

ผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วย

โดยกลุ่มจุลินทรีย์ชอบร้อน

Influences of temperature and initial pH on hydrogen production from banana peel by thermophilic bacteria

สุขสมาน สักโยคะ^{1*} สุริวัณย์ สิทธิจันดา² และอลิศรา เรืองแสง²

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

*corresponding author: suksaman@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วยโดยการออกแบบทางสถิติ Central Composite Design (CCD) ผลจากการศึกษาพบว่า อุณหภูมิ (X_1) มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (X_2) ไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ($p > 0.05$) นอกจากนั้นยังพบว่าแต่ละปัจจัย (X_1, X_2) ไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน (no interaction) ($p > 0.05$) ซึ่งสถานะที่เหมาะสมที่ให้ค่าไฮโดรเจนสะสมสูงสุดคือ ที่อุณหภูมิ 44.49 °ซ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น 5.59 โดยให้ค่าไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 44.53 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น และผลการทดลองจากขั้นตอนยืนยันผลพบว่าค่าไฮโดรเจนสะสมจากการทดลองมีค่าเท่ากับ 43.08 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนจากค่าที่ได้จากการออกแบบการทดลองทางสถิติเพียง 3.26% ซึ่งมีค่าน้อยมาก แสดงให้เห็นว่าการออกแบบการทดลองทางสถิติสามารถให้ทำนายค่าผลได้ไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วยสูงโดยกลุ่มจุลินทรีย์อย่างแม่นยำ

คำสำคัญ: ไฮโดรเจน เปลือกกล้วย จุลินทรีย์ชอบร้อน

Abstract

Effect of temperature and initial pH on hydrogen production from banana peel by thermophilic microorganisms from the hot spring in the Southern part of Thailand were investigated. Statistical based experiment was designed using the central composite design (CCD). Results indicated that temperature (X_1) had a significantly effect ($p < 0.05$) on hydrogen production while the initial pH (X_2) did not ($p > 0.05$). In addition, there was no interaction between the temperature and the initial pH (X_1X_2) ($p > 0.05$). Maximum hydrogen production of 44.53 mmol H_2 /L-substrate was obtained at the temperature of 44.49 and initial pH of

5.59. Results from the confirm test was 43.08 mmol H_2 /L substrate which was only 3.26% different from the actual results, indicating that the CCD could be used to design the experiment with the least error.

Keywords Hydrogen banana peel thermophilic bacteria

1. ที่มาและความสำคัญ

ความต้องการใช้พลังงานในปัจจุบันมีมากขึ้นในขณะที่พลังงานจากฟอสซิล อาทิ น้ำมัน ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติกลับมีปริมาณลดน้อยลง คนส่วนใหญ่จึงหันมาสนใจพลังงานทดแทนกันมากขึ้น ซึ่งไฮโดรเจนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของแหล่งพลังงานในอนาคตที่คาดว่าจะนำมาทดแทนพลังงานที่มีในธรรมชาติ เนื่องจากไฮโดรเจนเป็นพลังงานสะอาด เมื่อทำปฏิกิริยาเผาไหม้กับออกซิเจนจะได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์จึงไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งให้ค่าพลังงานสูง โดย 1 กิโลกรัมของไฮโดรเจนให้พลังงานเท่ากับ 3.5 ลิตรของปิโตรเลียม (Akano และคณะ, 1996) จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับการผลิตกระแสไฟฟ้า และพลังงานเชื้อเพลิงเพื่อการคมนาคมขนส่งในอนาคต

การผลิตแก๊สไฮโดรเจนให้มีประสิทธิภาพมีทั้งวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ โดยการผลิตแก๊สไฮโดรเจนโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพกำลังเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการทางชีวภาพอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดมลพิษ นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตยังมีความหลากหลาย อาทิ วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม และกากของเสียโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งทำให้ต้นทุนการผลิตมีราคาถูกอีกด้วย

เปลือกกล้วยเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากกล้วย เช่น กล้วยตาก กล้วยทอด กล้วยเชื่อม เป็นต้น ปลูกมากในพื้นที่จังหวัดในแถบภาคกลางและภาคเหนือตอนล่าง เช่น พิจิตร โลก สุโขทัย และกำแพงเพชร เปลือกกล้วยประกอบไปด้วยไฟเบอร์ 42% และในไฟเบอร์ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส 22% เซลลูโลส 6.3% และลิกนิน 0.6% (Kayisu และคณะ, 1981) ซึ่งหากมีการนำมาผ่านการปรับสภาพที่เหมาะสมจะสามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักเพื่อผลิตไฮโดรเจนได้ ทั้งนี้งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ชานอ้อย พบว่าได้น้ำตาลกลูโคสและไซโตสเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งสามารถนำไปผลิตไฮโดรเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Pattra และคณะ, 2008) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้และการใช้ประโยชน์จากเปลือกกล้วยซึ่งเป็นชีวมวลเหลือทิ้งเพื่อผลิตไฮโดรเจนโดยกลุ่มจุลินทรีย์ชอบร้อน โดยจะทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนทั้งนี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน

2. วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 เปลือกกล้วย

เปลือกกล้วยที่ใช้ในการทดลองเป็นเปลือกกล้วยน้ำว้าสุกนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเปลือกกล้วยและน้ำเท่ากับ 1:2.5 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกกล้วยสุกพบว่ามีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 0.55 กรัมต่อกรัมเปลือกกล้วย และมีความชื้นในเปลือกกล้วยเท่ากับ 76.14%

2.2 สารอาหาร

ใช้สารอาหารสูตร Endo nutrient ซึ่งมีส่วนประกอบตามสูตรของ Lin และ Lay (2005) โดยใช้ อัตราการเติม Endo nutrient เท่ากับ 6 มล./เปลือกกล้วยสุกบด 1000 มล.

