



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง

การผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลภายใต้
อุณหภูมิห้องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ upflow anaerobic sludge blanket
(UASB)

Hydrogen production from glycerol-containing waste discharged after
biodiesel manufacturing process with upflow anaerobic sludge
blanket reactor under mesophilic condition

ผู้วิจัย

รศ.ดร.อลิศรา เรืองแสง
นางสาว สุรีย์วัลย์ สิริธินันดา

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ISBN

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัยประเภททุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Upflow anaerobic sludge blanket (UASB) โดยเซลล์ตรึง *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ผลการทดลองพบว่า อัตราการย่อยสลายอินทรีย์ มีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นสับสเตรท จะพบว่าที่อัตราการย่อยสลายอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจน สูงสุดเท่ากับ 37.15 24.19% และ 8.97 6.24 mmol H₂/L h ตามลำดับ โดยผลพลอยได้หลักจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนได้แก่ เอทานอล 1,3 โพรเพนไดออล กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก จากผลการศึกษากลุ่มประชากรในเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules โดย fluorescent in situ hybridization (FISH) ที่อัตราการย่อยสลายอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อใช้กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นสับสเตรท พบว่ากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตไฮโดรเจนที่ตรวจพบเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Enterobacter* sp. *Clostridium* sp. *Bacillus* sp. และ *Dialister* sp. ภาพถ่ายลักษณะของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules โดยกล้อง Scanning Electron Microscopy (SEM) แสดงให้เห็นว่า *E. aerogenes* ATCC 13048 เกาะติดกับพื้นผิว UASB granules โดยกลไกการดูดซับในรูพรุนของ UASB granules

Abstract

Biohydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules was examined in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. The organic loading rate (OLR) was optimized in order to maximize the hydrogen production rate (HPR). The maximum hydrogen content (37.15% and 24.19%) and HPR (8.97 and 6.24 mmol H₂/L h) were achieved at the optimum OLR of 50 g/L d using pure and waste glycerol as the substrate, respectively. The major soluble metabolites (SMPs) were ethanol, 1,3-PD, formic acid, and acetic acid. The microbial community and microbial structure analyzed by fluorescent in situ hybridization (FISH) and scanning electron microscopy (SEM) revealed that the predominant hydrogen producer were *E. aerogenes* ATCC 13048 and firmicutes bacteria including *Clostridium*, *Bacillus*, and *Dialister* sp. The cells of *E. aerogenes* were immobilized on heat-treated UASB granules by an adsorption mechanism.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ 1	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1-2
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
4. สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	4
5. ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1. ไฮโดรเจนและการใช้ประโยชน์	5-6
2. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน	6-9
3. ไบโอดีเซล	9-10
4. กลีเซอรอล	10-15
5. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)	15-16
6. องค์ประกอบของระบบยูเอเอสบี	16-17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
1. สับสเตรท	18
2. การเตรียมกล้าเชื้อ	19
3. การตรึงเซลล์ <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules	19-0

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
4. การผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB โดยเซลล์ตรึง <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules	20-21
5. การวิเคราะห์โครงสร้างและกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ของเซลล์ <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules	22-23
6. การวิเคราะห์ผลการทดลอง	23-25
7. การคำนวณพารามิเตอร์ต่างๆและการคำนวณค่า Chemical Oxygen Demand (COD) balance	25
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
1. การผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB โดยเซลล์ตรึง <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules	27-34
2. โครงสร้างของเซลล์ตรึง <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules และกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB	34-36
3. ค่าการแปลงพลังงานความร้อนและผลการเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการทดลองกับงานวิจัยอื่นๆ	37-39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	41-50
ภาคผนวก ก	51
การคำนวณค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์	52
ภาคผนวก ข	53
กราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล	54

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส	11
ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล	12
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล	13
ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล	18
ตารางที่ 5 สูตรอาหาร NB	19
ตารางที่ 6 สูตรอาหารกลีเซอรอลที่ใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	20
ตารางที่ 7 ผลของอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ต่อประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB	29
ตารางที่ 8 ผลของอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ต่อค่าความเป็นกรดต่างและผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB	32
ตารางที่ 9 การใช้กลีเซอรอล จำนวนประชากรจุลินทรีย์ การผลิตไฮโดรเจนและผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน และค่า COD balance ในสภาวะคงที่ ณ อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB	33
ตารางที่ 10 ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนจากการทดลองกับงานวิจัยอื่นๆ โดยใช้สับสเตรทและกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	39

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)	2
รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	10
รูปที่ 3 วิธีการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลโดยกลุ่มจุลินทรีย์	14
รูปที่ 4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB	21
รูปที่ 5 การผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB (ก) เพอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจนและอัตราการผลิตไฮโดรเจน (ข) การใช้กลีเซอรอลและเพอร์เซ็นต์ไบโอดีเซล (ค) อัตราการะบรทุกสารอินทรีย์และค่าความเป็นกรดต่าง	28
รูปที่ 6 ภาพถ่ายลักษณะของเซลล์ตรึง <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules ด้วยกล้อง Scanning Electron Microscopy (SEM) กำลังขยาย 75 เท่า (ก) โครงสร้างและลักษณะวัสดุฟอง กำลังขยาย 5000 เท่า (ข) เซลล์ตรึง <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราการะบรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน กำลังขยาย 5000 เท่า (ค)	35
รูปที่ 7 ภาพถ่ายเซลล์ตรึง <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราการะบรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน ด้วยกล้อง Confocal scanning microscopy (ก) เซลล์ตรึง <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules ย้อมด้วย DAPI (ข) เซลล์ตรึง <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 บน UASB granules ย้อมด้วย Cy3 labeled ENT183 probe บริเวณสีแดงคือเซลล์ <i>E. aerogenes</i> ATCC 13048 ที่ย้อมติดสีของ ENT183 probe (ค)	36
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล	54

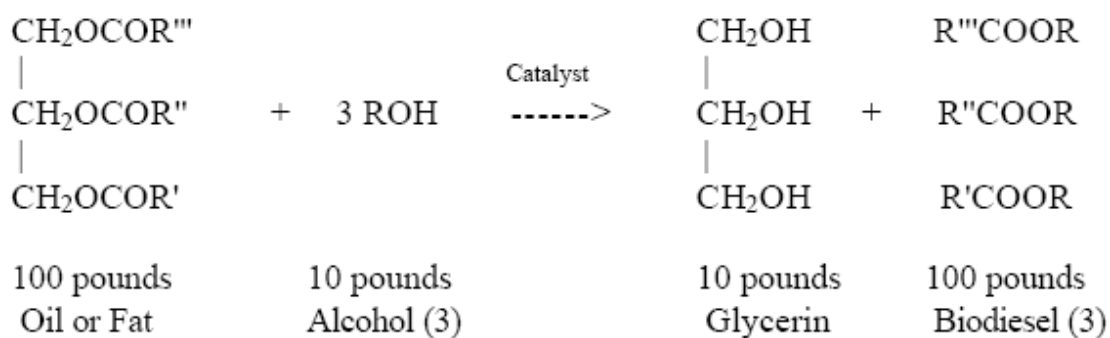
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันประเทศต่างๆทั่วโลกประสบกับปัญหาความผันแปรของราคาน้ำมันในตลาดโลกที่มีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องจากประเทศต่างๆโดยส่วนใหญ่แล้วไม่มีทรัพยากรน้ำมันธรรมชาติในประเทศ จึงจำเป็นต้องพึ่งพาประเทศอื่นๆ ที่สามารถส่งน้ำมันออกมาจำหน่ายได้ ซึ่งแหล่งทรัพยากรน้ำมันธรรมชาติเหล่านี้เป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วหมดไป จึงทำให้เกิดกระแสการผลิตพลังงานทดแทนจากวัตถุดิบชีวมวลมากขึ้น เช่น การผลิตก๊าซชีวภาพ และการผลิตไบโอดีเซล โดยประเทศไทยได้มีการสนับสนุนให้มีการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมเพื่อแก้ไขปัญหาการขาดแคลนน้ำมัน ปัจจุบันมีการผลิตไบโอดีเซลภายในประเทศประมาณ 150,000-200,000 ลิตรต่อวัน ทั้งนี้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลส่วนใหญ่เป็นกระบวนการทางเคมีผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (Tranesterification) หรือ เอสเทอร์ิฟิเคชัน (esterification) (รูปที่ 1) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้สารประกอบเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid methyl ester) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และได้กลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลิตภัณฑ์รองในอัตราส่วน 1:10 (กลีเซอรอล : ไบโอดีเซล) โดยน้ำหนัก ซึ่งหมายความว่าในแต่ละวันจะมีกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลประมาณ 15,000-20,000 ลิตร ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกลีเซอรอลสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง เช่น ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตเครื่องสำอาง ใช้แยกคีนเมทานอลจากเฟสไบโอดีเซลเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตไบโอดีเซล และอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้เป็นสารให้ความหวาน ผลิตเอทานอล การผลิตกรดซิตริก การผลิตพลาสติก เป็นต้น (Wikipedia, 2006) แต่อย่างไรก็ตามการส่งเสริมให้มีการผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคตมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น จึงอาจก่อให้เกิดปัญหาในการกำจัดกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตตามมา และงานวิจัยในปัจจุบันได้มีการใช้กลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทนอื่นๆ เช่น ในงานวิจัยของ Yang และคณะ (2008) พบว่าจุลินทรีย์จากกากตะกอนระบบบำบัดน้ำเสียสามารถใช้กลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบในการ

ผลิตมีเทนได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ Sakai และ Yagishita (2007) และ Ito และคณะ (2005) พบว่ากลีเซอรอลสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนได้



รูปที่ 1 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะนำกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนซึ่งก๊าซไฮโดรเจนเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของแหล่งพลังงานในอนาคตที่คาดว่าจะนำมาทดแทนพลังงานที่มีในธรรมชาติ (Akano และคณะ, 1996) เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด (clean energy) ในกระบวนการเผาไหม้ก๊าซไฮโดรเจนจะได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์จึงไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Yokoi และคณะ, 2002) อีกทั้งไฮโดรเจนให้ค่าพลังงานสูง โดย 1 กิโลกรัมของไฮโดรเจนให้พลังงานเท่ากับ 3.5 ลิตรของปิโตรเลียม (kruse และคณะ, 2002) ดังนั้นไฮโดรเจนจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับการผลิตกระแสไฟฟ้าและพลังงานเชื้อเพลิงเพื่อการคมนาคมขนส่งในอนาคต ซึ่งผลจากการทดลองนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในระดับขยายส่วนและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมคือกลีเซอรอลอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์โดยรวมของงานวิจัยนี้คือเพื่อให้ได้มาซึ่งกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่มีประสิทธิภาพจากกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์หลัก จึงแบ่งวัตถุประสงค์ย่อยออกเป็น 2 ข้อ คือ

- 1) เพื่อศึกษาการะบรทุกสารอินทรีย์ (organic loading rate: OLR) ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลโดยเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ upflow anaerobic sludge blanket (UASB)
- 2) เพื่อศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ (microbial communities) และโครงสร้างของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราการะบรทุกสารอินทรีย์ที่ให้ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) และ Scanning electron microscope (SEM)

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป กลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ สถาบันวิจัย สถาบันการศึกษาต่างๆ และนักวิจัยที่สนใจการผลิตพลังงานทดแทนโดยชีววิธี ได้แก่ ไฮโดรเจน

นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ กลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ โรงงานหรือผู้ประกอบการที่ผลิตไบโอดีเซลตลอดจนฝ่ายวางแผนและพัฒนาด้านสิ่งแวดล้อม พลังงาน และแหล่งทรัพยากรทดแทนเพื่อความมั่นคงทางด้านเศรษฐกิจและทรัพยากรภายในประเทศ

ลดปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อมและเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร กลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ ผู้ประกอบการอุตสาหกรรมเกี่ยวกับไบโอดีเซล นอกจากนั้นแล้วยังได้นักวิจัยระดับปริญญาเอกทางด้านการผลิตพลังงานทดแทนจำนวน 1 คน

1.4 สมมติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการวิจัยภายใต้สมมติฐานที่ว่ากลุ่มจุลินทรีย์ในตะกอนแบบไร้อากาศและ *E. aerogenes* ATCC 13048 เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตไฮโดรเจนที่ดีทำให้ได้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูง และถึงปฏิกรณ์แบบ UASB มีประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นเมื่อดำเนินการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB ภายใต้อุณหภูมิห้องโดยใช้ตะกอนกลุ่มจุลินทรีย์ร่วมกับ *E. aerogenes* ATCC 13048 เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิต และแปรผันค่า OLR ที่ระดับต่างๆ จะทำให้ได้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงและผลิตไฮโดรเจนได้อย่างต่อเนื่อง

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาหาวิธีการเพิ่มศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้ได้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงและผลิตได้อย่างต่อเนื่องโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ดำเนินการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB ภายใต้อุณหภูมิห้อง โดยใช้เซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิต แปรผันค่าภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (organic loading rate: OLR) ที่ระดับต่างๆ จนได้สภาวะที่ให้ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด จากนั้นศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ (microbial communities) และโครงสร้างของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่ให้ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) และ Scanning electron microscope (SEM) เพื่อให้ทราบถึงลักษณะโครงสร้างและกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนในกระบวนการหมัก (hydrogen producer)

