูลโคที่มีขนาดใหญ่ออก จากนั้นนำไป degas โดย self fermentation โดยการเติมลงในถังขนาด 6 ลิตร ปริมาตรทำงาน 3 ลิตร ทำให้อยู่ในสภาวะไร้อากาศด้วยการฟลัชแก๊สไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน

การศึกษาศักยภาพการผลิตแก๊สมีเทนของใบอ้อย

การศึกษาศักยภาพการผลิตแก๊สมีเทนจากใบอ้อยโดยใช้มูลโคเป็นหัวเชื้อร่วมกับการเติมของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโค ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการทดลองในขวดซีรั่มขนาด 120 มิลลิลิตร ปริมาตรการทำงาน 60 มิลลิลิตร โดยอัตราส่วนของใบอ้อยต่อหัวเชื้อเท่ากับ 1:3 (g-VS/g-VS) หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้มีปริมาตรการทำงานเท่ากับ 60 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นผสมกับของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโค (RF) ที่ความเข้มข้นของของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคร้อยละ 0 (0RF) 10 (10RF), 20 (20RF), 30 (30RF) และ 40 (40RF) จากนั้นปรับค่า pH เท่ากับ 7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 5 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ปิดฝาด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียม ปรับให้เป็นสภาวะไร้อากาศโดยการพ่นแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ทำการทดลอง 4 ซ้ำ หมักเป็นเวลา 50 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาตรและองค์ประกอบของแก๊สชีวภาพ และเก็บตัวอย่างหลังสิ้นสุดกระบวนการหมัก เพื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid: TS), VS และ pH ชุดการทดลองที่ให้ผลได้แก๊สมีเทนสูงที่สุดถูกนำไปใช้ในการศึกษากิจกรรมจำเพาะการผลิตแก๊สมีเทนของกลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศในมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคต่อไป

การศึกษากิจกรรมจำเพาะการผลิตแก๊สมีเทนของกลุ่มจุลินทรีย์ไร้อากาศในมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค

หัวเชื้อ (มูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค) ในชุดการทดลองที่ให้ผลได้แก๊สมีเทนสูงสุดได้ถูกนำไปทดสอบกิจกรรมจำเพาะการผลิตแก๊สมีเทนโดยใช้สับสเตรท ได้แก่ อะวิเซล (Avicel) กลูโคส (Glucose) กรดอะซิติก (Acetic acid) และเจลาติน (Gelatin) ทำการทดลองในขวดซีรั่มขนาด 120 มิลลิลิตร ปริมาตรทำงาน 60 มิลลิลิตร กำหนดให้ความเข้มข้นของสับสเตรท (g-COD) ต่อความเข้มข้นเริ่มต้นของหัวเชื้อผลิตแก๊สมีเทน (g-VS) ต่อ เท่ากับ 2:1 ชุดควบคุมมีเฉพาะกากตะกอน (ไม่มีการเติมสับสเตรท) ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 5 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ปิดฝาด้วยจุกยางและฝาอะลูมิเนียม ทำให้เป็นสภาวะไร้อากาศโดยการพ่นแก๊สโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยแต่ละชุดการทดลองจะทำทั้งหมด 4 ซ้ำ ติดตามผลการทดลองโดยวัดปริมาตรของแก๊ส และเก็บตัวอย่างแก๊สทุกวันเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแก๊ส

การวิเคราะห์ทางเคมี

ใบอ้อย ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค และมูลโค ได้ถูกนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้น ได้แก่ ค่า pH โดยของเหลวใช้ pH meter ในการวัด ส่วน pH ของใบอ้อยที่เป็นของแข็งจะใช้ใบอ้อยปริมาณ 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Sun et al. 2020) จากนั้นกรองตัวอย่างด้วยผ้าขาวบางแล้วจึงนำส่วนที่เป็นของเหลวไปวิเคราะห์ pH โดย pH meter ส่วนค่า TS, VS และเถ้า (Ash) ใช้วิธีมาตรฐาน (APHA, 1995) ในส่วนของหัวเชื้อได้วิเคราะห์ค่าของแข็งแขวนลอยทั้งหมด (Total Suspended Solids: TSS) และของแข็งแขวนลอยระเหยง่าย (Volatile Suspended Solids: VSS) ด้วยวิธีมาตรฐาน (APHA, 1995)