2.3 หัวเชื้อจุลินทรีย์

หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือหัวเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ผสมซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ (mixed cultures) ที่อยู่ในตะกอนของบ่อน้ำพุร้อน จังหวัดพังงา นำมาเลี้ยงในอาหาร Endo-nutrient (Lin and Lay, 2005) ซึ่งมีปริมาตรทำการ 700 มล. โดยมีกลูโคส 10 กรัม/ลิตร, โซลอส 5 กรัม/ลิตร และอะราบิโนส 5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 จากนั้นทำให้เป็นสภาวะไร้อากาศภายในขวดโดยการแทนที่ด้วยแก๊สไนโตรเจน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด 7 วัน เปลี่ยนอาหารเป็นสูตร Endo-nutrient ที่มีเปลือกกล้วยสุกบดความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งแขวนลอยระเหยได้ (Volatile suspended solid; VSS) เริ่มต้น

2.4 การศึกษาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมและการเติมกลุ่มจุลินทรีย์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วย

การทดลองหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต H_2 จากเปลือกกล้วย ได้ทำการทดลองในขวด serum ขนาด 100 มล. มีปริมาตรทำการ 70 มล. ใช้สารอาหารสูตร Endo-nutrient ที่มีเปลือกกล้วยบดความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 7500 มล./ลิตร มีชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อผลิต H_2 เป็นชุดควบคุม ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและอะลูมิเนียม ปรับสภาพภายในขวดให้เป็นสภาวะไร้อากาศโดยการแทนที่ด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 °C ทำการทดลองชุดละ 3 ขั้ว เก็บตัวอย่างแก๊สเพื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้น และเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมัก

2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วย โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติ Central Composite Design (CCD)

ทำการทดลองในขวดซีรัมขนาด 100 มล. มีปริมาตรทำการ 70 มล. ใช้สารอาหารสูตร Endo-nutrient ที่มีเปลือกกล้วยสุกบดความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัม/ลิตร หัวเชื้อเริ่มต้น 7500 มก./ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ โดยใช้ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.4 รายละเอียดในแต่ละชุดการทดลองแสดงได้ในตารางที่ 1 ปิดฝาขวดด้วยจุกยางและอะลูมิเนียม จากนั้นปรับสภาพภายในขวดให้เป็นสภาวะไร้อากาศโดยการแทนที่ด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการทดลองชุดละ 5 ขั้ว เก็บตัวอย่างแก๊สเพื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของแก๊สชีวภาพที่เกิดขึ้น และเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมัก

ตารางที่ 1 ชุดการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติ Central Composite Design (CCD)

Run #	Variables/levels			
	Temperature		Initial pH	
	Actual (°C)	Code	Actual	Code
1	40	-1	5.00	-1
2	50	1	5.00	-1
3	40	-1	6.00	1
4	50	1	6.00	1
5	38	-1.414	5.50	0
6	52	1.414	5.50	0
7	45	0	4.79	-1.414
8	45	0	6.21	1.414
9	45	0	5.50	0
10	45	0	5.50	0
11	45	0	5.50	0
12	45	0	5.50	0
13	45	0	5.50	0

2.6 วิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol Sulfuric (Dubois และคณะ, 1956) ค่าของแข็งระเหยได้โดยอบที่ 550 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง pH meter (UB-5, Denver Instrument) ชนิดและปริมาตรแก๊สตัวอย่างโดยวิธีของ Sangyoka และคณะ,(2007) จำนวนปริมาตรก๊าซที่ผลิตได้จากสมการ Mass balance (Zheng และ Yu, 2005)

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

เมื่อ $V_{H,i}$ และ $V_{H,i-1}$ คือ ปริมาตรไฮโดรเจนสะสมที่เวลาปัจจุบัน (i) และเวลาที่ผ่านมา (i-1) ตามลำดับ

$V_{G,i}$ และ $V_{G,i-1}$ คือ ปริมาตรแก๊สชีวภาพทั้งหมด ที่เวลาปัจจุบันและเวลาที่ผ่านมา ตามลำดับ

$C_{H,i}$ และ $C_{H,i-1}$ คือ สัดส่วนของแก๊สไฮโดรเจนใน Headspace ที่เวลาปัจจุบัน และเวลาที่ผ่านมา ตามลำดับ

V_H คือ ปริมาตรของ Headspace ในถังหมัก

จากนั้นหาปริมาณไฮโดรเจนสะสมจากสมการ Gompertz ในการคำนวณ (Datar และคณะ, 2007) ดังนี้

$$H(t) = P \exp\{-\exp[R_m e / P(\lambda - t) + 1]\} \quad (2)$$

เมื่อ P (ml H_2) คือ ปริมาณไฮโดรเจนสูงสุด
 R_m (ml H_2 /hr) คือ อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด
 λ (h) คือ ระยะเวลาของช่วง lag phase
 $H(t)$ คือ ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่เวลาใดๆ
 e เท่ากับ 2.71828

