# การผลิตไฮโดรเจนด้วยกลีเซอรอลดิบจากการผลิตไบโอดีเซลในระบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำโดย *Escherichia coli* HB41

# Hydrogen Production from Crude Glycerol from Biodiesel Production in Repeated Semi-continuous Process by *Escherichia coli* HB41

ฐิติญาภรณ์ เนื่องมี [1], ฒาลิศา ยุวอมรพิทักษ์ [2*], กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา[3]

Thitiyaporn Nueangmee[1] , Thalisa Yuwa-amornpitak[2*], Kannika Chokietwattana[3]

Received: 10 July 2014 ; Accepted: 30 November 2014

## บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในระบบกึ่งต่อเนื่องจากกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดย *E. coli* HB41 การศึกษานี้ได้เปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนที่แปรผันอัตราการป้อนอาหารเป็นร้อยละ 5 10 15 และ 20 ของปริมาตรการทำงาน 1 ลิตร ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเข้าสู่ระบบทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 120 ชั่วโมง พบว่าที่อัตราการป้อนอาหารร้อยละ 5 มีผลได้ไฮโดรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 0.231 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลีเซอรอล ในขณะที่อัตราการป้อนอาหารร้อยละ 10 15 และ 20 มีผลได้ไฮโดรเจนเป็น 0.102 0.081 และ 0.074 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลีเซอรอลตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อให้การผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องจึงได้ศึกษาในระบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำ โดยป้อนอาหารทุก ๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ด้วยอัตราการป้อนอาหารร้อยละ 5 ของปริมาตรการทำงาน 1 ลิตร อาหารมีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร พบว่าผลได้ไฮโดรเจนค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกและมีค่าสูงสุดในวันที่ 6 คือ 0.31 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลีเซอรอล หลังจากนั้นผลได้ไฮโดรเจนค่อย ๆ ลดต่ำลงจนถึงวันที่ 8 และลดลงต่อเนื่องอย่างรวดเร็วจนกระทั่งในวันที่ 11 ไม่มีไฮโดรเจนเกิดขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากขณะที่มีการเจริญของ *E. coli* HB41 มีการผลิตกรดอะซิติกและเอทานอลด้วยเช่นกัน ปริมาณกรดและเอทานอลที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักมีความเข้มข้นเท่ากับ 2.45 และ 5.89 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ปริมาณกรดและเอทานอลมีผลทำให้น้ำหมักมีสภาพเป็นกรดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จากเริ่มต้นอาหารมี pH 7 ลดลงเป็น pH 4.3

**คำสำคัญ :** *E. coli* ไฮโดรเจน กลีเซอรอลดิบ ระบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำ

## Abstract

The aim of this work was to study hydrogen production in a semi-continuous process by *E. coli* HB41 from crude glycerol, the by product or waste from biodiesel production. Hydrogen production from a medium containing 20 g/l glycerol at various feeding rates: 5, 10, 15, 20% of 1 liter working volume by feeding every day for 5 days, was examined. It was found that the highest hydrogen yield at 0.231 mol hydrogen/ mole glycerol was gained at a 5% loading rate. The hydrogen yield at a feeding rate of 10, 15 and 20% was 0.102, 0.081, and 0.074 mol hydrogen/ mol glycerol, respectively. For continuous production of hydrogen, a semi-continuous process was performed. The medium containing glycerol 20 g/l at 5% loading rate of 1 liter working volume was daily feed for 14 days. The results revealed that hydrogen yield slightly increased and reached the maximum at day 6 with a value of 0.31 mol hydrogen/ mole glycerol. After, the hydrogen yield slightly decreased until day 8. At day 11, no hydrogen production was observed. During growth of *E. coli* HB41, acetic acid and ethanol were also produced. Acetic acid and ethanol production were 2.45 and 5.89 g/l, respectively. The increase in acetic acid resulted in decrease of pH from 7.0 at the beginning to 4.3 at the end of fermentation.

**Keywords**: *E. coli* HB41, hydrogen, crude glycerol, semi-continuous

[1] *นิสิตปริญญาโท, [2]รองศาสตราจารย์, [3]ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[1] *Master degree student, [2*]Associate professor, [3]Assistant professor , Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.*

* *Corresponding author : Thalisa Yuwa-amornpitak, Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand. E-mail address: HYPERLINK "mailto:Eammiki_CNSD@hotmail.com"Eammiki_CNSD@hotmail.com.*