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไฮโดรเจนและการใช้ประโยชน์

ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีความหนาแน่น 0.0899 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร (ไฮโดรเจนเหลวมีความหนาแน่น 70.99 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร) จุดหลอมเหลว -259.14 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือด -252.77 องศาเซลเซียส ในน้ำจะประกอบด้วยไฮโดรเจน 11.2% โดยน้ำหนัก หรือไฮโดรเจน 1 กิโลกรัม จะให้ค่าพลังงานเท่ากับ ก๊าซธรรมชาติ 2.1 กิโลกรัม หรือเท่ากับ แก๊สโซลีน 2.8 กิโลกรัม (Kruse และคณะ, 2002) ดังนั้นไฮโดรเจนจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับผลิตกระแสไฟฟ้าและพลังงานเชื้อเพลิงเพื่อการคมนาคมขนส่ง (Yokoi และคณะ, 2002) พลังงานไฮโดรเจนมีคุณสมบัติที่เหมือนพลังงานฟอสซิล (ถ่าน หิน น้ำมัน และก๊าซธรรมชาติ) คือเป็นเชื้อเพลิงได้ สามารถเผาไหม้ ให้พลังงานความร้อนใช้หุงต้มได้ หรือจะใช้สันดาปภายในเหมือนน้ำมันก็ได้ ไฮโดรเจนยังสามารถกลับมารวมตัวกับออกซิเจน สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้โดยตรง กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ใช้กับ fuel cell หรือเซลล์เชื้อเพลิง (Yokoi และคณะ, 2002) “เชื้อเพลิงไฮโดรเจน” เป็นแหล่งพลังงานหนึ่งที่มีความสนใจอย่างมากเนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาด (Clean Energy) ไม่ก่อให้เกิดมลพิษ (Akano และคณะ, 1996) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้มีประสิทธิภาพในปัจจุบันมีทั้งวิธีทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ เช่น วิธี Water electrolysis, Thermochemical processes, Radiolytic process และ Biological process (Lay และคณะ, 1999) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์จะไม่ก่อให้เกิดมลพิษเนื่องจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นผลผลิตทางชีวภาพที่ง่ายต่อการกำจัด นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตยังใช้ได้หลากหลาย และมีราคาถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพนั้นแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) Photosynthetic microorganisms เช่น สาหร่าย (Greenbaum, 1990) และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น *Rhodospirillum rubrum* (Zhu และคณะ, 1999; Miyake และคณะ, 1999;

Ruknonsaeng และคณะ, 2005) เป็นต้น และ 2) Fermentative hydrogen-producing microorganism ซึ่งส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ประเภท facultative anaerobes (Tanisho และ Ishiwata, 1995) และ obligate anaerobes (Dabrock และคณะ, 1992; Taguchi และคณะ, 1992; Tanisho, 1996) เช่น *Clostridium* sp. และ *Enterobacter* sp. เป็นต้น

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดและความเข้มข้นของ สับสเตรต ความเป็นกรดต่าง ระยะเวลาการกักเก็บ อุณหภูมิ อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ ชนิดและความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่าย เป็นต้น ซึ่งสภาวะเหล่านี้มีผลกระทบต่อความสมดุลของระบบ เมตาบอลิซึม ดังนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากระบวนการหมักจึงขึ้นอยู่กับสภาวะของสิ่งแวดล้อมที่ แบคทีเรียเจริญอยู่ และผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากระบบการหมัก เช่น เอทานอล บิวทานอล และแลคเตท จะมีไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เพียงแต่ไม่ถูกปลดปล่อยออกมาในรูปก๊าซ

2.2.1 ชนิดและปริมาณของสับสเตรต

ชนิดและปริมาณของสับสเตรตมีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพโดย สับสเตรตส่วนใหญ่มักจะเป็นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นแหล่ง พลังงานของสิ่งมีชีวิต (Kapdan และ Kargi, 2006) โดยทั่วไปจุลินทรีย์ต้องการสับสเตรตเพื่อช่วยใน กระบวนการเมตาบอลิซึมและต้องมีปริมาณสับสเตรตที่เหมาะสมจึงจะสามารถส่งเสริมการเจริญของ จุลินทรีย์และเกิดผลผลิตที่สูงได้ จากรายงานของ Chen และคณะ (2005) ที่ศึกษาการผลิตไฮโดรเจน จาก *C. butyricum* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสับสเตรต พบว่าปริมาณซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อ การผลิตไฮโดรเจนคือ 20 กรัมซีโอดีต่อลิตร หรือ 17.8 กรัมต่อลิตร สามารถให้ผลได้ไฮโดรเจนเท่ากับ $2.91 \text{ mol H}_2/\text{mol sucrose}$ ถ้าเพิ่มปริมาณซูโครสสูงถึง 30 กรัมซีโอดีต่อลิตร ทำให้อัตราการผลิต ไฮโดรเจนลดลง โดยมีผลได้ไฮโดรเจนเท่ากับ $1.73 \text{ mol H}_2/\text{mol sucrose}$ และนอกจากนั้นยังม ีงานวิจัยที่พบว่าความเข้มข้นขานอ้อยที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ที่ระดับน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 20.0 กรัมซีโอ ดีต่อลิตร จะส่งผลให้ *C. butyricum* ผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุดเท่ากับ $1.73 \text{ mol H}_2/\text{mol total sugar}$

และเมื่อแปรผันระดับความเข้มข้นของขานอ้อยที่ผ่านการไฮโดรไลซ์สูงขึ้นจะส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (Pattra และคณะ, 2008) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดและปริมาณของสับสเตรทมีผลต่อกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยจะส่งผลทั้งในรูปของการส่งเสริมเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสมและยับยั้งเมื่อมีความเข้มข้นที่สูงเกินความต้องการของจุลินทรีย์

2.2.2 สภาวะความเป็นกรดต่าง และกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acids, VFAs)

สภาวะความเป็นกรดต่างมีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากความเป็นกรดต่างมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Zheng และ Yu, 2005) Kumar และ Das (2000) พบว่าการผลิตไฮโดรเจนของ *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 ที่ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 4 และ 5 จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 70.9 และ 117.5 mmolH₂ ตามลำดับ และในระหว่างการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนดังกล่าว ผลผลิตที่เกิดขึ้นคือ กรดไขมันระเหยง่าย ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ (Kapdan และ Kargi, 2006) ซึ่งถ้ามีกรดไขมันระเหยง่ายในน้ำหมักในปริมาณที่มากเกินไปก็มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรดต่างในกระบวนการหมักและในเซลล์ของจุลินทรีย์ คือเมื่อกรดไขมันระเหยง่ายมีปริมาณมากก็สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ทำให้สภาวะกรดต่างในเซลล์ลดลงทำให้จุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานในการปรับสภาวะกรดต่างของเซลล์ให้สมดุลโดยการปั๊มไอออนเข้าออกจากเซลล์ เช่น โปรแตสเซียมปั๊ม ทำให้พลังงานของเซลล์ไม่พอในการสร้างเซลล์จุลินทรีย์ใหม่หรือบางเซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถปรับสภาวะกรดต่างก็ทำให้เซลล์แตกและทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง (Zheng และ Yu, 2005) จากการศึกษาของ Zheng และ Yu (2005) พบว่าผลได้ของไฮโดรเจนจะลดลงจาก 1.85 ไปที่ 0.32 mol H₂/mol glucose เมื่อเติมกรดบิวทริกที่ความเข้มข้นระหว่าง 4.18 ถึง 25.08 กรัมต่อลิตร ในส่วนของกรดอะซิติกก็แสดงผลการต่อการผลิตไฮโดรเจนเช่นเดียวกับกรดบิวทริก (Zheng และ Yu, 2005)

2.2.3 แหล่งอาหารเสริม

ในเซลล์แบคทีเรียทุกชนิดจะประกอบไปด้วยธาตุที่สำคัญคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน และซัลเฟอร์ โดยแบคทีเรียที่ใช้อากาศต้องการปริมาณไนโตรเจนต่อ

น้ำหนักเซลล์เท่ากับ 9.4 (Cell weight/N = 9.4) ในขณะที่แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศจะสร้างเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากได้ เมื่อมีอัตราส่วนของธาตุไนโตรเจนต่อคาร์บอนในสารอาหารประมาณ 0.0620 และยังต้องการธาตุฟอสฟอรัสเท่ากับ 1 ใน 7 ของปริมาณธาตุไนโตรเจนที่ประกอบในเซลล์ โดยทั่วไปความต้องการธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัสจะอยู่ในอัตราส่วน 11 ต่อ 2 จากรายงานของ Dabruck และคณะ (1992) พบว่า Fe^{+2} มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน (hydrogenase enzyme) โดยเมื่อความเข้มข้นของ Fe^{+2} ลดลงจะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Saraphirom และ Reungsang, 2010)

2.2.4 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการกักเก็บ (Hydraulic retention time, HRT) ต่อการผลิตไฮโดรเจน

อุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเจริญของแบคทีเรียและมีผลต่ออัตราการเปลี่ยนสับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมัก (Lee และคณะ, 2004) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนโดยเชื้อบริสุทธิ์ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* sp. และ *Enterobacter* sp. อยู่ในช่วง 37 – 45 องศาเซลเซียส (Lee และคณะ, 2004) ส่วนในการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อผสม เช่น anaerobic sludge จะอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ mesophilic (20-42 องศาเซลเซียส) ถึง thermophilic (42-75 องศาเซลเซียส) ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเชื้อผสม (mixed culture) (Lee และคณะ, 2004) ส่วนระยะเวลาการกักเก็บคือเวลาที่สับสเตรตอยู่ในถังหมัก และระยะเวลากักเก็บที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากสับสเตรต เช่น กลูโคส หรือซูโครสโดยการหมักแบบต่อเนื่องจะอยู่ในช่วง 8-12 ชั่วโมง โดยกลุ่มแบคทีเรียจากตะกอนบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (Hawkes และคณะ, 2002) และเมื่อแปรผันระยะเวลาการกักเก็บ HRT จาก 36 ชั่วโมงเป็น 24 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนจากน้ำอ้อยโดย *C. butyricum* ภายใต้กระบวนการหมักแบบ CSTR มีค่าลดลง โดยที่ HRT เท่ากับ 4 ชั่วโมงจะให้ค่าผลได้ไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1.0 mol H_2 /mol hexose และ 3.38 mol H_2 /L h ตามลำดับ (Pattru และคณะ, 2010)

2.2.5 ผลของอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ (Organic loading rate, OLR)

อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ภายในระบบการหมัก หากมีการป้อนสารอินทรีย์เข้าระบบมากเกินไปจะทำให้การย่อยสลายสารอินทรีย์ลดลง เนื่องจากแบคทีเรียบางส่วนถูกทำลายไปเพราะสภาพที่ไม่สมดุล ในทางตรงกันข้ามหากมีการป้อนสารอินทรีย์เข้าสู่ระบบน้อยเกินไป จะทำให้การใช้ถังหมักไม่เต็ม ประสิทธิภาพไม่คุ้มค่าในการลงทุน และยังส่งผลให้แบคทีเรียในระบบปรับตัวเข้ากับสภาพสารอินทรีย์ที่มีปริมาณต่ำ ซึ่งอาจจะทำให้ระบบล้มเหลวตามมา แต่อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์จะแตกต่างกันไปตามธรรมชาติและชนิดของสับสเตรท จึงจำเป็นต้องมีการปรับค่าอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ให้เหมาะสมตามชนิดของสับสเตรทที่ใช้ด้วย

2.3 ไบโอดีเซล

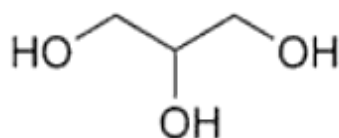
ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นเชื้อเพลิงดีเซลที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรชีวภาพที่ใช้แล้วไม่หมดไป เช่น น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือสาหร่าย ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงดีเซลอีกทางเลือกหนึ่ง นอกเหนือจากน้ำมันดีเซลที่ผลิตจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียม มีคุณสมบัติและค่าพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้เหมือนกับดีเซลจากปิโตรเลียม จึงสามารถใช้แทนกันได้ (Wikipedia, 2006) นอกจากนี้สารมลพิษที่เกิดจากการเผาไหม้ไบโอดีเซล ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน จะมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเผาไหม้ดีเซลจากปิโตรเลียม คุณสมบัติสำคัญของไบโอดีเซลคือสามารถย่อยสลายได้เองตามกระบวนการทางชีวภาพในธรรมชาติ (biodegradable) และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Nontoxic) (Wikipedia, 2006)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของน้ำมันโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) หรือ เอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) ดังรูปที่ 1 ในสถานะที่มีแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล ซึ่งจะเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในน้ำมันเป็นไบโอดีเซลในรูปของสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl ester) และกลีเซอรอล โดยใช้สารเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) (Fukada และคณะ, 2001) โดยที่สารเร่งปฏิกิริยาที่นิยม