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

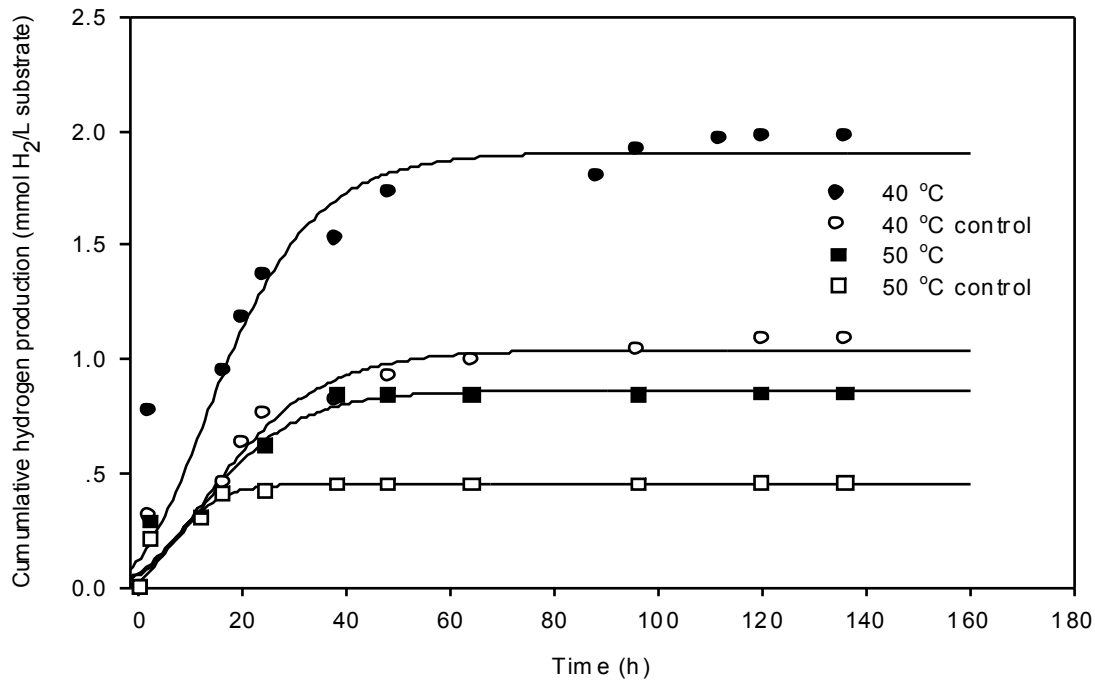
3.1 การศึกษาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมและการเติมกลุ่มจุลินทรีย์ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วย

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมและผลของการเติมกลุ่มจุลินทรีย์ชอบร้อนต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วยสุกบด ผลการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่เติมหัวเชื้อไฮโดรเจนเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นปริมาณไฮโดรเจนสะสมมีค่าลดลง (ภาพที่ 2) โดยที่อุณหภูมิ 40°C มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 1.91 มิลลิโมล H_2 /ลิตร รองลงมาคือที่ 50°C มีปริมาณไฮโดรเจน 0.86 มิลลิโมล H_2 /ลิตร และที่ 60°C ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเกิดขึ้น และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปพบว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 50°C มีการใช้น้ำตาลสูง แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60°C การใช้น้ำตาลลดลง (ตารางที่ 3) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดที่เติมและไม่เติมหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจนพบว่าการเติมหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจนจะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงกว่าชุดที่ไม่มีการเติม (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงเลือกการเติมหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจนและช่วงอุณหภูมิ 40 และ 50°C มาทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุด ณ ช่วงอุณหภูมิต่างๆ

Sample	H_2 production (mmol H_2 /L)	R_m (mmol H_2 /L/h)	lag time (h)	R^2
40°C	1.91	0.05	0.00000010	0.95
40°C control	1.04	0.03	0.00000005	0.97
50°C	0.86	0.03	0.00000000	0.94
50°C control	0.45	0.03	0.00000002	0.97
60°C	0.00	0.00	0.00000000	0.00
60°C control	0.00	0.00	0.00000000	0.00

*Control คือ ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจน



ภาพที่ 1 ปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่เวลาต่างๆในแต่ละช่วงอุณหภูมิ
(Control คือชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจน)

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วยที่อุณหภูมิต่างๆ

Sample	Initial sugar concentration (g/L)	Final sugar concentration (g/L)	sugar consumed (g/L)
40°C	27.51	9.18	18.33 ± 4.79
40°C control	25.08	6.40	18.69 ± 3.17
50°C	26.02	5.02	21.00 ± 2.29
5°C control	29.24	3.94	25.30 ± 3.71
60°C	23.90	22.82	1.07 ± 4.35
60°C control	27.20	19.66	7.54 ± 4.81

*Control คือ ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจน

3.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนโดยการออกแบบการทดลองทางสถิติ

จากการทดลองที่ 3.1 พบว่าในช่วงอุณหภูมิ 40-50 °C เป็นช่วงที่กลุ่มจุลินทรีย์ที่ชอบร้อนสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ดี ดังนั้นจึงใช้ช่วงอุณหภูมิดังกล่าวมาดำเนินการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนโดยการออกแบบการทดลองทางสถิติ ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะมีสภาวะที่ต่างกัน ดังตารางที่ 4 ผลการทดลองพบว่าปริมาณไฮโดรเจนที่ผลิตได้มีค่าตั้งแต่ 23.22 ถึง 45.35 มิลลิโมล H₂/ลิตรของสารตั้งต้น ซึ่งมี