การวิเคราะห์ปริมาตรและองค์ประกอบของแก๊ส ปริมาตรของแก๊สจะถูกวัดด้วยกระบอกฉีดยาแก้ว (Wetted glass syringe) (Owen et al., 1979) และองค์ประกอบของแก๊สถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography: GC) รุ่น GC-2014 (Shimatdsu, Japan) โดยใช้แก๊สฮีเลี่ยมเป็นแก๊สตัวพา (Carrier gas) ใช้คอลัมน์ Shin carbon ตัวตรวจวัดชนิด Thermal Conductivity Detector (TCD) และอัตราการไหลของแก๊ส เท่ากับ 25 มิลลิเมตรต่อนาทีโดยมีอุณหภูมิในการดำเนินการของอินเจคเตอร์ คอลัมน์และตัวตรวจวัด เท่ากับ 70 80 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การคำนวณ

ก่อนที่จะนำปริมาตรของแก๊สมีเทนสะสมไปใช้กับสมการที่ 2 จะใช้ปริมาตรแก๊สมีเทนที่ผลิตได้ในแต่ละวันของแต่ละชุดการทดลองลบกับปริมาตรแก๊สมีเทนที่ผลิตได้ในแต่ละวันจากชุดควบคุมเพื่อให้ได้ปริมาตรแก๊สมีเทนที่แท้จริง จากนั้นจะคำนวณปริมาตรแก๊สมีเทนและปริมาตรแก๊สมีเทนสะสมโดยใช้สมการสมดุลมวล (Zheng และ Yu, 2005) ดังสมการที่ 1

$$V_{M,i} = V_{M,i-1} + V_M C_{M,i} - V_M C_{M,i-1} + V_{G,i} C_{M,i} - V_{G,i-1} C_{M,i} \quad (1)$$

สมการที่ 1 เป็นสมการสำหรับคำนวณปริมาตรแก๊สโดยสมมติว่าแก๊สนั้นผสมกันอย่างสมบูรณ์ และมีปริมาตรของแก๊สที่ผลิตได้ในช่วงเวลาต่าง ๆ สมการนี้จะแสดงความสัมพันธ์ของการผลิตแก๊สมีเทนกับเวลา โดยมีตัวแปรต่าง ๆ ดังนี้

$V_{M,i}$ คือ ปริมาตรของแก๊สมีเทนสะสม ณ เวลาปัจจุบัน (mL)

$V_{M,i-1}$ คือ ปริมาตรของแก๊สมีเทนสะสม ณ ช่วงเวลาก่อนหน้า (mL)

$V_{G,i}$ คือ ปริมาตรของแก๊สชีวภาพทั้งหมด ณ เวลาปัจจุบัน (mL)

$V_{G,i-1}$ คือ ปริมาตรของแก๊สชีวภาพทั้งหมด ณ ช่วงเวลาก่อนหน้า (mL)

V_M คือ ปริมาตรเฮดสเปซของขวดซีรั่ม (mL)

$C_{M,i}$ คือ สัดส่วนของแก๊สมีเทนในเฮดสเปซ ณ เวลาปัจจุบัน

$C_{M,i-1}$ คือ สัดส่วนของแก๊สมีเทนในเฮดสเปซ ณ ช่วงเวลาก่อนหน้า

การคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ของกระบวนการผลิตแก๊สมีเทนในกระบวนการหมักแบบกะ โดย Modified Gompertz model (Fan et al., 2008) ดังสมการที่ 2 เพื่อคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตแก๊สมีเทน เช่น ระยะปรับตัว อัตราการผลิตแก๊สมีเทนสูงสุด และปริมาตรแก๊สมีเทนสะสมสูงสุด โดยปริมาตรแก๊สมีเทนสะสมสูงสุดนั้นจะใช้ในการคำนวณผลได้ของแก๊สมีเทนดังสมการที่ 3

$$V_m(t) = V_{max} \exp\left\{- \exp\left[\frac{R_{max}\, e}{V_{max}}(\lambda - t)\right] + 1\right\} \quad (2)$$