นำมาใช้ในการผลิตมี 2 ประเภทด้วยกันคือ 1) สารเคมี ได้แก่สารเคมีจำพวกกรด และด่าง ตัวอย่างสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น กรดซัลฟิวริก กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก เป็นต้น และสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นด่างได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และสารประกอบอัลคอกไซด์ชนิดต่างๆ (Fukuda และคณะ, 2001; Nouredдини และ Zhu, 1997) 2) เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่นำมาใช้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส (lipase) หรือเรียกอีกชื่อว่าเอนไซม์กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) (Watanabe และคณะ, 2006) จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันจะเห็นว่าการผลิต ไบโอดีเซล 10 ส่วนจะได้กลีเซอรอล 1 ส่วน ดังนั้นจากกำลังการผลิตไบโอดีเซลที่มากถึง 150,000-200,000 ลิตรต่อวัน จะได้ผลพลอยได้ซึ่งเป็นกลีเซอรอลสูงถึง 15,000-20,000 ลิตรต่อวัน ซึ่งในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลโดยส่วนใหญ่จะเป็นการเผาเพื่อเป็นเชื้อเพลิง ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตเครื่องสำอาง และใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตไบโอดีเซล เป็นต้น (Ito และคณะ, 2005)

2.4 กลีเซอรอล

กลีเซอรอล หรือ 1,2,3 โพรเพนไตรออล (รูปที่ 2) เป็นสารประกอบอินทรีย์พวกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เป็นของเหลวข้น ไม่มีสี มีจุดเดือด 290 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ กลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบสำคัญของไขมันหรือน้ำมัน เรียกอีกชื่อหนึ่งว่ากลีเซอริน ใช้ในอุตสาหกรรมทำยาเครื่องสำอาง สบู่ เป็นต้น คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอลแสดงในตารางที่ 1



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล (Pagliaro และ Michele, 2008)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

(Pagliaro และ Michele, 2008)

สูตรเคมี	$C_3H_5(OH)$
มวลโมเลกุล	92.09382 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น	1.261 กรัมต่อมิลลิลิตร
ความหนืด	1.5 ปาสคาล วินาที
จุดหลอมเหลว	18.2 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	290 องศาเซลเซียส
ค่าพลังงาน	4.32 กิโลแคลอรี
แรงตึงผิว	160 องศาเซลเซียส
สัมประสิทธิ์อุณหภูมิ	64.00 มิลลินิวตันต่ออนาที

2.4.1 กลีเซอรอลและการใช้ประโยชน์

อุตสาหกรรมการผลิตกลีเซอรอลเริ่มต้นขึ้นระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 1 เนื่องจากราคาของ โพรไพลีนที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตสารเคมีหลายชนิดมีราคาเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ประเทศที่พัฒนาแล้วหลายๆประเทศหันมาสนใจผลิตกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตสารเคมีแทน ทำให้การผลิตกลีเซอรอลเป็นไปอย่างกว้างขวาง กลีเซอรอลเป็นสารประกอบอินทรีย์พวกแอลกอฮอล์ที่นำมาใช้ประโยชน์ได้หลายทาง เช่นใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมผลิตสี อุตสาหกรรมเครื่องยนต์ การผลิตอาหาร การผลิตยาสูบ อุตสาหกรรมในการทำกระดาษและเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมผลิตยา และเครื่องหนัง (ตารางที่ 2) หรือใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตสารเคมี เป็นต้น และในปัจจุบันได้มีการนำกลีเซอรอลมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหมัก เช่นการผลิต 1,3-propanediol (Biebl, 2001) เพื่อใช้เป็นองค์ประกอบเคมีในการผลิต polytrimethylene terephthalate (PTT) ซึ่งเป็น polyester ชนิดใหม่ที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิต fiber และ textile เนื่องจากมีความคงทนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การผลิต

dihydroxyacetone โดยใช้ *Acetobacter suboxidans* ที่เป็นสารเสริมความหวานในอุตสาหกรรมอาหาร (Ito และคณะ, 1991)

ตารางที่ 2 การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล (Wang และคณะ, 2001)

การใช้ประโยชน์	เปอร์เซ็นต์การใช้ประโยชน์			
	สหรัฐอเมริกา (160.000 ตันต่อปี)	ยุโรป (190.000 ตันต่อปี)	ญี่ปุ่น (50.000 ตันต่อปี)	จีน (80.000 ตันต่อปี)
ยา	39.5	23.1	34.0	5.2
ยาสูบ	15.8	2.5	5.3	7.3
Glycerintriacetate	-	14.4	-	-
อาหาร	14.5	5.6	-	-
Polyether	10.5	13.1	11.6	5.2
alcohol	9.2	13.1	19.5	49.0
สี	2.0	4.4	3.8	1.5
กระดาษแก้ว	0.6	3.1	1.9	3.1
ระเบิด	-	-	-	16.0
ยาสีฟัน	-	-	-	6.3
เครื่องสำอาง	7.9	20.6	23.9	7.2
อื่นๆ				

2.4.2 กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และการใช้ประโยชน์

จากการสนับสนุนให้มีการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมเพื่อแก้ไขปัญหาการขาดแคลนน้ำมัน ทำให้ปัจจุบันมีการผลิตไบโอดีเซลภายในประเทศประมาณ 150,000-200,000 ลิตรต่อวัน ซึ่งกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะได้กลีเซอรอลเหลือทิ้งประมาณ 15,000-20,000 ลิตรต่อวัน จากการสนับสนุนที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ปริมาณกลีเซอรอลเหลือทิ้งที่มีปริมาณที่สูงขึ้นตามไปด้วยจึงอาจส่งผลให้เกิดปัญหาในการกำจัดตามมา และเมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของกลีเซอรอลเหลือทิ้งจาก

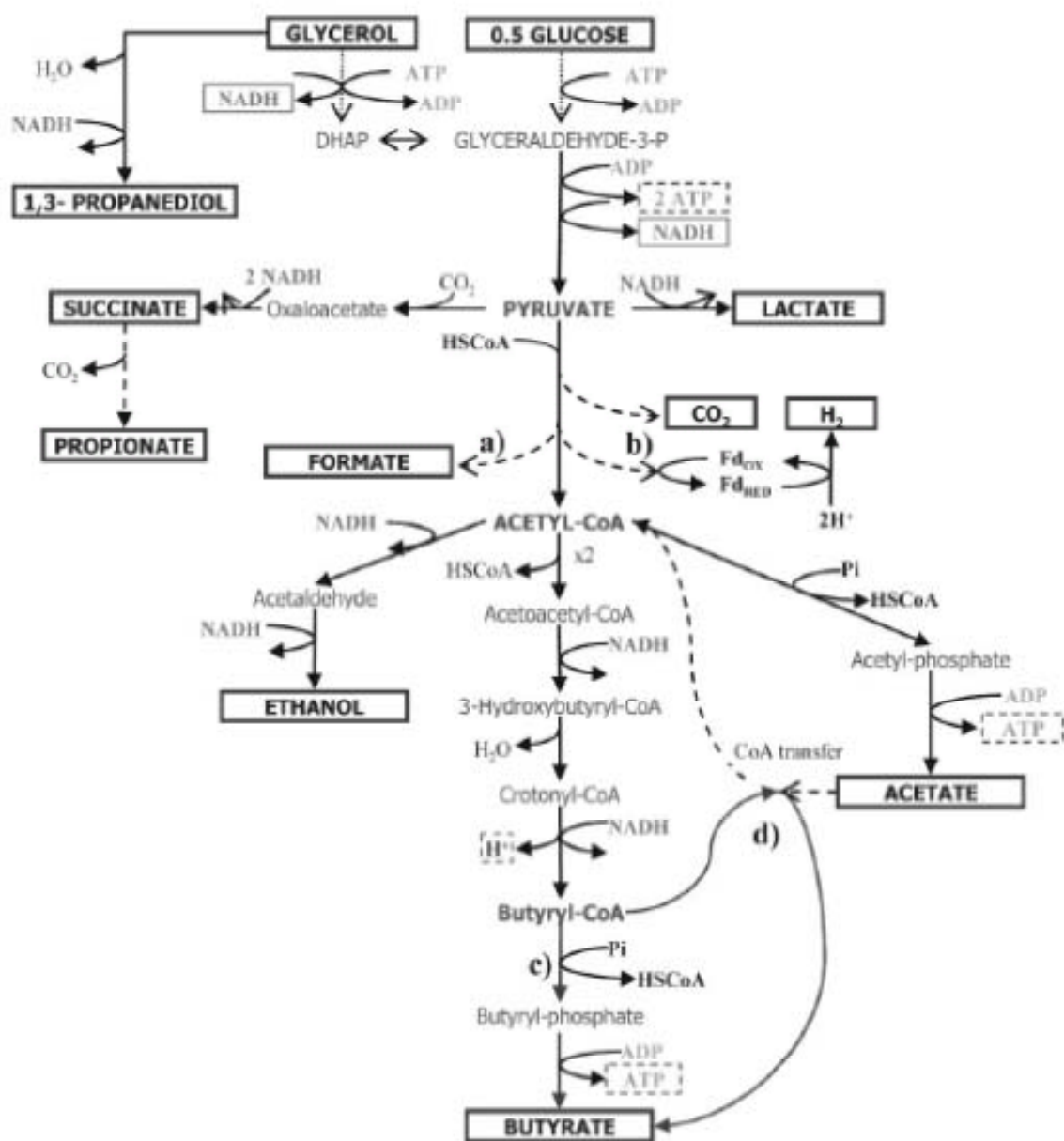
กระบวนการผลิตไบโอดีเซลดังแสดงในตารางที่ 3 จะพบว่ากลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

(Ito และคณะ, 2005)

องค์ประกอบ	ปริมาณ
กลีเซอรอล	41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
ไดเอซิลกลีเซอรอล	0.04 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
โมนโอเอซิลกลีเซอรอล	0.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
ปริมาณเถ้าทั้งหมด	8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร
เมทานอล	25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลเหลือทิ้งในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ตัวอย่างเช่น การผลิต 1,3-propanediol โดย *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasturianum* (Bouvet และคณะ, 1995; Biebl, 2001) ผลิตเอทานอลและกรดฟอร์มิกโดย *Klebsiella planticola* (Jarvis และคณะ, 1997) ผลิตกรดโพรไพโอนิกโดย *Propionibacteria acidipropionici* และ *P. freudenreichii* (Zheng และ Yu, 2005) การผลิตกรดซักซินิกโดย *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Lee และคณะ, 2004) การผลิตมีเทนภายใต้อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิห้องโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบ fixed-bed (Yang และคณะ, 2008) และการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลโดยใช้ *E. aerogenes* NBRC 12010 (Sakai และ Yagishita, 2007) *E. aerogenes* HU-101 (Ito และคณะ, 2005) และกลุ่มตะกอนจุลินทรีย์จากโรงงานผลิตอาหารในทะเล (พงศธรและอมารสี, 2008) เป็นต้น โดยวิธีในการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลโดยกลุ่มจุลินทรีย์สามารถจำแนกได้ 2 เส้นทาง (รูปที่ 3) ประกอบด้วย



รูปที่ 3 วิธีการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลโดยกลุ่มจุลินทรีย์ (Margarida และคณะ, 2008)

เส้นทางแรกกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) โดยเอนไซม์ glycerol dehydrate จากนั้น 3-HPA จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 1,3 propanediol โดยเอนไซม์ 1,3-PDO dehydrogenase และเส้นทางที่สองกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate และเข้าสู่ glycolytic pathway เหมือนกับกลูโคส ซึ่ง pyruvate ดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางได้สาม

เส้นทาง เส้นทางแรกถูกเปลี่ยนไปเป็น lactic acid เส้นทางที่สองเปลี่ยนไปเป็น propionic acid และเส้นทางที่สามเปลี่ยนไปเป็น Acetyl-CoA ซึ่งในการเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA จะมีการสร้าง formic acid, ethanol และ acetate เกิดขึ้นพร้อมกัน ในขั้นตอนนี้ formic ที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยได้ เป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ formate dehydrogen-lyase (Gottschalk, 1988) และท้ายสุด Acetyl-CoA จะถูกเปลี่ยนไปเป็น butyric acid ต่อไป (Margarida และคณะ, 2008)

2.5 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)

ระบบยูเอเอสบี (Upflow Anaerobic Sludge Blanket: UASB) หรือ ระบบชั้นตะกอน จุลินทรีย์ไร้อากาศแบบไหลขึ้น เป็นระบบหนึ่งของระบบบำบัดทางชีววิทยา โดยอาศัยการทำงานของ จุลินทรีย์แขวนลอย ซึ่งมีการพัฒนาให้เกาะตัวกันในลักษณะเป็นเม็ดตะกอน (granule) ระบบนี้อาศัย การกวนผสมที่เกิดจากการไหลของน้ำเสียที่ป้อนเข้าถังปฏิกรณ์จากด้านล่างไหลขึ้นสู่ด้านบน (Up-flow Feeding) โดยหัวใจสำคัญของระบบยูเอเอสบีอย่างหนึ่งคือ เม็ดตะกอนจุลินทรีย์ในระบบที่ เจริญเติบโตอยู่ในลักษณะแขวนลอยซึ่งอาศัยการยึดเกาะกันเองของจุลินทรีย์ (Self-Immobilization) หรือเรียกว่าเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ (granule) จากคุณสมบัติและลักษณะการทำงานของถังยูเอเอสบี ทำให้สามารถแบ่งส่วนประกอบภายในถังยูเอเอสบีได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นถังปฏิกริยาพร้อมด้วย ระบบกระจายน้ำเสียซึ่งจะอยู่ทางด้านล่างของถังและส่วนตกตะกอนและแยกก๊าซบริเวณด้านบน โดย มีกลไกและลักษณะการทำงานของส่วนต่างๆ ดังนี้