ค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนายจากแบบจำลอง (ตารางที่ 4) โดยปริมาณไฮโดรเจนสะสมในแต่ละชุดการทดลองสามารถทำนายได้จากสมการกำลังสองจากแบบจำลองทางสถิติ (ดังแสดงในสมการที่ 3)

$$Y = 44.35 - 1.73X_1 + 1.06X_2 - 0.20 X_1 X_2 - 8.98X_1^2 - 3.15X_2^2 \quad (3)$$

โดย Y คือ ปริมาณไฮโดรเจนสะสม (mmol H₂/L substrate)

X₁ คือ อุณหภูมิ

X₂ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ซึ่งแบบจำลองที่ใช้มีความแม่นยำและเหมาะสมต่อการทำนายค่าการผลิตไฮโดรเจน ($P < 0.001$) โดยมีความแม่นยำสูงถึง 95% ($R^2 = 0.9590$) (ตารางที่ 5) และเมื่อพิจารณาผลของแต่ละปัจจัยพบว่าอุณหภูมิ (X₁) มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (X₂) ไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนั้นยังพบว่าแต่ละปัจจัย (X₁X₂) ไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 5)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วย เนื่องจากอุณหภูมามีผลต่อการย่อยสลายสารอาหารของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก นอกจากนั้นยังมีผลต่อระยะการปรับตัวของจุลินทรีย์ในการใช้สับสเตรทเพื่อผลิตไฮโดรเจน โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 40°C ไปยัง 45°C จุลินทรีย์จะมีกิจกรรมการทำงานและผลิตไฮโดรเจนได้ดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 45°C ไปยัง 50°C กิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์ในการผลิตไฮโดรเจนจะลดลงส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมลดลง (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการศึกษาของ Wang และคณะ (2008) ที่พบว่าในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนโดยชีววิธีเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 20°C ไปยัง 40°C จะส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนมีค่าเพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มจาก 40°C ไปยัง 50°C จะส่งผลให้ไฮโดรเจนสะสมมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมามีผลสำคัญต่อการทำงานของจุลินทรีย์ จากสมการแบบจำลองทางสถิติพบว่าที่อุณหภูมิ 44.49°C และค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.59 จะให้ค่าไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 44.35 มิลลิโมล H₂/ลิตรของสารตั้งต้น (ภาพที่ 3) และเมื่อพิจารณาผลปริมาณน้ำตาลพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลเพื่อเป็นสับสเตรทในการเจริญเติบโตและผลิตไฮโดรเจนส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลลดลง (รูปที่ 4) และมีปริมาณไฮโดรเจนสะสมเพิ่มขึ้น แต่หากเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักปริมาณน้ำตาลมีค่าคงที่แสดงว่าจุลินทรีย์ไม่มีการใช้น้ำตาลส่งผลให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมคงที่ โดยในระหว่างการหมักจุลินทรีย์จะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นไฮโดรเจนและมีการสร้างกรดไขมันระเหยง่าย เช่น อะซิติก บิวทริก ซึ่งจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงตามไปด้วย (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 4 อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากชุดการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการออกแบบการทดลองทางสถิติ Central Composite Design (CCD)

Run #	Variables/levels				H ₂ production (mmol H ₂ /L substrate)	
	Temperature		Initial pH		Observed	Predicted
	Actual (°C)	Code	Actual	Code		
1	40	-1	5.00	-1	32.30	32.68
2	50	1	5.00	-1	31.28	29.63
3	40	-1	6.00	1	32.14	35.21
4	50	1	6.00	1	30.32	31.35
5	38	-1.414	5.50	0	30.97	28.83
6	52	1.414	5.50	0	23.22	23.95
7	45	0	4.79	-1.414	35.35	36.54
8	45	0	6.21	1.414	42.14	39.54
9	45	0	5.50	0	43.21	44.35
10	45	0	5.50	0	44.75	44.35
11	45	0	5.50	0	42.81	44.35
12	45	0	5.50	0	45.35	44.35
13	45	0	5.50	0	41.92	44.35

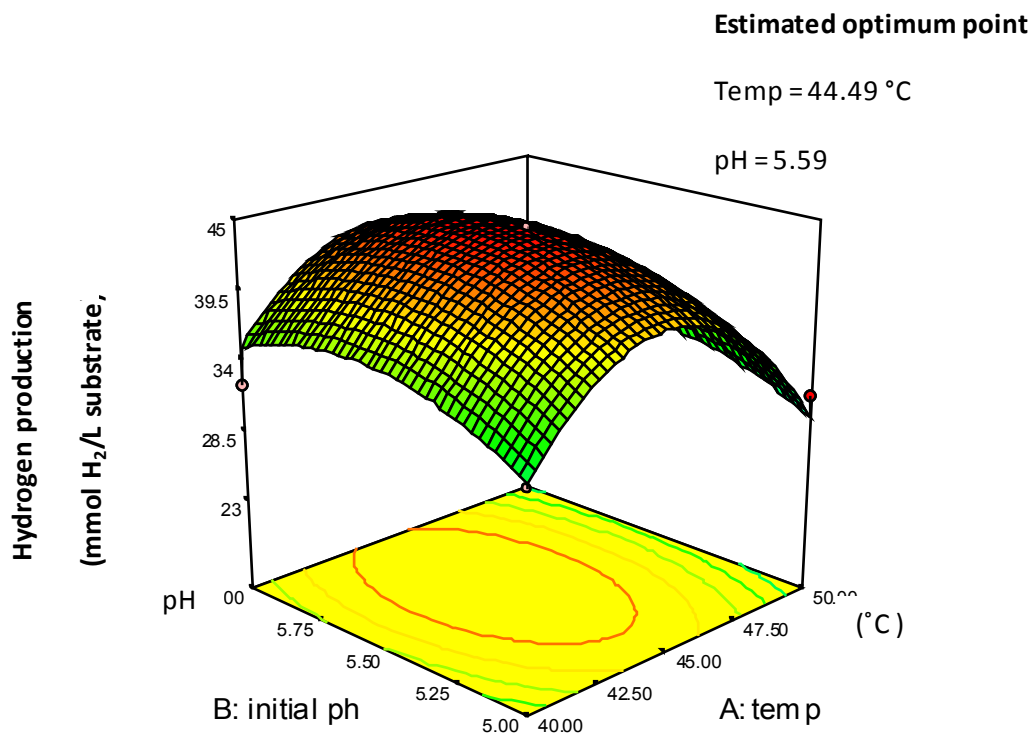
ตารางที่ 5 ผลของ ANOVA จากการออกแบบการทดลองทางสถิติ Central Composite Design (CCD) สำหรับการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพจากเปลือกกล้วย