V_m คือ ค่าปริมาตรแก๊สมีเทนสะสม (mL/L)

V_{max} คือ คือ ค่าปริมาตรแก๊สมีเทนสะสมสูงสุด (mL/L)

R_{max} คือ ค่าอัตราการผลิตแก๊สมีเทนสูงสุด (mL/L·day)

e คือ ค่าคงที่ เท่ากับ 2.718

t คือ ค่าระยะเวลาในการหมัก (day)

λ คือ ค่าระยะปรับตัวในการผลิตแก๊สมีเทน (Lag time) (day)

$$\text{ผลได้ของแก๊สมีเทน (mL-CH}_4\text{/g-VS)} = \frac{\text{ปริมาตรของมีเทนที่ถูกผลิตทั้งหมด (mL/L)}}{\text{น้ำหนักของสับสเตรทที่เติมลงไป (g-VS/L)}} \quad (3)$$

กิจกรรมจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทน (SMA) (g_{COD}-CH_4/g-VSS·day) = $\frac{PV}{RT} \times \frac{1000}{V_w} \times$ g-COD/$mole_{CH4}$ (4)

P คือ ความดันหนึ่งบรรยากาศ = 101.325 Pa

V คือ ปริมาตรแก๊สมีเทน (mL)

R คือ ค่าคงที่ = 8.314 m^3/K_{mol}

V คือ อุณหภูมิ (K)

V_w คือ ปริมาตรของน้ำหมักที่ใช้ในการทดลอง (mL)

g-COD/$mole_{CH4}$ คือ น้ำหนักของแก๊สมีเทนในหน่วยกรัม COD ต่อโมลของมีเทน = 16 g_{COD}/mol

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนใช้วิธี One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ค่า $p<0.05$) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างซ้ำโดยใช้ Duncan's multiple range tests โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for Social Science (SPSS)

ผลการวิจัย

องค์ประกอบของใบอ้อย ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค และมูลโค

pH ของใบอ้อย ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค และมูลโค มีค่า เท่ากับ 5.8, 6.4 และ 8.2 ตามลำดับ ค่า TS ของใบอ้อย ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค และมูลโค มีค่าเท่ากับ 944.5 g/kg, 56.43 g/L และ 41.71 g/kg ตามลำดับ ค่า VS ของใบอ้อย ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค และมูลโค มีค่าเท่ากับ 880.8 g/kg 23.42 g/L และ 220.7 g/kg ตามลำดับ เถ้าของใบอ้อย ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค และมูลโค มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 6.4, 2.34 และ 1.8 ค่า TSS และ VSS ของมูลโคมีค่าเท่ากับ 36.80 g/L และ 14.18 g/L ตามลำดับ

ผลของความเข้มข้นของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคต่อศักยภาพการผลิตแก๊สมีเทนจากใบอ้อย

ค่า pH เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตแก๊สมีเทนของชุดการทดลอง 0RF, 10RF, 20RF, 30RF และ40RF มีค่าเท่ากับ 7.40, 7.48, 7.27, 7.20 และ 7.16 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากค่า pH เริ่มต้น เนื่องจากมูลโคมีแอมโมเนียซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) (Zhang et al., 2013) จึงทำให้ค่า pH ในกระบวนการหมักไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองพบว่า ค่า pH มีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาณของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคมีจุลินทรีย์กลุ่มไฮโดรไลติกแบคทีเรีย (Hydrolytic bacteria) ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acid) ผ่านกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ (Follno et al. 2021) ส่งผลให้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค ค่า pH ของชุดการทดลอง 20RF, 30RF และ 40RF มีค่าลดลง โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค (0RF) และชุดการทดลองที่มีของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคในปริมาณน้อย (10RF)

การเติมของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคที่ความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลต่อระยะปรับตัว (lag phase) ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยชุดการทดลอง 30RF มีระยะปรับตัวสั้นที่สุด คือ 1.40 ± 0.54 วัน เมื่อเทียบกับชุดการทดลอง 0RF ซึ่งมีระยะปรับตัวเท่ากับ 2.45 ± 0.55 วัน พบว่าระยะปรับตัวของชุดการทดลองทั้งสองชุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคที่ความเข้มข้นสูงอาจจะมีจุลินทรีย์ที่ผลิตแก๊สมีเทนมากกว่าที่ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคความเข้มข้นต่ำ

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบปริมาตรแก๊สมีเทนที่สะสมสูงสุด อัตราการผลิตแก๊สมีเทนที่สูงที่สุด ระยะปรับตัวและผลได้มีเทนของแต่ละชุดการทดลองที่ได้จากการคำนวณโดยดัดแปรงจากสมการ Gompertz และมีการวิเคราะห์ความแปรปรวนใช้วิธี One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างซ้ำโดยใช้ Duncan's multiple range tests

ชุดการทดลอง	ปริมาตรแก๊สมีเทนสะสม (mL-CH_4/L)	อัตราการผลิตแก๊สมีเทน (mL-CH_4/·L·day)	ระยะปรับตัว (วัน)	ผลผลิตแก๊สมีเทน (mL-CH_4/g-ใบอ้อย)	ผลได้แก๊สมีเทน (mL-CH_4/g-VS)	R^2******
0RF*	2,115.41 ± 152.79^{a}	5.39 ± 0.15^{e}	2.45 ± 0.55^{gi}	185.65 ± 13.48^{k}	211.54 ± 15.28^{n}	0.9923
10RF**	2,629.07 ± 59.46^{c}	7.53 ± 0.56^{d}	3.43 ± 0.49^{h}	231.98 ± 5.25^{j}	262.91 ± 5.95^{m}	0.9924
20RF***	1,829.79 ± 24.82^{b}	5.58 ± 0.14^{e}	3.11 ± 0.07^{gh}	161.45 ± 2.19^{l}	182.98 ± 2.48^{o}	0.9894
30RF****	2,227.42 ± 147.89^{a}	7.82 ± 0.66^{d}	1.40 ± 0.54^{f}	196.54 ± 13.05^{k}	222.74 ± 14.79^{n}	0.9883
40RF*****	1,769.37 ± 63.96^{b}	5.21 ± 0.62^{e}	2.23 ± 0.34^{i}	156.12 ± 5.64^{l}	176.94 ± 6.40^{o}	0.9902

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$)

* 0RF หมายถึง ชุดการทดลองที่ใช้มูลโคเจือจางเป็นหัวเชื้อและใช้ใบอ้อยเป็นสับสเตรท

** 10RF หมายถึง ชุดการทดลองที่ใช้มูลโคเจือจางและใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค ร้อยละ 10 เป็นหัวเชื้อ

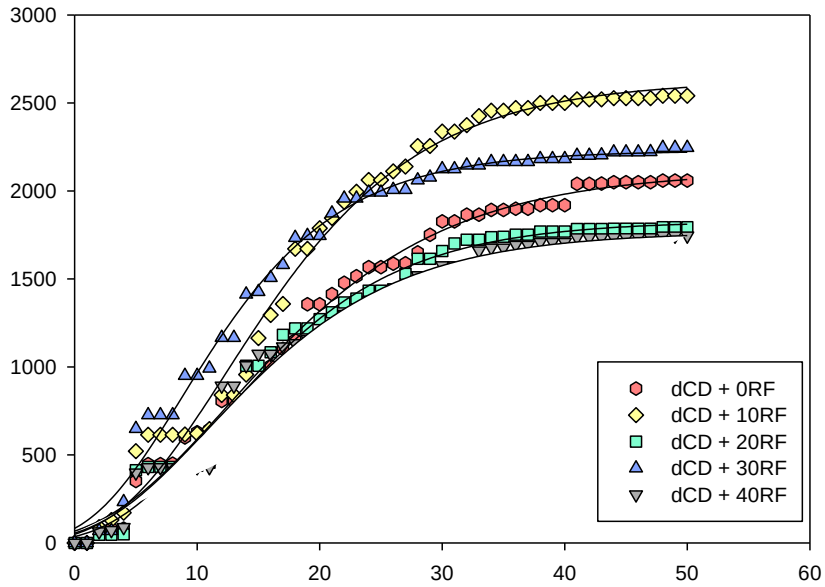
*** 20RF หมายถึง ชุดการทดลองที่ใช้มูลโคเจือจางและใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค ร้อยละ 20 เป็นหัวเชื้อ

**** 30RF หมายถึง ชุดการทดลองที่ใช้มูลโคเจือจางและใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค ร้อยละ 30 เป็นหัวเชื้อ

***** 40RF หมายถึง ชุดการทดลองที่ใช้มูลโคเจือจางและใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค ร้อยละ 40 เป็นหัวเชื้อ

******R^2 หมายถึง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของตัวแปร

ในส่วนของผลการทดลองของปริมาตรแก๊สมีเทน (รูปที่ 1) พบว่าชุดการทดลอง 40RF ให้ค่าปริมาตรแก๊สมีเทนสะสมน้อยที่สุด (1,769.37 ± 63.96 mL-CH_4/L) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมของเหลวกระเพาะรูเมนที่ความเข้มข้นที่สูงมีสัดส่วนที่ไม่เหมาะสมต่อสับสเตรทเพื่อผลิตแก๊สมีเทน (substrate to inoculum ไม่เหมาะสม) จากผลการทดลองพบว่าชุดการทดลอง 10RF เป็นชุดการทดลองที่เหมาะสมที่สุดในการส่งเสริมประสิทธิภาพการผลิตแก๊สมีเทน โดยมีค่าปริมาตรแก๊สมีเทนสะสมมากที่สุดเท่ากับ 2,629.07 mL-CH_4/L



รูปที่ 1 ปริมาตรมีเทนสะสมของการผลิตแก๊สมีเทนจากใบอ้อยโดยใช้มูลวัวเป็นหัวเชื้อร่วมกับของเหลวจากกระเพาะรูเมนโค ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคที่ร้อยละ 0 (0RF), 10 (10RF), 20 (20RF), 30 (30RF), 40 (40RF) ซึ่งค่าปริมาตรแก๊สมีเทนสะสมได้รับจากการคำนวณโดยดัดแปลงจากสมการ Gompertz

ความเข้มข้นของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคที่ร้อยละ 10 (10RF) ให้ผลได้แก๊สมีเทนสูงถึง 262.91 ± 5.95 mL-CH_4/g-VS และความเข้มข้นของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคที่ร้อยละ 40 (40RF) ให้ผลได้แก๊สมีเทนต่ำที่สุด เท่ากับ 172.94 ± 6.40 mL-CH_4/g-VS ซึ่งชุดการทดลองทั้งสองนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคเป็นร้อยละ 40 มีผลให้ผลได้แก๊สมีเทนลดลง จากผลการทดลองอาจอธิบายได้ว่าที่ความเข้มข้นของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคร้อยละ 40 นั้น มีปริมาณจุลินทรีย์สูงที่สุดโดยเฉพาะกลุ่มเซลลูโลติกแบคทีเรีย(Cellulolytic bacteria) (Bayané and Guiot, 2011) ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสทำให้สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นไฮโดรไลสิสซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับการผลิตแก๊สชีวภาพจากชีวมวล และมีกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มอะซิโดเจน (Acidogen) ในปริมาณที่สูงโดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเปลี่ยนสารโมเลกุลเดี่ยวไปเป็นกรดไขมันระเหยง่าย ซึ่งสอดคล้องกับค่า pH เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตแก๊สมีเทนที่ชุดการทดลอง 40RF มีค่า pH ต่ำที่สุด คือ 7.16

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคที่เหมาะสมมีผลต่อการเพิ่มผลได้แก๊สมีเทน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Ince et al. (2020) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับหัวเชื้อผลิตมีเทนจากมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคโดยใช้ข้าวบาร์เลย์เป็นสับสเตรท พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตแก๊สมีเทนได้ถึงร้อยละ 18 Ozbayram et al. (2018) ได้ศึกษาการผลิตแก๊สชีวภาพจากมูลโคโดยของเหลวจากกระเพาะโคที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 เป็นหัวเชื้อ พบว่าให้ผลได้แก๊สมีเทนเท่ากับ 132 mL-CH_4/g-VS ซึ่งให้ผลได้แก๊สมีเทนสูงกว่าการใช้มูลโคเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้เมื่อเทียบศักยภาพการผลิตแก๊สมีเทนจากใบอ้อยและชีวมวลอื่นๆ พบว่าผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ที่ชุดการทดลองที่มีการใช้มูลโคและร้อยละ 10 ของของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคเป็นหัวเชื้อมีศักยภาพในการผลิตแก๊สมีเทน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลได้แก๊สมีเทนจากใบอ้อยและชีวมวลอื่นๆ

สับสเตรท	หัวเชื้อที่	ผลได้แก๊สมีเทน	อ้างอิง
ใบอ้อย	มูลโคและ %10RF	262.91 ± 5.95 mL-CH_4/g-VS	งานวิจัยนี้
ข้าวบาร์เลย์	กากตะกอนสลัดจ์และ RF	278 mL-CH_4/g-VS	Ince et al. (2020)
มูลโค	%40 RF	132 mL-CH_4/g-VS	Ozbayram et al. (2018)
ทะลายปาล์มเปล่า	กากตะกอนสลัดจ์	77.8 mL-CH_4/g-EFB	Suksong et al (2016)
ใบอ้อยผสมกับยอดอ้อย	กากตะกอนสลัดจ์	156.4 mL-CH_4/g-VS_{added}	Paulose and Kaparaju (2021)
ชานอ้อย	กากตะกอนสลัดจ์	174.3 mL-CH_4/g-VS_{added}	Paulose and Kaparaju (2021)
เศษไม้เบิร์ช	มูลโค	125 mL-CH_4/g-VS	Mulat et al. (2018)

กิจกรรมจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทน

การทดลองนี้เป็นการทดสอบกิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทนของชุดการทดลองที่ใช้มูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคร้อยละ 10 (10RF) ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ให้ปริมาตรแก๊สมีเทนสะสมและผลได้แก๊สมีเทนสูงที่สุด จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตแก๊สมีเทนที่ใช้สับสเตรท 4 ชนิด ได้แก่ อะซิเตต อะวิเซล กลูโคสและเจลาติน เท่ากับ 0.0204 ± 0.0005, 0.0173 ± 0.0005, 0.0179 ± 0.0006 และ 0.0129 ± 0.0005 g_{COD}-CH_4/g-VSS•day ตามลำดับ ซึ่งสับสเตรทแต่ละชนิดจะสามารถวัดกิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ โดยอะวิเซลเป็นสับสเตรททดสอบกิจกรรมจุลินทรีย์กลุ่มไฮโดรไลติกแบคทีเรีย (Hydrolytic bacteria) ที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ คือ เซลลูโลส ให้เป็นโมเลกุลเล็กลงเป็นน้ำตาลพวกโมเลกุลเดี่ยว ($C_6H_{12}O_6$) ซึ่งใช้สำหรับการหมักกรดได้ น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรททดสอบกิจกรรมจุลินทรีย์กลุ่มอะซิโตจินิกแบคทีเรีย (Acidogenic bacteria) ที่ย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ($C_6H_{12}O_6$) ให้เป็นกรดอะซิติก (Acetic acid) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นแก๊สมีเทนในขั้นตอนถัดไป กรดอะซิติกเป็นสับสเตรททดสอบกิจกรรมกลุ่มจุลินทรีย์อะซิโตคลาสติกแบคทีเรีย (Acetoclastic bacteria) และเจลาตินเป็นสับสเตรททดสอบกิจกรรมจุลินทรีย์จุลินทรีย์กลุ่มโปรติโอไลติก (Proteolytic) ที่มีบทบาทในการย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนและถูกใช้เปลี่ยนไปเป็นแก๊สมีเทนในขั้นตอนถัดไป (Meegoda et al, 2018) ผลการทดลองแสดงว่ากลุ่มจุลินทรีย์ในชุดการทดลอง 10RF มีกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มอะซิโตคลาสติกแบคทีเรียสูงที่สุด รองลงมาคือกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มไฮโดรไลติกแบคทีเรียและจุลินทรีย์กลุ่มอะซิโดตจินิกแบคทีเรียและกิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่มโปรติโอไลติกน้อยที่สุด เมื่อพิจารณาจากผลได้แก๊สมีเทนร่วมด้วยจะเห็นได้ว่าการใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนโคร้อยละ 10 สามารถเพิ่มผลได้มีเทนเป็นอย่างดีซึ่งสอดคล้องกับผลของกิจกรรมจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทน เนื่องจากที่ชุดการทดลองนี้มีกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกลุ่มไฮโดรไลติกสูงซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ในขั้นตอนไฮโดรไลสิส (Hydrolysis) ที่จัดเป็นขั้นจำกัดอัตรา (Rate limiting step) ในการผลิตแก๊สมีเทน (Abbasi et al., 2012)

สรุปผลการวิจัย

ใบอ้อยมีศักยภาพในการใช้เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตแก๊สมีเทน การใช้มูลโคร่วมกับของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถเพิ่มผลผลิตแก๊สมีเทนจากใบอ้อยได้เป็นอย่างดี โดยชุดการทดลองมูลโคและของเหลวจากกระเพาะรูเมนร้อยละ 10 (10RF) นั้น เป็นชุดการทดลองที่มีการผลิตแก๊สมีเทนสูงที่สุด และจากการหากิจกรรมจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตแก๊สมีเทนพบว่ามูลโคเจือจางและของเหลวจากกระเพาะรูเมนร้อยละ 10 มีกิจกรรมจำเพาะของจุลินทรีย์ในกลุ่มไฮโดรไลติกและกลุ่มอะโตคลาสติกสูง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ความอนุเคราะห์มูลโคและของเหลวจากกระเพาะโค ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย และขอขอบคุณทุนส่งเสริมการศึกษาบัณฑิตศึกษาคณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2561/62. [ออนไลน์] 2562 [อ้างเมื่อ 3 มกราคม 2565] จาก http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9040.pdf .

Abbasi T, Tauseef SM, Abbasi SA. A Brief History of Anaerobic Digestion and “Biogas”. Biogas Energy. New York, NY: Springer New York. 2012;11-23.

APHA, Association AWW, Federation WPC, Federation WE. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: American Public Health Association. 1995.

Budiyono B, Widiasa I, Johari S, Sunarso S. Increasing Biogas Production Rate from Cattle Manure Using Rumen Fluid as Inoculums. International Journal of Science and Engineering. 2013; 6.

Darko CNS, Agyei-Tuffour B, Faloye DF, Goosen NJ, Nyankson E, Dodoo-Arhin D. Biomethane Production From Residual Algae Biomass (Ecklonia maxima): Effects of Inoculum Acclimatization on Yield. Waste and Biomass Valorization. 2022; 13(1): 497-509.

Devaki G, Deepa K, Xavier F, Antony I, P R S. Analysis of cow dung microbiota-A metagenomic approach. Indian Journal of Biotechnology. 2013; 12: 372-8.

Fan Y, Xing Y, Ma H, Pan C, Hou H. Enhanced cellulose-hydrogen production from corn stalk by lesser panda manure. International Journal of Hydrogen Energy. 2008; 33(21): 6058-65.

Fonoll X, Shrestha S, Khanal SK, Dosta J, Mata-Alvarez J, Raskin L. Understanding the Anaerobic Digestibility of Lignocellulosic Substrates Using Rumen Content as a Cosubstrate and an Inoculum. ACS ES&T Engineering. 2021; 1(3): 424-35.

Gallegos Ibanez D, Wedwitschka H, Moeller L, Zehnsdorf A, Stinner W. Effect of particle size reduction and ensiling fermentation on biogas formation and silage quality of wheat straw. Bioresource Technology. 2017; 245.

Huang J, Khan MT, Perecin D, Coelho ST, Zhang M. Sugarcane for bioethanol production: Potential of bagasse in Chinese perspective. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2020; 133: 110296.

Ince O, Akyol Ç, Özbayram G, Tutal B, Ince B. Enhancing methane production from anaerobic co-digestion of cow manure and barley: Link between process parameters and microbial community dynamics. Environmental Progress and Sustainable Energy. 2020; 39: e13292.

Jin W, Xu X, Yang F, Li C, Zhou M. Performance enhancement by rumen cultures in anaerobic co-digestion of corn straw with pig manure. Biomass and Bioenergy. 2018; 115: 120-9.

Kapoor R, Ghosh P, Tyagi B, Vijay VK, Vijay V, Thakur IS, et al. Advances in biogas valorization and utilization systems: A comprehensive review. Journal of Cleaner Production. 2020; 273: 123052.

Lee J-S, Parameswaran B, Lee J-P, Park S-C. Recent developments of key technologies on cellulosic ethanol production. Journal of Scientific and Industrial Research. 2008; 67: 865-73.

Meegoda JN, Li B, Patel K, Wang LB. A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion.*International Journal of Environmental Research* and *Public Health*. 2018; 15(10).

Mulat DG, Dibdiakova J, Horn SJ. Microbial biogas production from hydrolysis lignin: insight into lignin structural changes. Biotechnology for Biofuels. 2018; 11(1): 61.

Owen WF, Stuckey DC, Healy JB, Young LY, McCarty PL. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Research. 1979;13 (6): 485-492.

Özbayram G, Akyol Ç, Ince B, Karakoç C, Ince O. Rumen bacteria at work: Bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure. Journal of Applied Microbiology. 2018; 124: 491-502.

Ozbayram EG, Ince O, Ince B, Harms H, Kleinsteuber S. Comparison of Rumen and Manure Microbiomes and Implications for the Inoculation of Anaerobic Digesters. Microorganisms. 2018; 6(1): 6: 10–1.

Pattra S, Sangyoka S, Boonmee M, Reungsang A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by Clostridium butyricum. International Journal of Hydrogen Energy. 2008; 33(19): 5256-65.

Paulose P, Kaparaju P. Anaerobic mono-digestion of sugarcane trash and bagasse with and without pretreatment. Industrial Crops and Products. 2021; 170: 113712.

Prapinagsorn W, Sittijunda S, Reungsang A. Co-Digestion of Napier Grass and Its Silage with Cow Dung for Methane Production. Energies. 2017; 10(10).

Sholahuddin, Nakamura Y, Asada C. Effect of Activated Cow Dung as Inoculum on Methane Production of Steam-Exploded Rice Husks. Waste and Biomass Valorization. 2021; 12(9): 5019-28.

Steinmetz R, Mezzari M, Da Silva M, Kunz A, Amaral A, Tápparo D, et al. Enrichment and acclimation of an anaerobic mesophilic microorganism's inoculum for standardization of BMP assays. Bioresource Technology. 2016; 219.

Sthembiso M, Isa Y. Production of Biogas from Bagasse: Effect of Cow Dung to Bagasse Feed Ratio, Media Solution pH and Digester's Moisture Content on Biogas Volume and Methane Yield. International Journal of Emerging Trends in Engineering Research. 2020; 8: 3898-908.

Suksong W, Kongjan P, Prasertsan P, Imai T, S OT. Optimization and microbial community analysis for production of biogas from solid waste residues of palm oil mill industry by solid- state anaerobic digestion. Bioresource Technology. 2016; 214: 166-74.

Zhang C, Xiao G, Peng L, Su H, Tan T. The anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure. Bioresource Technology. 2013; 129: 170-6.

Zheng X-J, Yu H-Q. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. Journal of Environmental Management. 2005; 74(1): 65-70.