2.5.1 ส่วนที่เกิดปฏิกิริยา

ส่วนที่เกิดปฏิกิริยาจะอยู่ทางด้านล่างของถังซึ่งเป็นส่วนที่เกิดการย่อยสลายสารอินทรีย์ การไหลของน้ำเสียในถังจะเป็นการไหลจากด้านล่างขึ้นด้านบน การป้อนน้ำเสียจะป้อนเข้าทาง ด้านล่างของถังยูเอเอสบีผ่านทางระบบการกระจายน้ำเสีย ซึ่งการกระจายน้ำเข้าถังจะเป็นไปอย่าง สม่าเสมอทั้งหน้าตัดของถัง การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในถังยูเอเอสบีจะควบคุมให้ตะกอนสะสมเป็นชั้น ตะกอนที่มีความหนาแน่น น้ำเสียที่ต้องการบำบัดจะไหลผ่านชั้นตะกอน แบคทีเรียในชั้นตะกอนซึ่งอยู่

กันอย่างหนาแน่นจะเกิดการรวมกันเป็นเม็ด (granule) โดยเม็ดตะกอนที่มีความหนาแน่นสูงจะจมตัวอยู่ด้านล่าง มีการจัดเรียงตัวจากขนาดใหญ่ขึ้นไปหาเล็ก ส่วนกลุ่มที่มีความหนาแน่นต่ำ ซึ่งมีความเร็วในการจมตัวต่ำกว่าฟุ้งกระจายขึ้นมาเป็นชั้นตะกอนแขวนลอย โดยฟองก๊าซที่เกิดขึ้นและการไหลของน้ำที่เข้ามาจากด้านล่างของถังจะช่วยทำให้เกิดการผสมขึ้น

2.5.2 ส่วนตกตะกอนและแยกก๊าซ

ส่วนตกตะกอนเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมและลดปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่หลุดออกไปกับน้ำทิ้ง และส่วนแยกก๊าซจะทำหน้าที่รวบรวมก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น ซึ่งส่วนนี้จะติดตั้งไว้ด้านบนของถัง ซึ่งจะเรียกว่าเป็นอุปกรณ์ Gas-Solid Separator หรือ GSS โดยการออกแบบลักษณะของส่วนตกตะกอนและแยกก๊าซขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของถังปฏิกรณ์

2.6 องค์ประกอบของระบบยูเอเอสบี

2.6.1 ส่วนของตะกอนชั้นล่าง (Sludge bed) เป็นชั้นตะกอนจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตกตะกอนสูงเนื่องจากเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เกาะตัวกันอย่างหนาแน่น ทำให้มีความหนาแน่นสูงและนอกจากนั้นกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวยังมีความสามารถในการย่อยสลายสารอินทรีย์สูงด้วย

2.6.2 ส่วนชั้นตะกอนลอย (Sludge blanket) เป็นชั้นที่ตะกอนจุลินทรีย์มีการเกาะรวมตัวกันอย่างหลวมๆทำให้ลอยฟุ้งกระจายอยู่ในระบบ และนอกจากนั้นการฟุ้งกระจายยังเกิดขึ้นเนื่องจากก๊าซชีวภาพที่เกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ของกลุ่มตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ

2.6.3 ส่วนของอุปกรณ์แยกเม็ดตะกอนและก๊าซชีวภาพออกจากของเหลว หรือ Gas-Liquid-Solid Separator (GLSS) เป็นอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่แยกก๊าซชีวภาพออกจากของผสมระหว่างก๊าซชีวภาพ น้ำและเม็ดตะกอนจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ถูกแยกจะตกกลับเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ น้ำเสียจะไหลออกสู่ส่วนระบายน้ำเสียด้านบน ส่วนก๊าซชีวภาพจะถูกรวบรวมเพื่อนำไปใช้ต่อไป

2.6.4 ส่วนของอุปกรณ์ในการตกตะกอน (Settlement compartment) ในอุปกรณ์นี้เม็ดตะกอนจุลินทรีย์ซึ่งแยกออกจากน้ำเสียจะตกลงสู่ด้านล่างของถังปฏิกรณ์ โดยอาศัยแรงโน้มถ่วงที่เกิดจากน้ำหนักของเม็ดตะกอนเอง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเม็ดตะกอนคายก๊าซที่เป็นตัวพาให้เคลื่อนที่ขึ้นสู่

ด้านบนของถังปฏิกรณ์ออกไปแล้ว ทำให้สูญเสียแรงดันที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของก๊าซไป ทำให้แรงโน้มถ่วงของเม็ดตะกอนเองมีค่ามากกว่าแรงลอยตัวของเม็ดตะกอน ดังนั้นเม็ดตะกอนจึงตกกลับเข้าสู่ส่วนล่างของถังปฏิกรณ์ตามเดิม

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สัมสเตรท

สัมสเตรทที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ จากบริษัท Ajax Finechem และ กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล บริษัทกรุงเทพโปรดิวซ์ จำกัด อำเภอกำแพงคอย จังหวัด สระบุรี จากนั้นนำกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล ปริมาณเกลือทั้งหมด (Sodium ion-selective meter) ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส และค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้น (pH meter) โดยองค์ประกอบของกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลแสดง ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
กลีเซอรอล	441.30
ไนโตรเจน	0.50
ฟอสฟอรัส	0.05
เกลือ (NaCL)	10.01
เมทานอล	230.00
สบู่	17.65

3.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

3.2.1 กล้าเชื้อจุลินทรีย์

กล้าเชื้อจุลินทรีย์เป็นตะกอนกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบ UASB จากบริษัท บุญรอดบริวเวอรี่ จำกัด (เปียร์สิงห์) อำเภอท่าพระ จังหวัดขอนแก่น ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพ จากนั้นนำตะกอนจุลินทรีย์มาทำการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตก๊าซมีเทนโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเก็บเกี่ยวเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีการสร้างสปอร์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน โดยความเข้มข้นของกลุ่มจุลินทรีย์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 32.45 g-Volatile suspended solid/L (g-VSS/L)

จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ได้ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอล นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร nutrient broth (NB) (ตารางที่ 5) ที่ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 โดยบ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 50 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1.50×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 5 สูตรอาหาร NB

สารอาหาร	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
Peptone	10.00
Meat extract	10.00
Sodium chloride	5.00

3.3 การตรึงเซลล์ *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules

นำ UASB granules ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และเซลล์ *E. aerogenes* ATCC 13048 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB ขนาด 500 มิลลิลิตร (ปริมาตรทำการ 450

มิลลิลิตร และส่วนของแก๊ส 50 มิลลิลิตร) เติมหาอาหารสูตรกลีเซอรอล (ตารางที่ 6) ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 จนเต็มปริมาตรทำการ (450 มิลลิลิตร) จากนั้นปิดบริเวณส่วนบนของถังหมักด้วย rubber stopper และทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศโดยพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ *E. aerogenes* ATCC 13048 ดูดซับลงบน UASB granules

ตารางที่ 6 สูตรอาหารกลีเซอรอลที่ใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

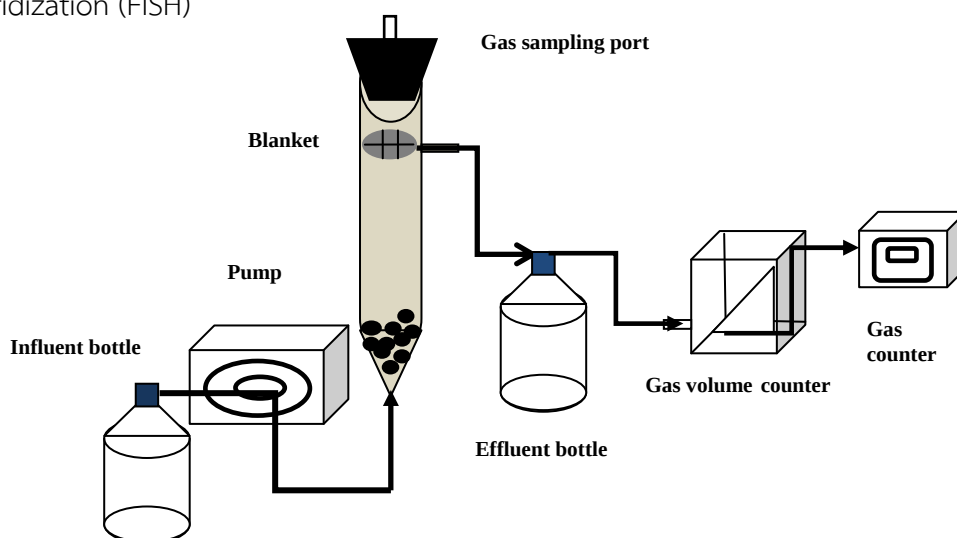
สารอาหาร	ความเข้มข้น
Glycerol (กรัมต่อลิตร)	25
Urea (กรัมต่อลิตร)	0.2
Na ₂ HPO ₄ (กรัมต่อลิตร)	0.02
NH ₄ HCO ₃ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	5420
K ₂ HPO ₄ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	125
MgCl ₂ 6H ₂ O (มิลลิกรัมต่อลิตร)	100
FeSO ₄ 7H ₂ O (มิลลิกรัมต่อลิตร)	25
CuSO ₄ 5H ₂ O (มิลลิกรัมต่อลิตร)	5
CoCl ₂ 5H ₂ O (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.125

3.4 การผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB โดยเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB (รูปที่ 4) โดยเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ดำเนินการทดลองโดยแปรผันค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (organic loading rate: OLR) เป็น 25, 32.5 50, 62.5 และ 75 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ (ดูการคำนวณ OLR ได้ในภาคผนวก ก) ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ใช้ใน

กระบวนการหมักโดย 1 N HCl และ 1 N NaOH ให้มีค่าเท่ากับ 5.5 บมที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์ระหว่างการทดลองคือ ปริมาตรก๊าซโดยใช้ gas counter ชนิดและความเข้มข้นของก๊าซที่เกิดขึ้นได้แก่ ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน และไนโตรเจน โดยใช้ Gas chromatography (GC) ปริมาณและความเข้มข้นกลีเซอรอล กรดไขมันระเหยง่าย และ 1,3-propanediol ในน้ำหมักโดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) แปรผันค่าอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ เมื่ออัตราการผลิตไฮโดรเจน เปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้นจากระบบการหมักมีค่าคงที่หรือเปลี่ยนแปลงไม่เกิน ± 10 เปอร์เซ็นต์ ในขั้นตอนแรกจะดำเนินระบบโดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นสับสเตรทเมื่อได้อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสมโดยการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์แล้วจึงดำเนินการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยดำเนินการทดลองที่อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสมและที่อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่สูงและต่ำกว่าหนึ่งระดับ

เก็บตัวอย่างเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสมเมื่อใช้กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งสับสเตรท แล้ววิเคราะห์โครงสร้างของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 โดย scanning electron microscope (SEM) และวิเคราะห์กลุ่มประชากรของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค fluorescent in situ hybridization (FISH)



รูปที่ 4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB

3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างและกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ของเซลล์ *E. aerogenes* ATCC 13048

บน UASB granules

ศึกษาโครงสร้างของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules โดย SEM ตามวิธีการของ Rachman และคณะ (1998) และศึกษากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules โดยใช้เทคนิค FISH เพื่อให้ทราบถึงประชากรจุลินทรีย์ในเซลล์ตรึง *E. aerogenes* บน UASB granules และกลุ่มประชากรที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนที่อยู่ในวัสดุพอง (UASB granules) ทำการทดลองโดยนำส่วน outer layer (biofilm) ของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules มาตรึงด้วย 4% paraformaldehyde ตามวิธีการของ Amann และคณะ (1996) จากนั้นนำเซลล์ที่ตรึงแล้วมาวางลงบน teflon-coated glass slides ทิ้งไว้ให้แห้ง และทำการ dehydrated โดยใช้ 50% 80% และ 98% ethanol ตามลำดับ ทำทั้งหมด 3 รอบ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยใช้ oligonucleotide probe ที่ติดด้วยสารเรืองแสง sulfoindocyanine dyes Cy3 หรือ Cy5 โดย oligonucleotide probe ที่ใช้ประกอบไปด้วย EUB338 probe (EUB338I, II, III) เป็นโพรบที่จับกับกลุ่มประชากรแบคทีเรียทั้งหมด (Daims และคณะ 1999) ARCH915 probe เป็นโพรบที่ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม Archea (Stahl และคณะ 1991) GAM42a probe เป็นโพรบที่ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม γ -Proteobacteria (Manz และคณะ 1992) ALF1b probe เป็นโพรบที่ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม α -Proteobacteria (Manz และคณะ 1996) CF319 probe เป็นโพรบที่ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม cytophaga (Flavobacterium) (Manz และคณะ 1996) LGC354 probe เป็นโพรบที่ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม Firmicutes (gram-positive bacteria with low G+C DNA content) ซึ่งประกอบด้วย *Clostridium* sp. *Bacillus* sp. *Dialister* sp. acidobacteria และ *Enterobacter* sp. (Stahl และคณะ 1991) HoAc1402 probe เป็นโพรบที่ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่มที่ผลิตกรด acidobacteria (Roller และคณะ 1994) และ ENT183 probe เป็นโพรบที่ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacter* sp. จากนั้นนำไปส่องและถ่ายภาพโดยใช้กล้อง

confocal laser scanning microscope รุ่น Zeiss LSM 510 (Thornwood, NY) นับจำนวนประชากรทั้งหมดโดยใช้การติดสีย้อมของ dye 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI)