Term	Sum of squares	Degree of freedom	Coefficient estimate	Standard error	F-value	P-value <i>Prob>F</i>
Intercept	621.93	5	44.35	0.87	32.72	0.0001
X_1	23.84	1	-1.73	0.69	6.27	0.0407
X_2	8.99	1	1.06	0.69	2.37	0.1679
X_1X_2	0.16	1	1	-2.51	0.042	0.8431
X_1^2	561.09	1	1	-10.73	147.61	<0.0001
X_2^2	69.24	1	1	-4.90	18.21	0.0037
Error	0.0004					
Total	648.54	12				

A coefficient of determination (R^2) = 0.9590

3.3 การศึกษาขั้นยืนยันผลจากการออกแบบการทดลองทางสถิติ (Confirm test)

จากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 3.2 พบว่าที่อุณหภูมิ 44.49 °ซ และค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.59 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วย การทดลองเพื่อยืนยันผลจากขั้นตอนที่ 3.2 และการศึกษาผลของการเติม Endo nutrient ต่อการผลิตไฮโดรเจนในสภาวะดังกล่าวพบว่าไฮโดรเจนสะสมจากการทดลองที่อุณหภูมิ 45 °ซ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.6 (optimum point) มีค่าเท่ากับ 43.08 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น (ตารางที่ 5) ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนจากค่าที่ได้จากการออกแบบการทดลองทางสถิติเพียง 3.26% แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองทางสถิติดังกล่าวสามารถใช้ทำนายค่าการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วยสุกทุกชุดโดยกลุ่มจุลินทรีย์ชอบร้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการศึกษาผลของการเติม Endo nutrient ต่อการผลิตไฮโดรเจนพบว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม Endo nutrient จะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมน้อยกว่าชุดที่เติม Endo nutrient แสดงให้เห็นว่าการเติม Endo nutrient มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากสารอาหารเสริมใน Endo nutrient เช่น Fe^{+2} และ Mg^{+2} มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจน โดยเมื่อความเข้มข้นของ Fe^{+2} ลดลงจะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ในการผลิตไฮโดรเจนลดลง (Saraphirom and Reungsang, 2010) เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาล (ภาพที่ 6) พบว่าปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดลง แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลในการผลิตไฮโดรเจน และเมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่าง (ภาพที่ 7) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง แสดงให้เห็นว่าปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายมีปริมาณเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณไฮโดรเจนสะสมที่ผลิตขึ้น (Pattra และคณะ, 2008)