## บทนำ

ไฮโดรเจนเป็นพลังงานทางเลือกที่สะอาดและเป็นพลังงานที่มีประสิทธิภาพสูง อีกทั้งไม่ก่อให้เกิดมลพิษ เนื่องจากการเผาไหม้ไฮโดรเจนด้วยออกซิเจนได้เพียงน้ำและพลังงานความร้อนเท่านั้น[1] โดย 1 กิโลกรัมของไฮโดรเจนให้พลังงานเทียบเท่า 3.5 ลิตรของน้ำมันปิโตรเลียม ไฮโดรเจนมีค่าพลังงานสูงมากเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น ๆ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นพลังงานสำรอง[2] การผลิตไฮโดรเจนมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี ทางไฟฟ้าและกระบวนการทางชีวภาพ[3] การผลิตไฮโดรเจนด้วยกระบวนการทางชีวภาพเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียและสาหร่ายซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่ก่อให้เกิดมลพิษเพราะของเสียจากกระบวนการทางชีวภาพสามารถบำบัดและกำจัดได้ง่าย จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogens*, *Klebsiella pneumniae*, *Clostridium butylicum* และ *Chalmydomonas* เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้มีปฏิกิริยาและกลไกในการผลิตไฮโดรเจนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสภาวะแวดล้อม

กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปัจจุบันมีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นและขยายตัวอย่างรวดเร็วทำให้มีปริมาณกลีเซอรอลเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก กระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะได้กลีเซอรอลร้อยละ 10 ของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ กลีเซอรอลที่ได้นี้มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 41 (w/v)[4] เนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีสิ่งปนเปื้อนหลายอย่าง เช่น ด่างที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา น้ำมันที่เหลือจากปฏิกิริยา แอลกอฮอล์ สบู่ที่เกิดขึ้นควบคู่กับไบโอดีเซล และถ้าเป็นน้ำมันใช้แล้วยิ่งมีสิ่งปนเปื้อนมากขึ้น ซึ่งมาจากน้ำปลา น้ำตาล แป้ง เครื่องเทศ และอื่น ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร จึงเรียกกลีเซอรอลนี้ว่า กลีเซอรอลดิบ เพราะยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์นั้นเอง กลีเซอรอลดิบจึงเป็นวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนได้โดยจุลินทรีย์ จึงเป็นแนวทางหนึ่งของการใช้ประโยชน์จากของเสีย และยังเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อมด้วยอีกทางหนึ่ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยน้ำมันใช้แล้ว ตลอดจนศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในระบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อศึกษาแนวโน้มการพัฒนาระบบการผลิตไฮโดรเจนให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

## วิธีการทดลอง

### อาหารกลีเซอรอล (Glycerol medium)

เตรียมอาหาร Glycerol-medium (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ $KH_2PO_4$ 1.5, $(NH_4)_2SO_4$ 2, $CaCl_2.2H_2O$ 0.1, $MgCl_2.2H_2O$ 0.1, Peptone 10, NaCl 20, Glycerol waste 20 ml จำนวน 900 มิลลิลิตรที่มี pH 7 บรรจุในถังหมักขนาด 1 ลิตร ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมถังหมัก ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### การเตรียมกลีเซอรอล

กลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีสิ่งเจือปนจากกระบวนการผลิตได้แก่ แอลกอฮอล์ ด่าง น้ำมันที่ยังไม่เข้าทำปฏิกิริยาและ ไบโอดีเซลที่แยกออกไม่หมด รวมถึงสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ ดังนั้นจึงเตรียมกลีเซอรอลด้วยการปรับสภาพให้มี pH 4 ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนซัลเฟตออก แช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนแข็งซึ่งเป็นน้ำมันที่อยู่ส่วนบน ส่วนล่างเป็นกลีเซอรอลซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### จุลินทรีย์และการเก็บรักษา

*Escherichia coli* HB41 เป็นแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพจากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสียสหกรณ์โคนม อสค.[5] เก็บรักษาในหลอดอาหารเอียงที่มีอาหารแข็งสูตร modified LB (g/l: glucose, 10; $KH_2PO_4$, 1.5; $(NH_4)_2SO_4$, 2; $CaCl_2.2H_2O$, 0.1; $MgCl_2.2H_2O$, 0.1; NaCl, 20; malt extract, 10; peptone, 10) พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บหัวเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และควรถ่ายเชื้อในหลอดอาหารใหม่ทุก ๆ 2-4 สัปดาห์

### การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่าย *E. coli* HB41 จากหลอดเก็บหัวเชื้อบริสุทธิ์ที่มีอายุไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป ลงในหลอดอาหารเหลว modified LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร บรรจุในหลอดฝาเกลียว บ่มเชื้อในหลอดอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มปริมาตรหัวเชื้อเริ่มต้นจาก 10 มิลลิลิตรเป็น 100 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่าง ๆ

### ผลของอัตราป้อนต่อการผลิตไฮโดรเจนในระบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำ

ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลดิบ 20 กรัมต่อลิตรในระบบแบบกึ่งต่อเนื่อง (Figure 1) โดย *E. coli*

HB41 ด้วยการแปรผันอัตราป้อนอาหารเป็นร้อยละ 5 10 15 และ 20 ของปริมาตรการทำงาน 1 ลิตร อาหารเริ่มต้นมี pH 7 ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 120 ชั่วโมง มีการเติมอาหารทุก ๆ 24 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง

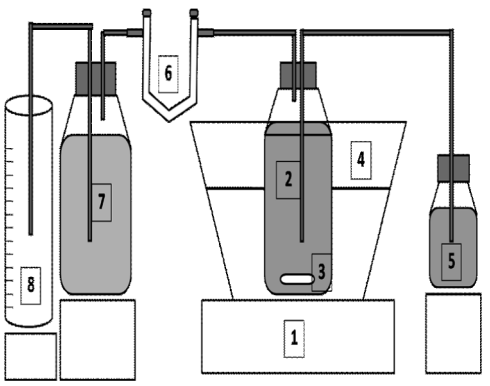


**Figure 1** Diagram of the reactor for hydrogen production in repeated semi-continous process

1 : Hot plate stirrer
2 : Reactor (1L)
3 : Magnetic stirrer
4 : Water bath
5 : Modified LB medium
6 : U-tube manometer
7 : Water (PH 4)
8 : Graduated Cylinder

### การผลิตไฮโดรเจนในระบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำ

ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโด้วยกลีเซอรอลดิบ 20 กรัมต่อลิตรโดย *E. coli* HB41 ในระบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำ ด้วยอัตราป้อนอาหารร้อยละ 5 ทุก ๆ 24 ชั่วโมง พีเอชเริ่มต้น PH 7 ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยไม่มีการควบคุมพีเอชระหว่างการหมัก

### วิธีการตรวจวัดและวิเคราะห์

วัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นในถังหมักด้วยวิธี แทนที่น้ำ โดยการต่อสายยางวัดปริมาตรก๊าซจากถังหมักกับภาชนะที่บรรจุน้ำที่ผ่านการปรับสภาพเป็น pH 4 เพื่อป้องกันก๊าซละลายในน้ำ วิเคราะห์ไฮโดรเจนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-14A ระบบ Thermal Conductivity Detector (TCD) ด้วย คอลัมน์ porapak Q วิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกและเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-14A ระบบ Flame Ionization Detector (FID) ด้วย คอลัมน์ Carbowax บรรจุด้วยสาร Carbowax วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลโดยวิธีของ Bondioli and Della (2005)[6] และวัดค่าพีเอช ด้วย pH meter

## ผลการทดลอง

### ผลการผลิตไฮโดรเจนในระบบกึ่งต่อเนื่อง

ผลการผลิตไฮโดรเจนในระบบกึ่งต่อเนื่องโดย *E. coli* HB41 ด้วยกลีเซอรอลดิบที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ณ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อัตราป้อนอาหารร้อยละ 5 10 15 และ 20 มีปริมาณกลีเซอรอลคงเหลือเฉลี่ยเท่ากับ 3.55 4.43 4.82 และ 5.28 กรัมต่อลิตรตามลำดับ หรือคิดเป็นปริมาณกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไปทั้งหมดภายในเวลา 5 วันเท่ากับ 11.95 10.92 11.33 และ 8.84 กรัมต่อลิตรตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของปริมาณกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 62.4 57.9 59.7 และ 46.1 ตามลำดับ จากผลดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่า *E. coli* HB41 มีประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลได้สูงสุดที่อัตราป้อนอาหารต่ำที่สุดคือที่ร้อยละ 5 หากอัตราป้อนอาหารเพิ่มขึ้นอัตราการใช้กลีเซอรอลกลับยิ่งลดลงอย่างชัดเจน ทำให้น้ำหมักมีปริมาณกลีเซอรอลคงเหลือสะสมสูงที่สุดที่อัตราป้อนร้อยละ 20 และปริมาณ กลีเซอรอลคงเหลือสะสมน้อยลงที่อัตราป้อนต่ำกว่า (Figure 2) ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เจริญในระบบไร้อากาศมีอัตราการเจริญของเซลล์ต่ำกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญในระบบมีอากาศ

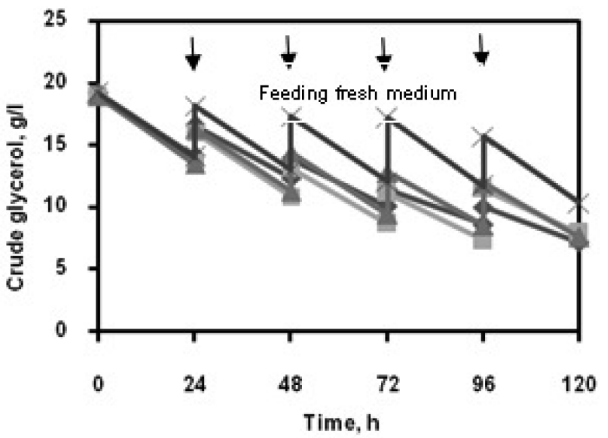


**Figure 2** Glycerol residue remaining in 20 g/l glycerol medium at various loading rate of semi-continuous process for hydrogen production by *E. coli* HB41 at 35 °C for 120 h.