3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายและแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง HPLC

3.6.1.1 เก็บตัวอย่างน้ำมันจากถังหมักขาออก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วย 0.2 มิลลิลิตรของ 35% H_3PO_4 เพื่อตกตะกอนและนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำมันที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที เติมกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.2 N เพื่อรักษาสภาพของกรดไขมันระเหยง่ายและแอลกอฮอล์ ตัวอย่างที่ผ่านการตรึงด้วยกรดออกซาลิกจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายและแอลกอฮอล์

3.6.1.2 วิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายและแอลกอฮอล์โดยเครื่อง HPLC SHIMADZU โดยสถานะของการวิเคราะห์คือใช้ 4 mM H_2SO_4 เป็น mobile phase มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส และใช้ Ultraviolet detector (210 nm) และ refractive index detector

3.6.1.3 คำนวณความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายและแอลกอฮอล์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

3.6.2 การวัดปริมาตรก๊าซ เก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจน

3.6.2.1 การวัดปริมาตรก๊าซที่เกิดขึ้นในการทดลองแบบต่อเนื่องโดยวิธี Water displacement (Rabe และคณะ 2010)

3.6.2.2 ต่อสายยางวัดปริมาตรก๊าซจากถังหมักกับเครื่อง gas counter ที่อาศัยหลักการวัดปริมาตรก๊าซโดยการแทนที่น้ำ แต่ในระหว่างสายยางที่ต่อกับถังหมักกับเครื่อง gas counter นำหลอดแก้ว 3 ทาง (U-tube) มาต่อไว้เพื่อเป็นตำแหน่งเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณแก๊ส

3.6.2.3 การบันทึกปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้น ทำโดยการคูณจำนวนครั้งของเครื่อง gas counter ที่นับได้ด้วยการแทนที่น้ำในเครื่อง gas counter โดยไปโอแก๊สที่ผลิตขึ้นในกระบวนการหมัก (1 ครั้งเท่ากับ 120 มิลลิลิตร)

3.6.2.4 การเก็บตัวอย่างก๊าซวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนโดยใช้ไซริงเก็บก๊าซดูดจากบริเวณส่วนเก็บก๊าซ ซึ่งอยู่บริเวณด้านบนของถังหมัก จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วฉีดในขวดเก็บตัวอย่างก๊าซขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนแล้ว จากนั้นก็นำขวดเก็บตัวอย่างก๊าซนำไปวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-2014 SHIMADZU ต่อไป

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่อง GC-2014 SHIMADZU

3.6.3.1 การวัดปริมาณแก๊สโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-2014 SHIMADZU โดยจัดสภาวะของการวิเคราะห์คือ ก๊าซฮีเลียม เป็นก๊าซพาหีอัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อนาที injector temperature 150 องศาเซลเซียส column 145 องศาเซลเซียส และ flam ionization detector temperature 150 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์แต่ละครั้งใช้ปริมาตรตัวอย่างก๊าซ 1 มิลลิลิตร

3.6.3.2 คำนวณปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่ได้โดยเทียบกับปริมาณก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐาน

3.6.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอลโดยวิธี chromatropic acid (ปรับปรุงจาก Handel และคณะ, 2010)

3.6.4.1 นำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.6.4.2 เติมสารละลาย 5% sodium metaperiodate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.6.4.3 เติมสารละลาย 0.5% sodium metabisulfite ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.6.4.4 เติมสารละลาย 0.2% chromatropic acid ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าและนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.6.4.5 เติมสารละลาย 7% Thiourea ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง

3.6.4.6 คำนวณความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ได้โดยเทียบกับสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

3.7 การคำนวณพารามิเตอร์ต่างๆและการคำนวณค่า Chemical Oxygen Demand (COD) balance

ปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ ($\text{mmol H}_2/\text{L}$) คำนวณโดยใช้กฎของแก๊สอุดมคติ (ideal gas law) โดยใช้สูตร ($\text{ml H}_2/\text{L}$)/RT ซึ่งค่า R มีค่าเท่ากับ $0.08205784 \text{ L atm/K mol}$ และ T คือหน่วยของอุณหภูมิในหน่วยเคลวิน

ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจน ($\text{mmol H}_2/\text{L h}$) คำนวณได้จากการนำค่าปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ ($\text{mmol H}_2/\text{L}$) หารด้วยระยะเวลาในการผลิต (h)

ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนจำเพาะ ($\text{mmol H}_2/\text{g-VSS h}$) คำนวณได้จากการนำค่าปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ ($\text{mmol H}_2/\text{L}$) หารด้วยความเข้มข้นของจุลินทรีย์เริ่มต้น (g-VSS/L)

ค่าผลได้ไฮโดรเจน ($\text{mmol H}_2/\text{mol glycerol consumed}$) คำนวณได้จากการนำค่าปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้ ($\text{mmol H}_2/\text{L}$) หารด้วยความเข้มข้นของสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ($\text{mol glycerol consumed/L}$)

การคำนวณ COD balance คำนวณได้โดยการแปลงค่าความเข้มข้นของผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการหมัก (fermentative products) ความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ (biomass) และความเข้มข้นของสับสเตรทที่ถูกใช้ไป (glycerol consumption) ให้เป็นหน่วย mg-COD/L โดยวิธีการของ Adrianus และ Jeroen (2007) ซึ่งผลพลอยได้จากกระบวนการหมักประกอบไปด้วย 1,3-โพรเพนไดออล เอทานอล บิวทานอล กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และ กรดบิวทาริก ตามลำดับ จากนั้นนำค่าความเข้มข้นข้างต้นในหน่วย mg-COD/L ที่ได้ไปหาค่า COD distribution

โดยหารด้วยความเข้มข้นของสับสเตรทที่ถูกใช้ไป และคูณด้วย 100 และท้ายสุดนำค่า COD distribution ไปคำนวณหาค่า COD balance ดังสมการ

COD balance (%) = COD distribution of substrate consumption

+ Σ (COD distribution of fermentative products and biomass) (1)

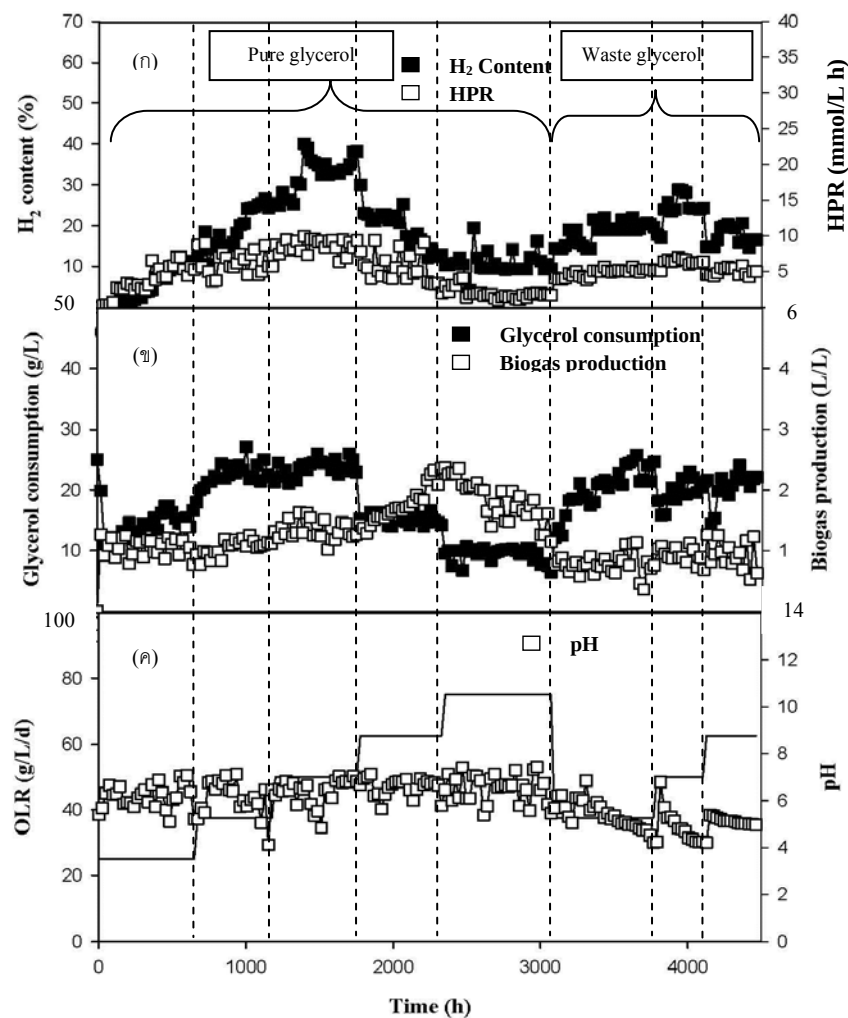
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB โดยเซลล์ตรึง

E. aerogenes ATCC 13048 บน UASB granules

การทดลองนี้ศึกษาการขยายขนาดการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอล ทำการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Upflow anaerobic sludge blanket (UASB reactor) ขนาด 500 มิลลิลิตร ดำเนินการทดลองโดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นสับสเตรท และแปรผันอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ เริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตรต่อวัน จากนั้นแปรผันค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ ที่ระดับ 32.5, 50, 62.5 และ 75 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจน และค่าความเป็นกรดต่างในระบบ ดังแสดงในรูปที่ 5 โดยจุลินทรีย์สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเตรทในการเจริญเติบโต ผลิตไฮโดรเจน และผลพลอยได้อื่นๆ (ตารางที่ 7) ซึ่งอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules มีค่าเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจน ผลได้ไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจนแบบจำเพาะ สูงสุดเท่ากับ 37.15 % 8.97 mmol H₂/L h 402.35 mmol H₂/mol glycerol และ 2.71 mmol H₂/g-VSS h ตามลำดับ (ตารางที่ 7) จากนั้นจึงเปลี่ยนสับสเตรทเป็นกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและดำเนินระบบที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 37.5 50 และ 62.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าที่ค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 37.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจน ผลได้ไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจนแบบจำเพาะ



รูปที่ 5 การผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB (ก) เปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจนและอัตราการผลิตไฮโดรเจน (ข) การใช้กลีเซอรอลและเปอร์เซ็นต์ไบโอแก๊ส (ค) อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์และค่าความเป็นกรดต่าง

ตารางที่ 7 ผลของอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ต่อประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์

ชีวภาพแบบ UASB

Parameters	Glycerol utilization (%)	H ₂ content (%)	HPR (mmol H ₂ /L h)	HY mmol H ₂ /mol glycerol)	SHPR (mmol H ₂ /g-VSS h)	Biomass conc. (g-VSS/L)
Pure glycerol						
OLR (g/L d)						
25.00	99.28±1.81	10.73±0.63	5.20±0.50	252.78±1.21	1.32±0.50	3.94±0.12
37.50	88.18±1.46	25.46±0.84	5.95±1.59	285.16±0.40	2.22±1.58	2.68±0.11
50.00	94.63±1.57	37.15±1.80	8.97±0.51	402.35±0.15	2.71±0.71	3.31±0.22
62.50	84.78±0.61	12.68±0.24	2.91±0.76	146.26±0.11	1.28±0.98	2.29±0.04
75.00	55.98±1.25	10.19±0.94	1.86±0.16	138.72±1.34	2.07±1.23	0.90±0.39
Waste glycerol						
OLR (g/L d)						
37.50	99.57±1.62	20.34±0.48	5.27±0.11	253.08±0.09	3.40±1.27	1.55±0.14
50.00	96.49±1.32	24.19±0.13	6.24±0.13	323.66±1.18	2.89±0.21	2.19±0.13
62.50	97.62±0.76	16.07±0.98	4.72±0.35	240.21±5.27	2.38±1.11	1.98±0.42

หมายเหตุ HPR = Hydrogen production rate; HY = Hydrogen yield; SHPR= Specific hydrogen production rate

และความสามารถในการใช้กลีเซอรอล เท่ากับ 20.34 % 5.27 mmol H₂/L h 253.08 mmol H₂/mol glycerol 3.40 mmol H₂/g-VSS และ 99.57% (ตารางที่ 7) ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจน ผลได้ไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจนแบบจำเพาะ และความสามารถในการใช้