Design-Expert® Software

hydrogen production

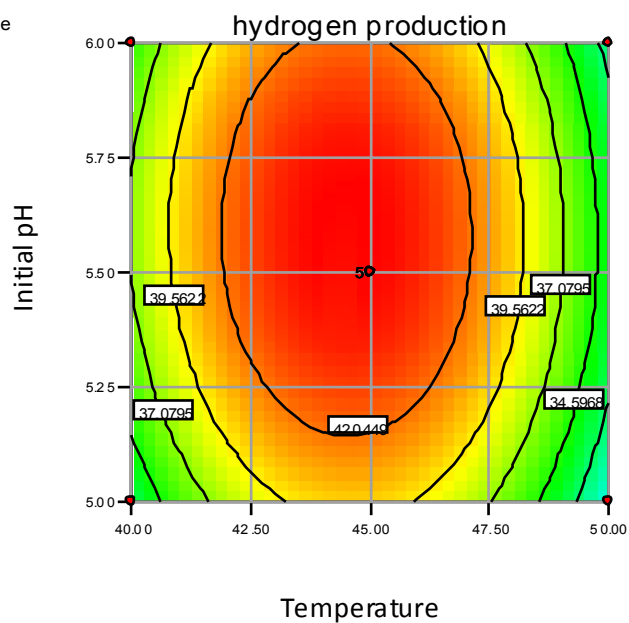
● Design Points

44.3537

23.2189

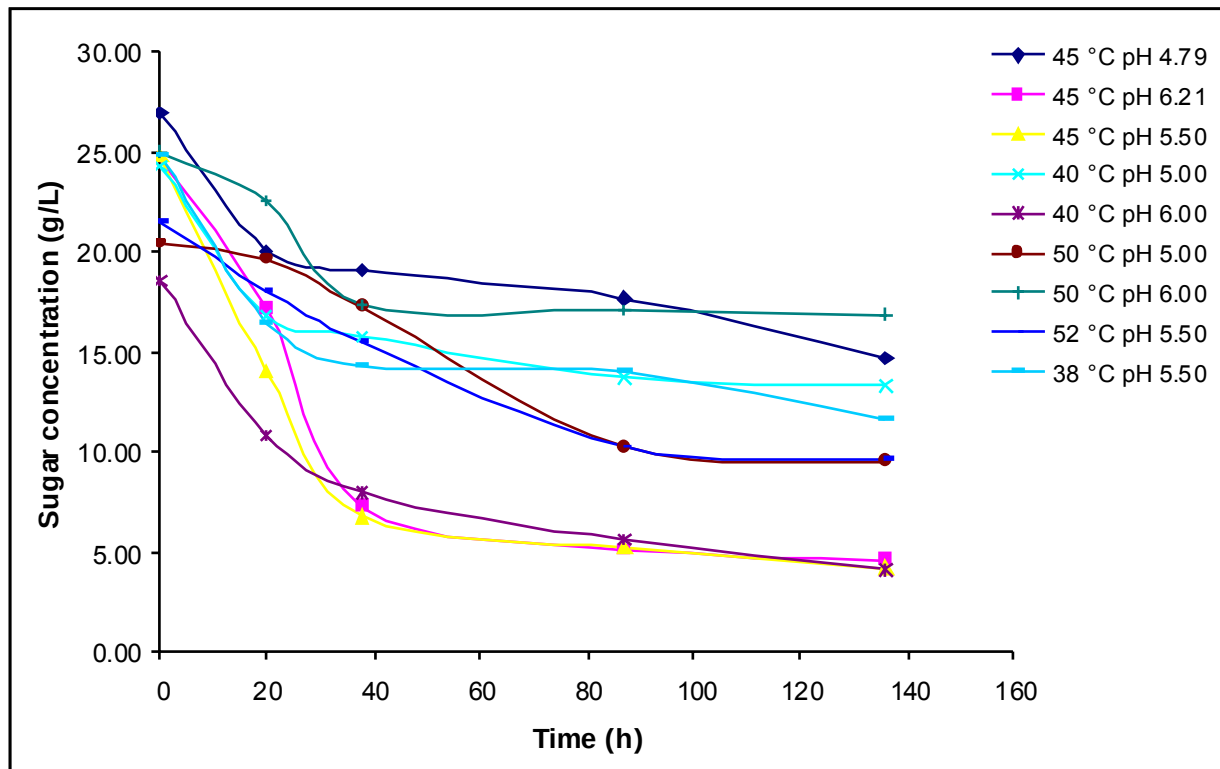
X1 = A: temp

X2 = B: initial pH

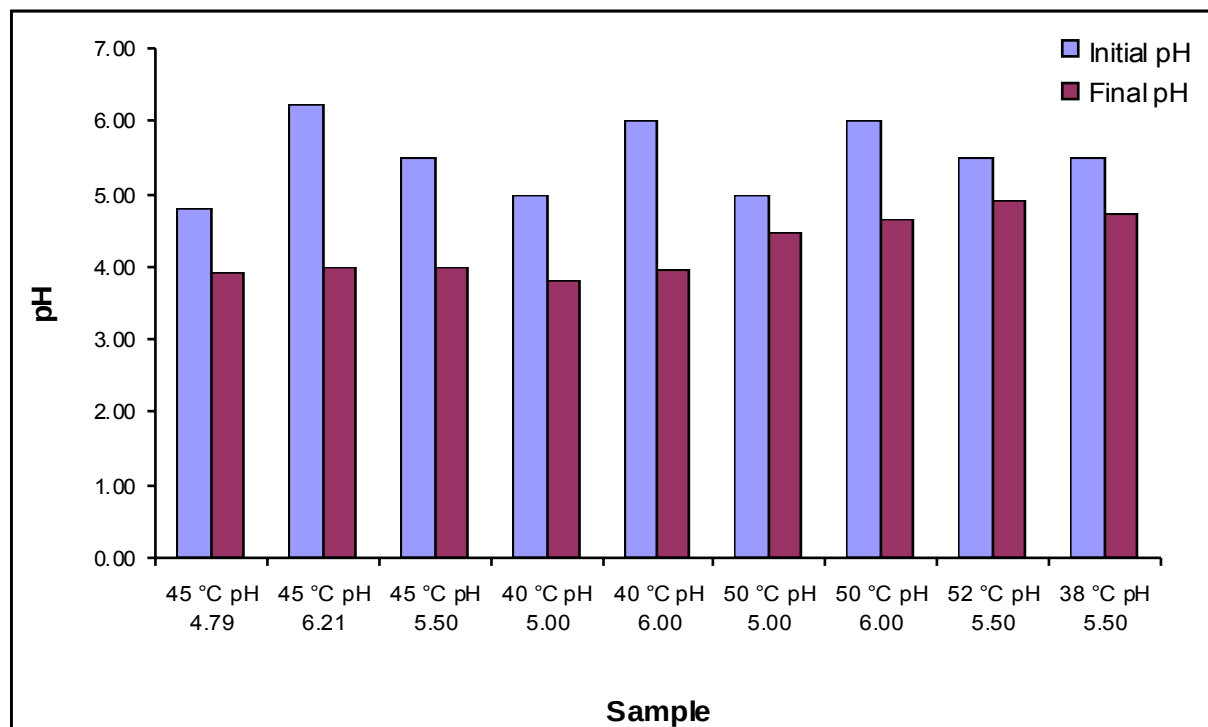


ภาพที่ 2 กราฟ 3 มิติและ 2 มิติที่แสดงอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นและอุณหภูมิ