5% loading 10% loading
15% loading 20% loading

Figure 3 แสดงปริมาณไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นในแต่ละวันโดยแสดงเป็นค่าของไฮโดรเจนสะสมและคิดเป็นผลได้ไฮโดรเจนคือคิดเป็นจำนวนโมลของก๊าซไฮโดรเจนต่อโมลของกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไป จากข้อมูลพบว่า *E. coli* HB 41 ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดภายใน 24 ชั่วโมงที่ทุก ๆ อัตราป้อนอาหาร (Figure 3A) ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (เนื่องจากยังไม่ได้ป้อน

อาหาร) แต่อย่างไรก็ตามหลังชั่วโมงที่ 24 (ดึงอาหารเก่าออกและป้อนอาหารใหม่เข้าเท่ากับปริมาตรของอัตราป้อนนั้น ๆ) ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนสะสมกลับลดลงอย่างรวดเร็วในวันถัดมาหลังการป้อนอาหาร ที่อัตราป้อนอาหาร ร้อยละ 5 การผลิตไฮโดรเจนในชั่วโมงที่ 48 ลดลงเป็นร้อยละ 11.4 ในขณะที่อัตราป้อนอาหารร้อยละ 10 15 และ 20 การผลิตไฮโดรเจนสะสมลดลงเป็นร้อยละ 54 75 และ 69 ตามลำดับ และปริมาณไฮโดรเจนสะสมในชั่วโมงที่ 72 96 และ 120 ที่อัตราป้อนร้อยละ 5 มีปริมาณใกล้เคียงกันเฉลี่ยเป็น 210.4 มิลลิลิตรต่อวัน ในขณะที่อัตราป้อนร้อยละ 10 15 และ 20 เกิดไฮโดรเจนสะสมเฉลี่ยของชั่วโมงดังกล่าวเป็น 98 73.3 และ 73.5 มิลลิลิตรต่อวันตามลำดับ ในทำนองเดียวกันกับผลได้ไฮโดรเจนซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับ

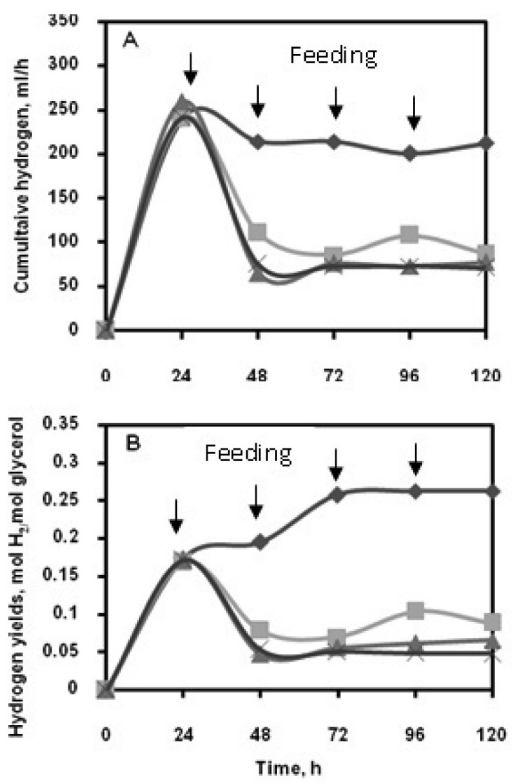


**Figure 3** Hydrogen production in repeated semi-continuous process by *E.coli* HB41 from crude glycerol 20 g/l, incubated at 35 °C for 120 h. Various feeding rate of 5, 10, 15 and 20% were loaded into the fermentor every 24 h. (A) = Cumulative hydrogen, (B) = Hydrogen yield

5% loading 10% loading
15% loading 20% loading

ไฮโดรเจนสะสม กล่าวคือที่อัตราป้อนร้อยละ 5 ให้ผลได้ไฮโดรเจนสูงที่สุดและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 72-120 ในขณะที่อัตราป้อนร้อยละ10 15 และ 20 มีผลได้ไฮโดรเจนลดลงหลังชั่วโมงที่ 24 จนมีค่าต่ำและคงที่ในชั่วโมงที่ 72-120 ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แสดงดัง (Figure 3B) จากผลดังกล่าวนี้ชี้ให้เห็นว่าที่อัตราป้อนร้อยละ 5 เป็นอัตราป้อนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยที่สภาวะสมดุลระบบยังคงผลิตไฮโดรเจนได้อย่างต่อเนื่องเมื่อมีการเติมอาหารใหม่ให้ทุก ๆ วัน ข้อดีของกระบวนการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่องคือ สามารถดำเนินการได้ต่อเนื่องโดยไม่ต้องเตรียมกล้าเชื้อใหม่ ทำให้ระบบมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถผลิตต่อเนื่องได้เป็นระยะเวลายาวนานกว่าการผลิตแบบกะ รายงานของ Yokoi และคณะ (2002)[7] ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากของเสียที่เป็นแป้งจากมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *C. butyricum* และ *Enterobacter aerogenes* แล้วเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการผลิตแบบกะและแบบกะซ้ำ (กึ่งต่อเนื่อง) พบว่ากระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบกะซ้ำให้ผลได้ไฮโดรเจนสูงกว่ากระบวนการผลิตแบบกะ ผลได้ไฮโดรเจนของทั้งสองระบบเป็น 2.7 และ 2 โมลไฮโดรเจนต่อโมลกลูโคส ตามลำดับ

การผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียนอกจากจะขึ้นอยู่อุณหภูมิ ชนิดและปริมาณของแหล่งอาหารคาร์บอนแล้วค่าพีเอชและกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน Figure 4 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกรดอะซิติกและเอทานอลที่เกิดขึ้นในอาหาร Glycerol medium จากการผลิตไฮโดรเจนในระบบแบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำโดย *E. coli* HB41 ที่มีการแปรผันอัตราป้อนอาหาร โดยใช้อาหารที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ทุก ๆ 24 ชั่วโมง มีการป้อนอาหารเข้าระบบอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วัน ค่าพีเอชของอาหารเปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตไฮโดรเจน (Figure 4A) จะเห็นได้ว่าพีเอชของอาหารที่ทุก ๆ อัตราการป้อนอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว ภายใน 24 ชั่วโมง พีเอชของอาหารในถังหมักก่อนการป้อนอาหารใหม่ลดลงเฉลี่ยที่ทุก ๆ อัตราการป้อนเป็น pH 5.83 และเมื่อป้อนอาหารเข้าไปใหม่จะมีค่า pH เฉลี่ยที่ทุก ๆ อัตราการป้อนอาหารเป็น pH 6.08 นอกจากนี้พีเอชของอาหารมีแนวโน้มลดลงทุกวัน อย่างไรก็ตามในวันที่ 5 ของการทดลองที่ทุก ๆ อัตราป้อนอาหารในถังหมักมีค่า pH เฉลี่ยอยู่ที่ 5.72 pH ของอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจน เพราะขณะที่แบคทีเรียมีการเจริญมากขึ้นก็จะมีการสร้างกรดอินทรีย์ระเหยได้มากขึ้นและสะสมเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ค่า pH ลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถเจริญในสภาวะ pH ที่แตกต่างกัน ดังนั้นค่า pH จึงมีส่วนสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากมี

ผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย[8] Fountoulakis และ Manios (2009)[9] ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากเศษขยะอินทรีย์ชุมชนและของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมการเกษตรร่วมกับการใช้กลีเซอรอลดิบเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน พบว่าหากค่า pH ในน้ำหมักอยู่ระหว่าง 5.6-4.1 จะทำให้ให้ผลได้ของไฮโดรเจนผันผวนเป็นอย่างมาก pH ของอาหารในแต่ละวันมีค่าแตกต่างกันค่อนข้างมากทำให้ผลได้ไฮโดรเจนแตกต่างกันมาก และถ้าน้ำหมักมีpH ต่ำกว่า 5 อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดต่ำลงและหยุดการผลิตได้ในที่สุด[5] ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดย *E. coli* HB41 ด้วยกลีเซอรอลดิบ พบว่าค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนคือ pH 7 และที่ pH 4 เชื้อ *E. coli* HB41 สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำที่สุด

Figure 4B และ 4C แสดงปริมาณการเกิดกรดอะซิติกและเอทานอลในระหว่างการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำเป็นเวลา 5 วัน จากข้อมูลจะเห็นได้ว่า *E. coli* HB41 ผลิตกรดอะซิติกและเอทานอลสูงที่สุดที่อัตราการป้อนอาหารร้อยละ 5 และมีแนวโน้มการผลิตสารทั้งสองชนิดนี้ลดลงเมื่ออัตราการป้อนอาหารเพิ่มสูงขึ้นอย่างเป็นลำดับ ที่อัตราการป้อนอาหารร้อยละ 5 ปริมาณกรดอะซิติกมีค่าเฉลี่ยทั้ง 5 วันเป็น 1.89 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราการป้อนอาหารที่ร้อยละ 10 15 และ 20 มีค่าเฉลี่ยของกรด อะซิติกเป็น 1.02 0.82 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณเอทานอลที่อัตราการป้อนอาหารร้อยละ 5 มีค่าสูงที่สุดเฉลี่ยทั้ง 5 วันเป็น 4.51 กรัมต่อลิตร และที่อัตราการป้อนอาหารเป็นร้อยละ 10 15 และ 20 มีปริมาณเอทานอลเฉลี่ยทั้ง 5 วันลดลงเป็น 3.74 3.69 และ 3.67 ตามลำดับ

ปริมาณกรดอะซิติกและเอทานอลที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักสอดคล้องกับปริมาณไฮโดรเจนสะสมและผลได้ไฮโดรเจน แสดงดัง Figure 3A และ 3Bจากภาพจะเห็นได้ว่าที่อัตราการป้อนอาหารร้อยละ 5 มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมและผลได้ไฮโดรเจนสูงที่สุดสอดคล้องกับปริมาณกรดอะซิติกและเอทานอล[10] รายงานผลการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจาก *E. coli* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตไฮโดรเจนจำเป็นต้องผลิต เอทานอลและอะซิเตทควบคู่ไปด้วย ซึ่งกรดอินทรีย์เหล่านี้เกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายสารอินทรีย์ของแบคทีเรียพวกสร้างกรด และผลได้ของไฮโดรเจนจะมากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอินทรีย์ด้วยเช่นกัน เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนของ *E. coli* HB41 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่ม facultative anaerobes จะผลิตไฮโดรเจนผ่านปฏิกิริยาชีวเคมีแบบ *Escherichia coli* system โดยใช้เอนไซม์ไฮโดรจีเนสและฟอร์มาดี-ไฮโดรจีเนส

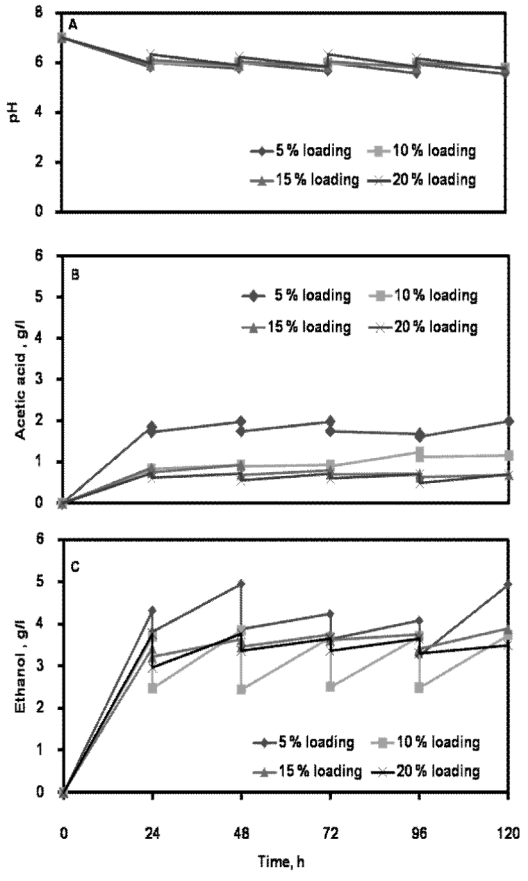


**Figure 4** Profile of pH (A), acetic acid (B) and ethanol (C) during hydrogen production by *E.coli* HB41 in repeated semi-continuous process, crude glycerol was feeded every 24 h at various loading rate. Temperature was control at 35°C.

ทั้งนี้ถ้าผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นกรด อะซิติกจะได้ไฮโดรเจนถึง 2 โมลต่อ 1 โมเลกุลของกลูโคส[2] ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าอัตราการป้อนอาหารที่ร้อยละ 5 ให้ผลผลิตไฮโดรเจนและผลได้ไฮโดรเจนสูงที่สุด ในขณะที่การเพิ่มอัตราการป้อนอาหารเป็นร้อยละ 10 15 และ 20 ทำให้ผลผลิตไฮโดรเจนและผลได้ไฮโดรเจนลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากที่อัตราการป้อนอาหารสูง หมายถึงการเพิ่มปริมาณอาหารที่มากเกินความต้องการให้กับจุลินทรีย์และก่อนการป้อนอาหารต้องดึงอาหารในถังออกก่อนเท่ากับจำนวนที่ป้อนเข้า ทำให้ระบบต้องสูญเสียจุลินทรีย์ ออกจากระบบไปด้วย ประกอบกับ *E. coli* HB1 มีการเจริญช้า ทำให้จำนวนเซลล์ในระบบลดลงจึงส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง โดยทั่วไปถ้าปริมาณเชื้อเริ่มต้นในระบบน้อย จะต้องใช้เวลานานในการเกิดไฮโดรเจน ปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะคือร้อยละ 10 ของปริมาณอาหาร[11,12]

**ผลของการผลิตไฮโดรเจนในระบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำ**

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนให้เกิดได้อย่างต่อเนื่องจึงได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดย *E. coli* HB41 ในระบบแบบกึ่งต่อเนื่องซ้ำที่อัตราการป้อนอาหารร้อยละ 5 ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการควบคุมค่าพีเอชที่เกิดขึ้นในถังหมัก ผลการทดลองแสดงดัง Figure 5 และ 6 การลดลงอย่างรวดเร็วของกลีเซอรอลในช่วงแรกจนถึงวันที่ 5 ของการหมัก (Figure 5A) แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีการใช้ไปอย่างรวดเร็ว ถึงแม้จะมีการเติมอาหารใหม่ให้ทุกวันทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้น หลังจากนั้นปริมาณกลีเซอรอลคงเหลือในอาหารตั้งแต่วันที่ 5 ถึง วันที่ 10 ค่อนข้างคงที่ แสดงให้เห็นว่าระบบมีการปรับตัวค่อนข้างสมดุลระหว่างการใช้อาหาร การสะสมอาหารในถังหมักและปริมาณเซลล์ที่สูญเสียไปจากระบบรวม

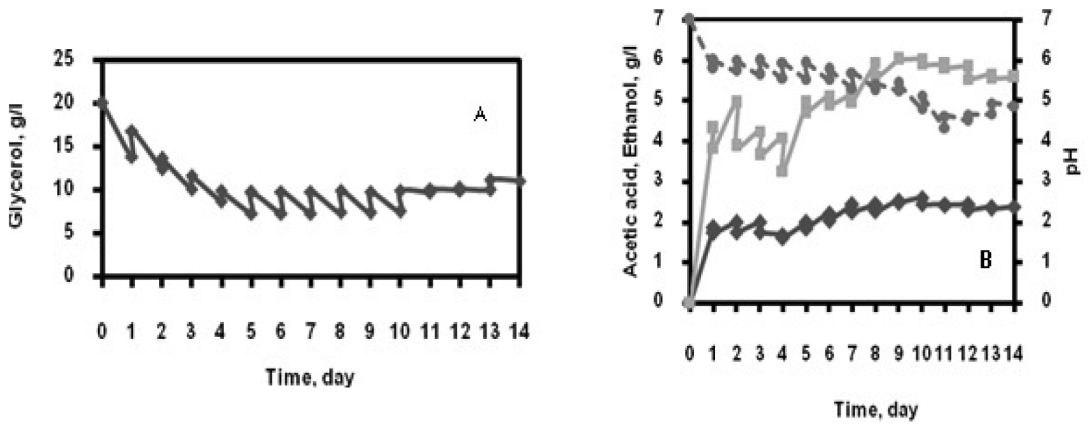


**Figure 5** Glycerol, Acetic acid and ethanol profile during hydrogen production by *E. coli* HB41 in repeated semi-continuous process at 5% loading rate of 20 g/l crude glycerol medium every day for 14 days Acetic acid Ethanol pH

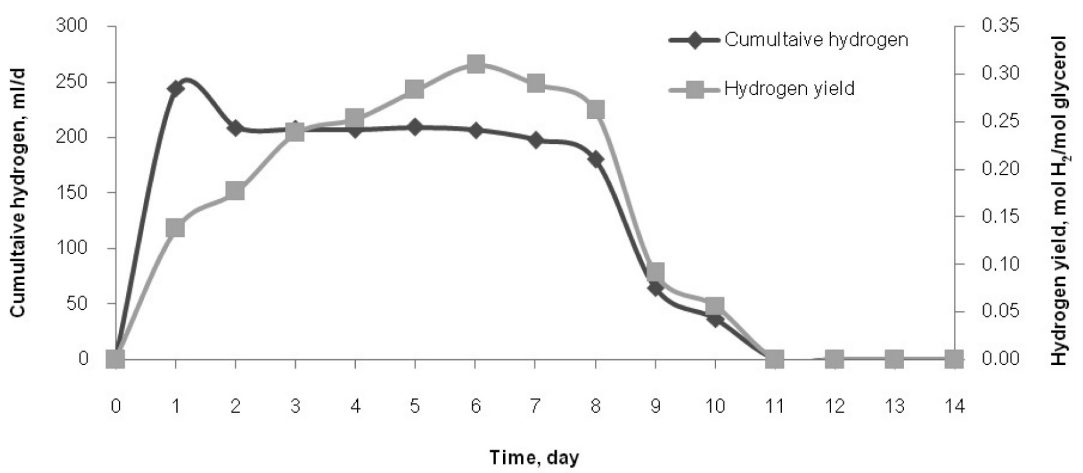


**Figure 6** Cumulative hydrogen and hydrogen yield from repeated semi-continuous process by *E. coli* HB41 at 5% loading rate of 20 g/l crude glycerol medium every day for 2 weeks at 35 °C

ทั้งเซลล์ใหม่ที่เพิ่มขึ้นในถังหมัก แต่หลังวันที่ 11 กลับพบว่าปริมาณกลีเซอรอลในถังหมักมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าระบบเกิดความไม่สมดุลของจุลินทรีย์เนื่องจากในช่วงที่มีความสมดุลของจุลินทรีย์ในช่วงวันที่ 5 – 10 มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นและสูงกว่ากรดอะซิติกส่งผลให้อาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้นและต่ำกว่า pH 5 (Figure 5B) ซึ่งเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของ *E. coli* HB41 ส่งผลให้มีการใช้กลีเซอรอลลดลง (การสะสมกลีเซอรอลจึง สูงขึ้นใน

ช่วงท้าย ๆ ของกระบวนการ แสดงดัง Figure 5A) รวมถึงการสูญเสียเซลล์จุลินทรีย์ไปกับการป้อนอาหารออกด้วย ผลการผลิตไฮโดรเจนแสดงดัง Figure 5C จะเห็นได้ว่า *E. coli* HB41 มีการสร้างไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงภายใน 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเมื่อมีการป้อนอาหารใหม่ให้กับระบบทุก ๆ 24 ชั่วโมง การผลิตไฮโดรเจนค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 8 แต่หลังจากนั้น การผลิตไฮโดรเจนลดลงและหยุดผลิตในวันที่ 11 เป็นต้นไป ผลได้ไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดในวันที่ 6 หลังจากนั้นมีค่าลดลงเรื่อย ๆ จนในที่สุดก็หาค่าไม่ได้เนื่องจากไม่มีการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งอาจเกิดผลการยับยั้งแบบย้อนกลับของผลิตภัณฑ์ (feedback inhibition)[13] ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ได้แก่ กรดอะซิติกและเอทานอล ผลนี้สอดคล้องกับปริมาณไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น และสอดคล้องกับปริมาณกลีเซอรอลคงเหลือในถัง รวมถึงปริมาณกรดอซิติกและเอทานอลที่ผลิตขึ้นด้วย[14] ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *C. butyricum* และ *E. coli* ผลการใช้เชื้อผสมพบว่าปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลงส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยที่ค่า pH 4.3 จะเกิดการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจน รายงานของ Stewart (1975)[15] ศึกษาผลของฟอสเฟตและกรดอินทรีย์ระเหยต่อการเจริญของแบคทีเรียจากลำไส้สัตว์เคี้ยวเอื้อง พบว่าเมื่อมีปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยสูงขึ้นพีเอชจะต่ำลงและระดับของกรดอะซิติกที่มีค่าเกิน 800 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออัตราส่วนของกรดโพรไพโอนิกต่อกรดอะซิติกเกิน 1.4 กรัมต่อลิตร จะทำให้ระบบหมักเกิดความล้มเหลว อย่างไรก็ตามแม้ว่ากรดอินทรีย์จะมีปริมาณมากแต่มีจุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถเจริญและผลิตไฮโดรเจนได้[8]

## สรุปผล

งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ากลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลด้วยน้ำมันใช้แล้วมีศักยภาพสูงสามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทนอย่างเช่นไฮโดรเจนได้ด้วยแบคทีเรีย *E. coli* HB41 เนื่องจากระบบการหมักของแบคทีเรียชนิดนี้ตรวจพบเอทานอลและกรดอซิติกในน้ำหมัก แต่ไม่พบกรดโปรพิโอนิคและกรดบิวทิริค แสดงว่าระบบการหมักนี้เป็น ethanol type fermentation[16] อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระบบกึ่งต่อเนื่องจากกลีเซอรอลดิบด้วย แบคทีเรีย *E. coli* HB41 สามารถดำเนินการได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลาถึง 11 วัน ด้วยอัตราป้อนอาหารร้อยละ 5 โดยไม่ควบคุมสภาพกรด-ด่างของระบบการหมัก

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยนี้

## เอกสารอ้างอิง

1. Suksaman S, Alissara R, Samart M. Repeated-batch fermentative for bio-hydrogen production from cassava starch manufacturing wastewater. Pak J Biol Sci 2007;10:1782-89.
2. Kapdan LK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. Enz Micro Technol 2006;38:569-82.
3. Lay JJ, Lee YJ, Neuke T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. Wat Res 1999;33:2579-86.
4. Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. J Biosci Bioeng 2005;100:260-65.
5. Yuwa-amornpitak T. Bio-hydrogen production from biodiesel glycerol waste from used oil by bacterium isolated from waste water sludge. J Environ Sci Technol 2012;5:373-80.
6. Bondioli P, Della Bella L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. Eur J Lipid Sci Technol. 2005;107:153-57.
7. Yokoi H, Maki R, Hirose J, Hayashi S. Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. Biomass Bioen. 2002;22: 389-95.
8. Zheng XJ, Yu HQ. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. J Environ Manage. 2005;74:65-70.
9. Fountoulakis MS, Manios T. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. Biores Technol. 2009; 100(12): 3043-47.
10. Manish S, Venkatesh KV, Banerjee R. Metabolic flux analysis of biological hydrogen production by *Escherichia coli*. Int J Hydro Energy. 2007; 32(16): 3820-30.

11. Kotay SM, Das D. Microbial hydrogen production with Bacillus coagulans IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. Biores Technol. 2007;98:1183-90.
12 Wang CC, Chang CW, Chu CP, Lee DJ, Chang BV, Lio CS. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. J Biotechnol. 2003;102:83-92.
13. Ozmihci Serpil, Kargi Fikret. Dark fermentative bio-hydrogen production from waste wheat starch using co-culture with periodic feeding: effects of substrate loading rate. Int J Hydro Energy. 2011; 36:7089-93.
14. Seppälä JJ, Puhakka JA, Yli-Harja O, Karp MT, Santala V. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and co-cultures. Int J Hydro Energy. 2011; 36:10701-08.
15. Stewart WDP, Rowell P. Effects of L-methionine-DL-sulphoximine on the assimilation of newly fixed $NH_3$, acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. Biochem Biophy Res Commun. 1975; 65:846-56.
16. Ren NQ, Wang BZ, Huang JC. Ethanol –type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. Biotechnol. Bioeng. 1997; 4:428-33.