กลีเซอรอล เท่ากับ 24.19 % 6.24 mmol H₂/L h 323.66 mmol H₂/mol glycerol 2.89 mmol H₂/g-VSS และ 96.49 % (ตารางที่ 7) ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มค่าอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์เป็น 62.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน จะส่งผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจน ผลได้ไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจนแบบจำเพาะมีค่าลดลง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน เป็นระดับการบรรทุกสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนซึ่งมีค่าสูงสุด ดังตารางที่ 4.1 นอกจากนั้นยังพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ได้เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นสับสเตรทมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นสับสเตรทถึง 1.54 และ 1.33 เท่า (ตารางที่ 7) ทั้งนี้เนื่องจากกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีองค์ประกอบจำพวกเกลือ (NaCl) เมทานอล และสบู่ ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษและยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ (Ito และคณะ, 2005; Ngo และคณะ, 2011; Marques และคณะ, 2009; Sarma และคณะ, 2012) ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ในระบบลดลง (ตารางที่ 7) นอกจากนั้นสบู่ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ยังส่งผลให้เกิดการอุดตันในระบบท่อและถังหมักทำให้การถ่ายเทสารอาหารสู่เซลล์จุลินทรีย์ลดลง ส่งผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจนและอัตราการผลิตไฮโดรเจนมีค่าลดลงด้วย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการควบคุมอัตราการบรรทุกสารอินทรีย์มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลโดยเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules โดยที่อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์สูงและต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยที่อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ที่ต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม (50 กรัมต่อลิตรต่อวัน) นั้นค่าความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น (37.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน) มีค่าต่ำกว่าระดับที่จุลินทรีย์ต้องการส่งผลให้การเจริญเติบโตและกิจกรรมจุลินทรีย์ลดลง (Abbasi, Abbasi, 2012; Wang, Wan, 2009) นอกจากนั้นที่อัตราการบรรทุกสารอินทรีย์ต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมยังส่งผลให้การสัมผัสระหว่างสับสเตรทและเซลล์จุลินทรีย์ลดลงเนื่องจากความเร็วในการเติมสารอาหารมีระดับต่ำ แต่

อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ให้สูงกว่าระดับที่เหมาะสม (62.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน) แสดงว่าความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้นในระบบการหมักมีค่าสูงกว่าระดับความต้องการของจุลินทรีย์จึงส่งผลยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ (substrate inhibition level) (Abbasi, Abbasi, 2012; Wang, Wan, 2009) นอกจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้นกว่าระดับที่เหมาะสมจะทำให้เกิดแรงดันออสโมติกภายในเซลล์จุลินทรีย์ส่งผลให้เซลล์ตรึงของจุลินทรีย์และวัสดุตรึงถูกทำลาย (Abbasi, Abbasi, 2012; Wang, Wan, 2009)

จากการวิเคราะห์ผลพลอยได้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนและค่า COD balance เมื่อใช้กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอเซลเป็นสับสเตรท (ตารางที่ 8 และ 9) พบว่าผลของ COD balance ที่ระดับภาระบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 37.5 50 และ 62.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน มีค่าความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 4.68 4.78 และ 9.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีความแม่นยำ โดยการแปรผันค่าอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อการแปรผันของผลพลอยได้หลัก ซึ่งผลพลอยได้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ เอทานอล 1,3 โพรเพนไดออล กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และ กรดแลคติก ตามลำดับ (ตารางที่ 8) เมื่อเพิ่มอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์จากระดับ 37.5 เป็น 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน จะส่งผลให้ความเข้มข้นของผลพลอยได้หลักมีค่าเพิ่มขึ้น และมีค่าความเข้มข้นของผลพลอยได้หลักมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์สูงกว่า 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน จากผลการวิเคราะห์ผลพลอยได้แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการหมักกลีเซอรอลประกอบด้วยสองกระบวนการที่เกิดขึ้นพร้อมกันคือ oxidative และ reductive pathway โดยใน reductive pathway กลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) โดยเอนไซม์ glycerol dehydratase จากนั้น 3-HPA จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 1,3 propanediol โดยเอนไซม์ 1,3-PDO dehydrogenase และใน oxidative pathway กลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate และเข้าสู่ glycolytic pathway ซึ่ง pyruvate ดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางได้สามเส้นทาง เส้นทางแรกถูกเปลี่ยนไปเป็น lactic acid เส้นทางที่สองเปลี่ยนไปเป็น propionic acid และเส้นทางที่สามเปลี่ยนไปเป็น Acetyl-CoA ซึ่งในการเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA จะมีการสร้าง formic acid, ethanol

ตารางที่ 8 ผลของอัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ต่อค่าความเป็นกรดต่างและผลพลอยได้จาก

กระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB

Parameters	OLR (g/L d)		
	37.5	50	62.5
pH	4.56±0.25	4.30±0.08	4.99±0.02
1,3-PD (mmol/L)	10±0.01	60±0.10	70±0.12
Ethanol (mmol/L)	90±0.01	110±0.03	100±0.01
Butanol (mmol/L)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Lactic acid (mmol/L)	4.25±0.13	8.37±3.58	7.57±0.88
Formic acid (mmol/L)	34.64±1.05	66.51±5.22	29.73±1.28
Acetic acid (mmol/L)	5.31±0.49	18.69±1.92	4.50±1.51
Propionic acid (mmol/L)	17.29±1.37	9.70±1.24	17.15±0.43
Butyric acid (mmol/L)	18.14±0.35	7.66±1.04	10.36±1.17

และ acetate เกิดขึ้นพร้อมกัน ในขั้นตอนนี้ formic ที่เกิดขึ้นจะถูกย่อยได้ผลได้เป็นไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ formate lyase (Gottschalk, 1988) และท้ายสุด Acetyl-CoA จะถูกเปลี่ยนไปเป็น butyric acid ต่อไป (Margarida และคณะ, 2008; Nakashimada และคณะ, 2002) โดยกรดไขมันระเหยง่ายที่ผลิตขึ้นจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างในระบบมีค่าลดลง (รูปที่ 5) ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน พบว่าเอทานอลเป็นผลพลอยได้หลักในกระบวนการหมักโดยให้ค่าความเข้มข้นสูงถึง 110.00 มิลลิโมลต่อลิตร รองลงมาคือกรดฟอร์มิก (66.51 มิลลิโมลต่อลิตร) และท้ายสุดคือ 1,3 โพรเพนไดออล (60.00 มิลลิโมลต่อลิตร) ซึ่ง 1,3 โพรเพนไดออล เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สำคัญในกระบวนการผลิตไบโอพลาสติก จากวิธีการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอล (รูปที่ 3) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากรดฟอร์มิกเป็นกรดไขมันระเหยง่ายหลักที่ใช้ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจน โดยให้ค่าผลพลอยได้ไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 1 mol H₂/mol formic acid (Sakai and Yagishita 2007; Biebl H. 2001)

ตารางที่ 9 การใช้กลีเซอรอล จำนวนประชากรจุลินทรีย์ การผลิตไฮโดรเจนและผลพลอยได้จาก
กระบวนการผลิตไฮโดรเจน และค่า COD balance ในสภาวะคงที่ ณ อัตราการะบรทุก
สารอินทรีย์ต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB

Parameters	Concentration (mg-COD/L)			COD distribution (%)		
	OLR (g/L d)					
	37.5	50.0	62.5	37.5	50.0	62.5
Glycerol consumption	31978.85	29597.72	30167.2	-100	-100	-100
Hydrogen	1011.66	1197.46	905.82	3.16	4.05	3.01
Biomass	2160.1	3048.65	2756.18	6.75	10.30	9.14
1,3-PD	12312.42	7925.95	9158.74	38.5	26.78	30.36
Ethanol	8858.09	10634.13	9265.2	27.71	35.93	30.71
Butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lactic acid	408.1	803.38	726.4	1.28	2.71	2.41
Formic acid	554.2	1064.23	475.72	1.73	3.6	1.58
Acetic acid	339.77	1196.34	287.78	1.06	4.04	0.95
Propionic acid	1936.63	1086.86	1920.56	6.06	3.67	6.37
Butyric acid	2901.67	1225.31	1656.94	9.07	4.14	5.49
Balance	-	-	-	-4.68	-4.78	-9.99

และที่ระดับอัตราการะบรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 37.5 กรัมต่อลิตรต่อวัน พบว่า 1,3 โพรเพนไดออล เป็นผลพลอยได้หลักในกระบวนการหมักซึ่งการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น 1,3 โพรเพนไดออล จะส่งผลให้ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนมีค่าลดลงเนื่องจากวิถีการหมักกลีเซอรอลเปลี่ยนเข้าสู่ reductive pathway

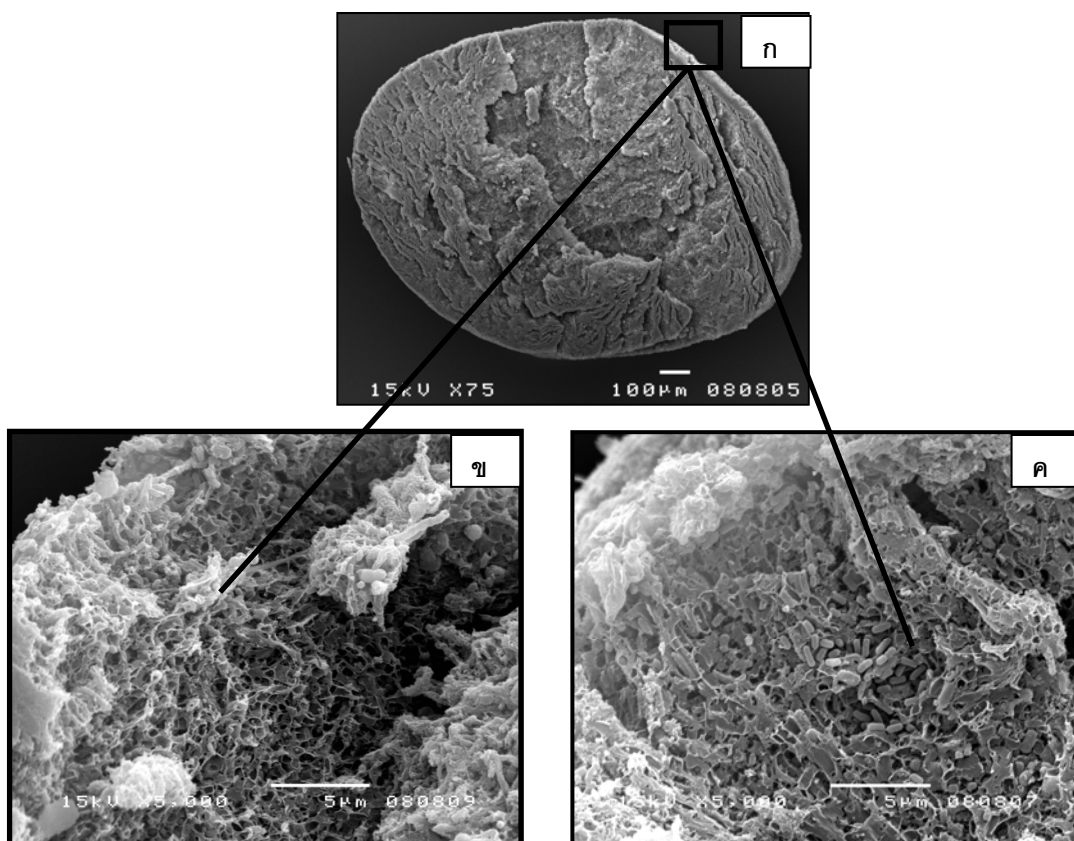
เมื่อพิจารณาค่าผลได้ไฮโดรเจนสูงสุดจากกระบวนการผลิตเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นสับสเตรทที่ระดับอัตราการะบรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสม 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน (402 and 323 mmol H₂/mol glycerol) พบว่ามีค่า

ต่ำกว่าผลได้ไฮโดรเจนทางทฤษฎี ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการหมักกลีเซอรอลมีผลพลอยได้อื่นๆ เช่น 1,3 โพรเพนไดออล กรดแลคติก และกรดโพพิโอนิก โดยในกระบวนการผลิต 1,3 โพรเพนไดออล และ กรดโพพิโอนิก จุลินทรีย์จะใช้ไฮโดรเจนเป็นสารตัวกลางในการผลิตส่งผลให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนมีค่าลดลง (Ngo และคณะ, 2011; Marques และคณะ, 2009; Sarma และคณะ, 2012)

4.2 โครงสร้างของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules และกลุ่มประชากรจุลินทรีย์จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB

จากการถ่ายภาพลักษณะของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ด้วยกล้อง Scanning Electron Microscopy (SEM) (รูปที่ 6) พบว่า UASB granules ที่ไม่มีเซลล์ตรึงของ *E. aerogenes* (รูปที่ 6 ข) มีจำนวนรูพรุนสูงและมีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นวัสดุพอง โดยเซลล์ *E. aerogenes* ATCC 13048 เกาะติดกับพื้นผิว UASB granules โดยการดูดซับอยู่ในรูพรุนของ UASB granules (รูปที่ 6 ค) ซึ่งเซลล์ *E. aerogenes* ATCC 13048 มีรูปร่างเป็นแท่งมีความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 0.16 และ 0.02 ไมโครเมตร (รูปที่ 6 ค) ซึ่งการใช้เซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules นั้นมีข้อดีคือช่วยลดขั้นตอนในการเตรียมกล้าเชื้อใหม่และลดต้นทุนในการใช้วัสดุพองที่เป็นวัสดุสังเคราะห์เช่น โพลีเมอร์สังเคราะห์ได้ จากการถ่ายภาพลักษณะเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน ด้วยกล้อง confocal laser scanning microscopy (FISH) พบว่ากลุ่มแบคทีเรียจำพวก firmicutes และ *E. aerogenes* มีการสร้างขึ้น biofilm ระหว่างกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอล (รูปที่ 7 ก) โดยผลการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules พบว่าประมาณ 89.2 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งหมดอยู่ในกลุ่มของ Eubacteria จำแนกเป็น γ -proteobacteria (34.5%) firmicutes bacteria (18.81%) α -Proteobacteria (7.9%) cytophaga (*Flavobacterium*) (5.6%) acidobacteria (6.7%) Archaea (2.3%) *Enterobacter* sp. และ (27.1%) ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรที่มีบทบาทในการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลในกระบวนการ

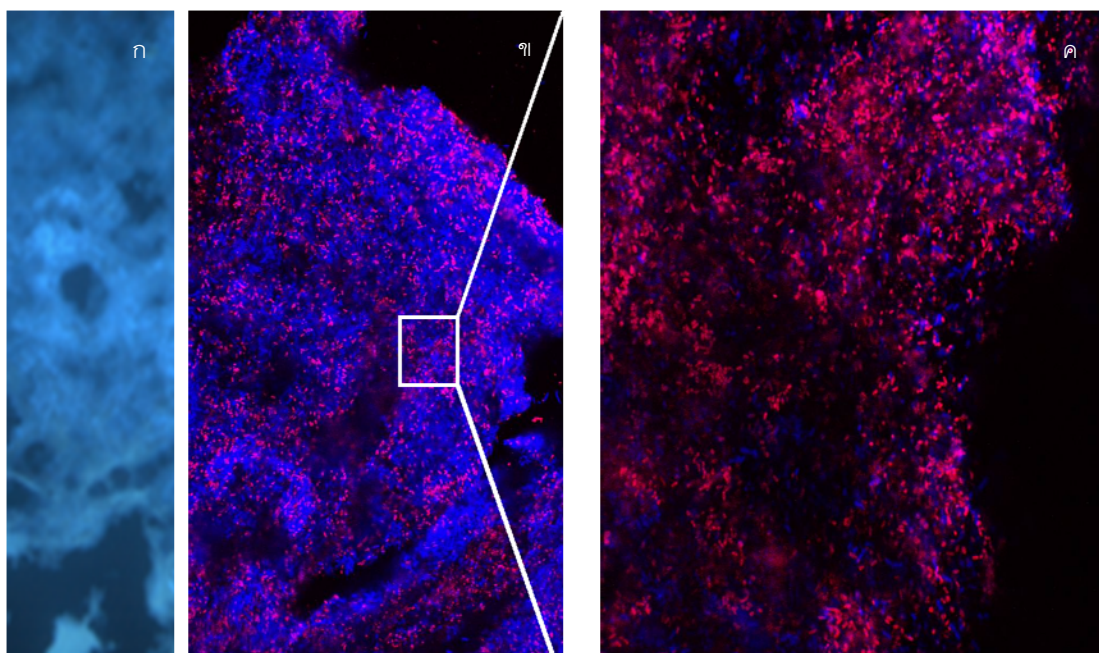
หมักแบบต่อเนื่องคือ *Enterobacter* sp และแบคทีเรียในกลุ่ม firmicutes ซึ่งประกอบไปด้วย *Clostridium* sp. *Bacillus* sp. และ *Dialister* sp



รูปที่ 6 ภาพถ่ายลักษณะของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ด้วย กล้อง Scanning Electron Microscopy (SEM) กำลังขยาย 75 เท่า (ก) โครงสร้างและ ลักษณะวัสดุฟอง กำลังขยาย 5000 เท่า (ข) เซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน กำลังขยาย 5000 เท่า (ค)

โดยแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวัสดุฟอง (heat-treated UASB granules) นอกจากนั้น แบคทีเรียในกลุ่ม acidobacteria ยังมีบทบาทในการผลิตกรดไขมันระเหยง่ายในกระบวนการหมักซึ่ง ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดบิวทริก และการตรวจพบกลุ่มแบคทีเรีย จำพวก Archaea ที่มีบทบาทในการผลิตมีเทนในปริมาณต่ำก็สอดคล้องกับการทดลองที่ไม่มีการผลิต

มีเทนเกิดขึ้นในระบบ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการดำเนินระบบภายใต้สภาวะที่เป็นกรดอ่อนๆ และการให้ความร้อนแก่ UASB granules สามารถยับยั้งการทำงานของกลุ่มประชากรที่ผลิตมีเทน (Archaea) และยังพบว่า heat-treated UASB granules สามารถใช้เป็นทั้งวัสดุพองและหัวเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอล



รูปที่ 7 ภาพถ่ายเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราภาระบรรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน ด้วยกล้อง Confocal scanning microscopy (ก) เซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ย้อมด้วย DAPI (ข) เซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ย้อมด้วย Cy3 labeled ENT183 probe บริเวณสีแดงคือเซลล์ *E. aerogenes* ATCC 13048 ที่ย้อมติดสีของ ENT183 probe (ค)

4.3 ค่าการแปลงพลังงานความร้อนและผลการเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากการทดลองกับงานวิจัยอื่นๆ

การเปรียบเทียบค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ได้จากการทดลองนี้ที่อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสมกับงานวิจัยอื่นๆ พบว่าค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนและจำนวนเซลล์จากการทดลอง ($6.24 \text{ mmol H}_2/\text{L h}$ และ 2.19 g-VSS/L) มีค่าสูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนและจำนวนเซลล์จากชุดการทดลองที่ใช้เซลล์ตรึงและไม่ใช้เซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB (Kotsopoulos และคณะ, 2006) unsaturated flow reactor (Kim และคณะ, 2005) และ ASBR (Mohan และคณะ, 2007) ตามลำดับ และมีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้เซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ packed bed และ tricking biofilter ดังตารางที่ 10 นอกจากนี้ยังพบว่าค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนและจำนวนเซลล์จากอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน โดยเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น มีค่าสูงกว่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนและจำนวนเซลล์ ($3.29 \text{ mmol H}_2/\text{L h}$ และ 1.92 g-VSS/L) ที่ได้รับจากอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสม (50 กรัมต่อลิตรต่อวัน) เมื่อใช้ UASB granules เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นถึง 1.90 และ 1.14 เท่า ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เซลล์ตรึงจุลินทรีย์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนและช่วยเพิ่มการกักเก็บเซลล์จุลินทรีย์ในระบบการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของกรดฟอร์มิกในน้ำหมักหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้เซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น มีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงขึ้นเนื่องจากกรดฟอร์มิกเป็นกรดไขมันระเหยง่ายหลักที่เป็นสาร intermediate ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอล

ผลการคำนวณค่าการแปลงพลังงานความร้อนซึ่งคำนวณจากค่าความร้อนจากการเผาไหม้ของกลีเซอรอล เอทานอล ไฮโดรเจน และ 1,3 โพรเพนไดออล ภายใต้อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์ที่เหมาะสมจากการทดลองเมื่อใช้กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นสับสเตรท มีค่าเท่ากับ 5.44% เมื่อคิดเทียบจากไฮโดรเจน และเท่ากับ 39.40% เมื่อคิดเทียบจากเอทานอล ดังนั้น

ค่าพลังงานความร้อนทั้งหมดคิดเทียบจากไฮโดรเจนและเอทานอลจากการทดลองมีค่าเท่ากับ 44.58% โดยค่าพลังงานความร้อนที่เหลืออีก 55.15% เกิดจากจุลินทรีย์ใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเตรท ในการผลิตสาร intermediate อื่นๆ ซึ่งได้แก่ 1,3 โพรเพนไดออล 28.87% และผลพลอยได้อื่นๆ ซึ่งประกอบไปด้วย กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดบิวทริก และกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 26.27%

ตารางที่ 10 ตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนจากการทดลองกับงานวิจัยอื่นๆ โดยใช้สับสเตรทและกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Process	Immobilized method	Microorganisms	Substrate	Optimum OLR (mmol/L/h)	HPR (mmol/L/h)	Biomass concentration (g-VSS/L)	References
AnSBR	-	Mesophilic mixed cultures	Diary wastewater	-	0.066	ND	Mohan และคณะ, 2007
Packed bed	-	<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	Pure glycerol	660	80	ND	Ito และคณะ, 2005
Packed bed	-	<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	Waste glycerol	660	30	ND	Ito และคณะ, 2005
Granular-UASB	Biofilm on treated methanogenic granules	Extreme-thermophilic mixed culutres	Sucrose	1.2	2.3	0.49	Kotsopoulos และคณะ, 2006
UFR	Biofilm on glass beads	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	Glucose	46	8.9	ND	Kumar, Das, 2006
Packed bed	Biofilm on lignocellulosic agro-residues	<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Glucose	51	75.6	44	Kim และคณะ, 2001
TBR	Biofilm on fibrous polymeric material	Thermophilic mixed cultures	Glucose	55.5	47.7	24	Oh และคณะ, 2005
UASB	Biofilm on treated methanogenic granules	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	Sucrose	47	144.6	16	O-Thong และคณะ, 2008
UASB	Biofilm on treated UASB granules	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Pure glycerol	3197.56	8.97	3.31	This study
UASB	Biofilm on treated UASB granules	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	Waste glycerol	3197.56	6.24	1.98	This study

หมายเหตุ ND: not determined; HPR: hydrogen production rate; OLR: organic loading rate; UASB: upflow anaerobic sludge blanket reactor; TBR: tricking biofilter; AnSBR: anaerobic sequencing batch reactor; UFR: unsaturated flow reactor.

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองโดยรวมแสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีศักยภาพในการถูกนำไปใช้เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB โดยเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules โดยพบว่าอัตราการระบรทุกสารอินทรีย์มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนจากกลีเซอรอลซึ่งเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นสับสเตรทเริ่มต้น พบว่าที่อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 37.15 24.19%, และ 8.97 6.24 mmol H₂/L h ตามลำดับ โดยค่าเปอร์เซ็นต์แก๊สไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นสับสเตรทมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ถึง 1.54 และ 1.33 เท่า จากผลการศึกษากลุ่มประชากรในเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ที่อัตราการระบรทุกสารอินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรต่อวัน พบว่ากลุ่มประชากรจุลินทรีย์หลักที่มีบทบาทในการผลิตไฮโดรเจนที่ตรวจพบเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Enterobacter* sp. *Clostridium* sp. *Bacillus* sp. และ *Dialister* sp. นอกจากนั้นผลจากการถ่ายภาพลักษณะของเซลล์ตรึง *E. aerogenes* ATCC 13048 บน UASB granules ด้วยกล้อง Scanning Electron Microscopy (SEM) พบว่า *E. aerogenes* ATCC 13048 เกาะติดกับพื้นผิว UASB granules โดยกลไกการดูดซับอยู่ในรูพรุนของ UASB granules เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการผลิตดังกล่าวกับการทดลองที่ใช้ heat-treated UASB granules เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น พบว่าให้ค่าอัตราการผลิตไฮโดรเจนที่สูงกว่าถึง 1.90 เท่า และ 1.14 เท่า แสดงให้เห็นว่าการใช้เซลล์ตรึงจุลินทรีย์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไฮโดรเจนและช่วยเพิ่มการกักเก็บเซลล์จุลินทรีย์ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ UASB โดยกระบวนการหมักหลักในการผลิตไฮโดรเจนเป็นแบบ formate type fermentation

เอกสารอ้างอิง

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี .ไบโอดีเซล .[ออนไลน์] สืบค้นจาก: <http://th.wikipedia.org/wiki/ไบโอดีเซล>

[18 ตุลาคม 2549]

Abbasi T, Abbasi SA. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. **Renew Sust Energ Rev** 2012; 16: 1696-1708.

Adrianus van H, Jeroen van der L. **Handbook biological waste water treatment Measurement of organic material**. Netherlands: Quist Publishing Leidschendam; 2007. p.8-10.

Akano Y, Miura K, Fukatsu H, Miyasaka Y, Ikuta H, Matsumoto A, Hamasaki N, Shioji T, Mizoguchi K, Yagi K, Maeda, I. Hydrogen Production by Photosynthetic Microorganisms. **Appl Biochem Biotechnol** 1996; 57(58): 677-688.

Amann R, Snaird I, Wagner M, Ludwig W, Schleifer KH. In situ visualization of high genetic diversity in a natural community. **J Bacteriol** 1996; 178: 3496-3500.

APHA. **Standard methods for examination of water and wastewater 19th ed**. Washington DC, USA: American Public Health Association; 1998. p.1220.

Aristidou A, Penttilä M. Metabolic engineering application to renewable resource utilization. **Biotechnol** 2000; 11: 187-198.