ต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วย



ภาพที่ 3 แสดงความเข้มข้นของน้ำตาลที่เวลาต่างๆ ในแต่ละชุดการทดลอง

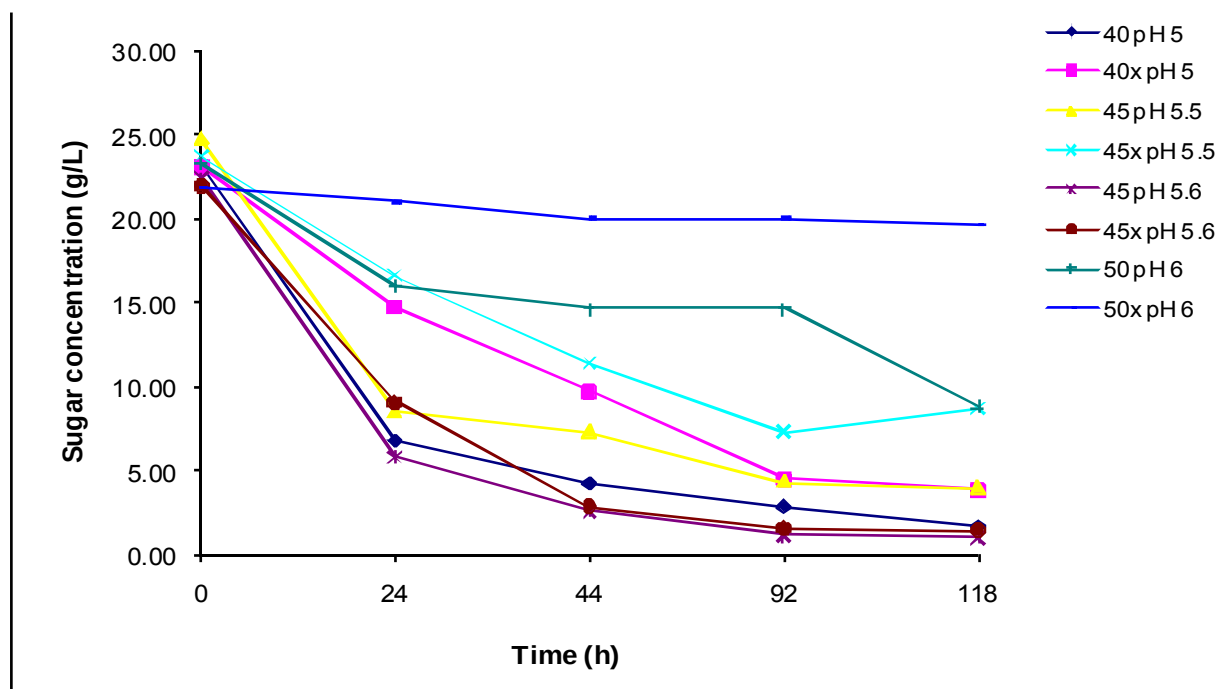


ภาพที่ 4 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นและสุดท้ายที่สภาวะต่างๆ ในแต่ละชุดการทดลอง

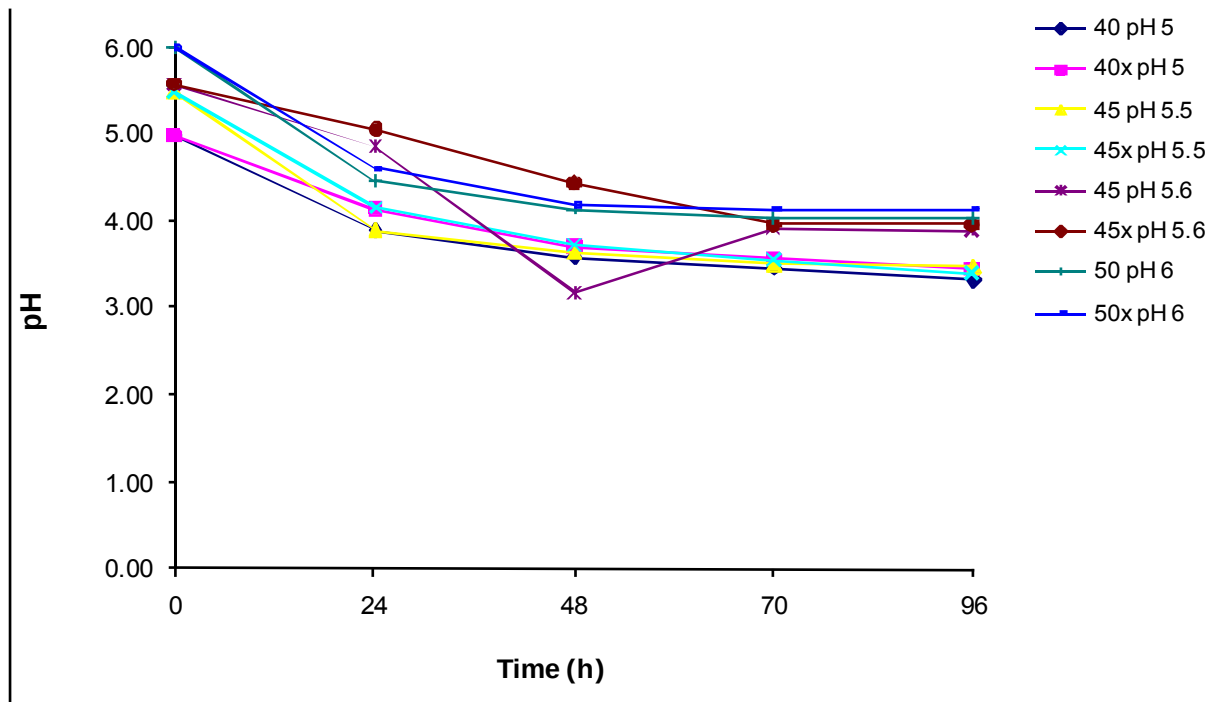
ตารางที่ 6 แสดงปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุด อัตราการผลิตไฮโดรเจนและค่า lag time ในการผลิตไฮโดรเจน
ในขั้นตอนยืนยัน

Run #	condition	sample	H ₂ production (mmol H ₂ /L)	Rm (mmol H ₂ /L/H)	lag time (H)	R ²
1	Worst	40 °C pH 5	29.63	0.68	0.00	0.99
-	Worst (control)	40x °C pH 5	20.32	0.46	0.18	1.00
9-13	Medium	45 °C pH 5.5	41.25	2.20	0.00	0.97
-	Medium(control)	45x °C pH 5.5	29.14	1.89	0.00	0.97
4	High	50 °C pH 6	33.75	2.34	0.49	1.00
-	High (control)	50x °C pH 6	22.23	2.46	0.00	0.99
-	Optimum	45 °C pH 5.6	43.08	1.48	0.00	0.99
-	Optimum(control)	45x °C pH 5.6	37.40	1.52	0.00	0.97

*control คือชุดการทดลองที่ไม่เติม Endo nutrient



ภาพที่ 5 แสดงความเข้มข้นของน้ำตาลที่เวลาต่างๆ ในแต่ละชุดการทดลองในขั้นตอนยืนยัน



ภาพที่ 6 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เวลาต่างๆ ในแต่ละชุดการทดลองในขั้นตอนขึ้นย่น

4. สรุปผล

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่อการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วย โดยกลุ่มจุลินทรีย์ชอบร้อน สามารถสรุปผลได้ดังนี้

4.1 ช่วงอุณหภูมิที่ 40, 50 และ 60°C ให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสมสูงสุดเท่ากับ 1.91, 0.86 และ 0.00 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น ตามลำดับ

4.2 การเติมหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจนจะให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสม (1.91 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น) สูงกว่าชุดที่ไม่เติมหัวเชื้อผลิตไฮโดรเจน (1.04 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น)

4.3 สภาวะเหมาะสมที่ให้ค่าไฮโดรเจนสะสมสูงสุด คือ อุณหภูมิ 44.49 °C pH 5.59 โดยให้ค่าไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 44.35 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น

4.4 อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ($p < 0.05$) ขณะที่ความเป็นกรด-ด่างไม่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ($p > 0.05$) และยังพบว่าแต่ละปัจจัยไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ($p > 0.05$)

4.5 ผลจากการทดลองขึ้นย่นพบว่า ไฮโดรเจนสะสมสูงสุดจากการทดลองมีค่าเท่ากับ 43.08 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนจากค่าที่ได้จากการทดลองทางสถิติเพียง 3.26% แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองทางสถิติดังกล่าวสามารถใช้ทำนายค่าการผลิตไฮโดรเจนจากเปลือกกล้วยสุกอบโดยกลุ่มจุลินทรีย์ชอบร้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.6 การเติม Endo nutrient มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งชุดที่เติม Endo nutrient ให้ปริมาณไฮโดรเจนสะสม (43.08 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น) สูงกว่าชุดที่ไม่เติม Endo nutrient (37.40 มิลลิโมล H_2 /ลิตรของสารตั้งต้น)

5. เอกสารอ้างอิง

- Akano T., Miura Y., Fukatsu K., Miyasaka H., Ikuta, Y., Matsumoto, H., Hamasaki. A., Shioji, N., Mizoguchi, T., Yagi, K. and Maeda, I., Hydrogen production by photosynthetic microorganisms, Appl. Biochem. Biotechnol., 1996; 57/58: 677-688
- Kayisu K., Hood L.F. and Vansoest P.J. Characterization of starch and fiber of banana fruit. Journal of Food Science. 1981; 46, 1885-1890
- Pattra S., Sangyoka S., Boonmee M. and Reungsang A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. International Journal of Hydrogen Energy. 2008; 33: 5256-5265
- Lin C.Y. and Lay C.H. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. 2005; 30: 285-292
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith, F., Phenol sulfuric total sugar. Analytical Chemistry. 1956; 28: 350-356
- Sangyoka S., Reungsang A. and Moonamart S. Repeated-batch fermentative for bio-hydrogen production from cassava starch manufacturing wastewater. Pakistan Journal of Biological Science. 2007; 10:1782-1789.
- Zheng X.J. and Yu H.Q. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. J Environmental Management 2005; 74: 65-70.
- Datar R., Huang, J., Maness P.C. and Mohaghehi A., Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. International Journal of Hydrogen Energy. 2007; 32: 932-939
- Wang J. and Wan W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy. 2008; 33: 5392-5397
- Saraphirom P. and Reungsang A.. Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. International Journal of Hydrogen Energy. 2010; 4: 1-10