Chang JS, Lee KS, Lin PJ. Biohydrogen production with fixed bed bioreactors. **Int J Hydrogen Energy** 2002; 27: 1167-1174.

Chen CC, Lin CY, Chang JS. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as limiting substrate. **Appl Microbiol Biotechnol** 2001; 57: 56-64.

- Chen WM, Tseng ZJ, Lee KS, Chang JS. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **Int J Hydrogen Energy** 2005; 30: 1063-1070.
- Chin HL, Chen ZS, Chou CP. Fed-batch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension cultures as biocatalyst for enhancing hydrogen production. **Biotechnol Prog** 2003; 19: 383-388.
- Collet CN, Schwitzguébel JP, Péringer P. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. **Int J Hydrogen Energy** 2004; 29: 1479-1485.
- Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **Int J Hydrogen Energy** 2001; 26: 13-28.
- Daims H, Bruhl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Syst Appl Microbiol** 1999; 22: 434-444.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Phenol sulfuric total sugar. **Anal Chem** 1956; 28:350-356.
- Dabrock B, Bahl H, Gottschalk G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Appl Environ Microbiol** 1992; 54: 1233-1239.
- Domínguez JM, Cao N, Gong CS, Tsao GT. Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corncob for xylitol production by yeast. **Biores Technol** 1997; 61: 85-90.
- Fang HHP, Liu H, Zhang T. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. **Biotechnol Bioeng** 2002; 78(1): 44-52.
- Ginkel SWV, Logan B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. **Water Res** 2005; 39: 3819-3826.

Greenbaum E. Hydrogen production by photosynthetic water splitting. In: Veziroglu TN, Takashashi PK, editors. Hydrogen energy progress VIII. **Proceedings 8th WHEC**. Hawaii, New York, 1990; 743-754.

Gutierrez NA, Maddox IS, Schudter KC, Swoboda H, Grapes JR. Strain comparison for the acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process using a substrate of potato. **Biores Technol** 1998; 66: 263-265.

Handel EV. Suggested modifications of the micro determination of triglycerides. **Clinical Chem** 1961; 3: 249-251.

Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, Hussy I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **Int J Hydrogen Energy** 2002; 27: 1339-1347.

Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martínez A, Morales. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. **Biotechnol Progress** 1999; 15: 277-292.

Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing waste discharged after biodiesel manufacturing process. **Biosci Bioeng** 2005; 100: 260-265.

Jarvis GM, Moore ERB, Thiele JH. Formate and ethanol are the major products if glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. **Appl Microbiol** 1997; 166-174.

Kanai T, Imanaka H, Nakajima A, Uwamori K, Omori Y, Fukui T. Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. **Biotechnol** 2005; 116: 271-282.

Kim JO, Kim YH, Ryu JY, Song BK, Kim IH, Yeom SH. Immobilization methods for continuous hydrogen gas production biofilm formation versus granulation. **Process Biochem** 2005; 40: 1331-1337.

- Kongjan P, Min B, Angelidaki I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70 °C) by mixed culture fermentation. **Water Res** 2009; 43: 1414-1424.
- Kourkputas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support material suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiol** 2004; 21: 377-397.
- Kotsopoulos TA, Zeng RJ, Angelidaki I. Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyperthermophilic temperature (70 °C). **Biotechnol Bioeng** 2006; 94: 296-302.
- Kumar N, Das D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. **Enzyme Microb Tech** 2001; 29: 280-287.
- Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. **Process Biochem** 2000; 35: 589-593.
- Kumar N, Das D. Electron microscopy of hydrogen producing immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 on natural polymers. **Int J Hydrogen Energy** 2001; 26: 1155-1163.
- Kruse B, Grinna H, Buch C. **Hydrogen**. [online]. 2002. Available from: http://www.bellona.no/data/f/o/26/97/0_9811_1/hydrogen_6-2002
- Kapdan LK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme Micro Technol** 2006; 38: 569-582.
- Kataoka, N, Miya A, Kiriya K. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. **Water Sci Technol** 1997; 36: 41-47.
- Lay JJ Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. **Biotechnol Bioeng**. 2001; 74: 281-287.

- Lay JJ, Lee YJ, Neuke T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. **Water Res** 1999; 33: 2579-2586.
- Lee KS, Lo YS, Lo YC, Lin PJ, Chang JS. Operating strategies for biohydrogen production with high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. **Enzyme Microb Technol**. 2004; 35: 605-612.
- Lin CY, Chang RC. Fermentative hydrogen production at ambient temperature. **Int J Hydrogen Energy** 2004; 29:715-20.
- Lin CY, Lay CH. Carbon/nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. **Int J Hydrogen Energy** 2004; 29: 41-45.
- Lin CN, Wu SY, Chang JS. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone gel-immobilized anaerobic sludge. **Int J Hydrogen Energy** 2006; 31: 2200-2210.
- Lin CY, Lay CH. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. **Int J Hydrogen Energy** 2005; 30: 285-92.
- Liu H, Fang HHP. Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge. **Water Sci Technol** 2003; 47:153-158.
- Lee KS, Lin PJ, Chang JS. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **Int J Hydrogen Energy** 2006; 31: 465-472.
- Lee KS, Wu JF, Lo YS, Lo YC, Lin PJ, Chang JS. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. **Biotechnol Bioeng** 2004; 87: 648-657.
- Lynd LR, Wyman CE, Gerngross TU. Biocommodity engineering. **Biotechnol Progress** 1999; 15: 777-793.

- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. **Syst Appl Microbiol** 1992; 15: 593-600.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. **Microbiology** 1996; 142: 1097-1106.
- Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker Jr CT, Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM, Tiedje JM. The RDP-II (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Res** 2001; 29: 173-184.
- Marques P, Bartolomeu ML, Thomas MM, Neves LM. **Biohydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes***. Proceeding of Hypothesis VIII; 2009 April 1-3; Lisbon, Portugal.
- Maddox IS, Qureshi N, Robert TK. Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrates using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-production removal process. **Process Biochem** 1995; 30: 205-215.
- Minnan L, Jinli H, Xiaobin W, Huijuan X, Jinzao C, Chuannan L. Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. **Res Microbiol** 2005; 156:76-81.
- Miyake J, Miyake M, Asada Y. Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion. **Biotechnol** 1999; 70: 89-101.
- Mizuno O, Ohara T, Shinya M, Noike T. Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora. **Water Sci Technol** 2000; 42: 345-350.

- Mohan SV, Babu VL, Sarma PN. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. **Enzyme Microb Tech** 2007; 41: 506-515.
- Mu Y, Zheng XJ, Yu HQ, Zhu RF. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. **Int J Hydrogen Energy** 2006; 31: 780-785.
- Ngo TA, Kim MS, Sim SJ. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **Int J Hydrogen Energy** 2011; 36(10): 5386-5842.
- Nigam JN Cultivation of *Candida langeronii* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. **World J Microbiol Biotechnol** 2000; 16: 367-372.
- Oh SE, Lyer P, Bruns MA, Logan BE. Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. **Biotechnol Bioeng** 2004; 87: 119-127.
- O-Thong S, Prasertsan P, Karakasheva D, Angelidaki I. High-rate continuous hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 immobilized on heat-pretreated methanogenic granules. **Int J Hydrogen Energy** 2008; 33: 6498-6508.
- O-Thong S, Prasertsan P, Intrasukkha N, Dhamwichukorn S, Birkeland NK. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. **Int J Hydrogen Energy** 2008; 33: 1221-1231.
- Pagliaro M., Michele R. Future of Glycerol: New Usages for a Versatile Raw Material. **RSC** 2008; 144.
- Podestá JJ, Navarro AMG, Estrella CN, Estes MA. Electrochemical measurements of trace concentrations of biological hydrogen produced by *Enterobacteriaceae*. **Inst Pasteur** 1997; 148: 87-93.

- Rachman MA, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N. Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-focculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. **Appl Microbiol Biot** 1998; 49: 450-454.
- Roller C, Wagner M, Amann R, Ludwig W, Schleifer K H. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. **Microbiololy** 1994; 140: 2849-2858.
- Sakai S, Yagishita T. Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine. **Biotech Bioeng** 2007; 98: 340-348.
- Saraphirom P, Reungsang A. Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. **Int J Hydrogen Energy** 2010; 35(24): 13435-13444.
- Sarma SJ, Brar SK, Sydney EB, Bihan YL, Buelna G, Soccol CR. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. **Int J Hydrogen Energy** 2012; 37(8): 6473-6490.
- Seifert K, Waligorska M, Wojtowski M, Laniecki M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **Int J Hydrogen Energy** 2009; 34: 3671-3678.
- Selembo PA, Perez JM, Lloyd WA, Logan BE. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnol Bioeng** 2009; 104(6): 1098-11106.
- Stahl DA, Amann R. **Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics**. In: Stackebrandt E. Goodfellow M. (eds) **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd; 1991. p.205-248.

- Taguchi F, Chang JD, Takiguchi S, Morimoto M. Efficient hydrogen production from starch by bacterium isolated from termites. **J Ferment Bioenergy** 1992; 73: 224-225.
- Tanisho S. Feasibility study of biological hydrogen production from sugar cane by fermentation. In: Veziroglu TN, Winter CJ, Basselt JP, Kreysa G. editors. **Hydrogen Energy Progress XI. Proceedings of 11th WHEC**. Stuttgart, Germany, 1996; 3: 2601-2606.
- Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. **Int J Hydrogen Energy** 1995; 20: 541-545.
- Temudo MF, Poldermans R, Kleerebezem R, van Loosdrecht MCM. Glycerol fermentation by open mixed cultures: A chemostat study. **Biotechnol Bioeng** 2008; 100(6): 1088-1098.
- Ueno Y, Otsuka S, Morimoto M. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. **J Ferment Bioeng** 1996; 82: 194-197.
- Wang J, Wan W. Factor influencing fermentative hydrogen production: A review. **Int J Hydrogen Energy** 2009; 34: 799-811.
- Wang ZX, Zhuge J, Prior BA. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnol Advances** 2001; 19: 210-223.
- Wu SY, Lin CN, Chang JS, Lee KS, Lin PJ. Microbial hydrogen production with immobilized sewage sludge. **Biotechnol Prog** 2002; 18: 921-926.
- Wu SY, Hung CH, Lin CN, Chen HW, Lee AS, Chang JS. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high rate anaerobic bioreactors containing silicone immobilized and self flocculated sludge. **Biotechnol Bioeng** 2005; 93: 934-946.

- Yang Y, Tsukahara K, Sawayama S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic condition. **Process Biochem** 2008; 19: 193-210.
- Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. H₂ production from starch by mixed culture of *Clostridium buytricum* and *Enterobacter aerogenes*, **Biotechnol Letter** 1998; 20: 143-147.
- Yokoi H, Maki R, Hirose J, Hayashi S. Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes. **Biomass Bioenergy** 2002; 22: 89-395.
- Yokoi H, Maeda Y, Hirose J, Hayashi S. Hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium butyricum* on porous glass beads. **Biotech Technol** 1997; 11: 431-433.
- Yu HQ, Zhu ZH, Hu WR, Zhang HS. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. **Int J Hydrogen Energy** 2002; 27: 1359-1365.
- Zhang JJ, Li XY, Oh SE, Logan B. Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production. **Biotechnol Bioeng** 2004; 88: 854-860.
- Zheng XJ, Yu HQ. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. **J. Environ. Management.** 2005; 74: 66-70.
- Zhu H, Suzuki T, Tsyganlov AA, Asada Y, Miyake J. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. **Int J Hydrogen Energy** 1999; 24: 305-310.

ภาคผนวก ก

การคำนวณอัตราการบำบัดทุกสารอินทรีย์ (Organic loading rate: OLR)

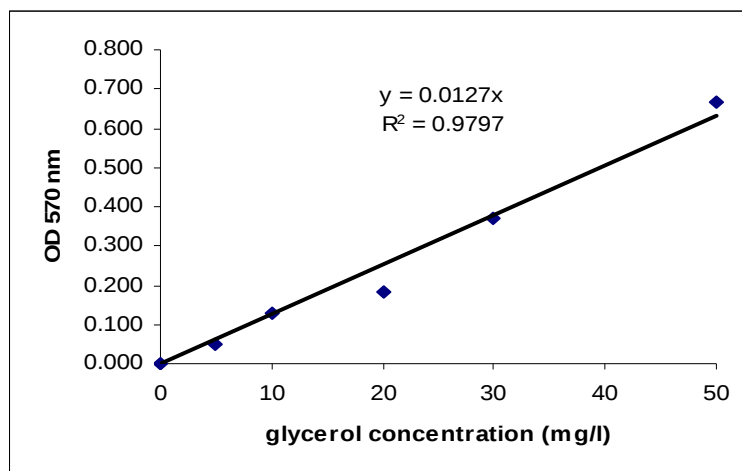
$$\text{OLR (g/L d)} = \frac{\text{Substrate concentration (g/L)} * \text{Flow rate (L/d)}}{\text{Volume of reactor (L)}}$$

Substrate concentration คือความเข้มข้นของสารอาหาร (g/L)

Flow rate คือ อัตราการเติมสารอาหาร (L/d)

Volume of reactor คือปริมาตรถังหมักทั้งหมด (L)

ภาคผนวก ข



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลีเซอรอล