

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพทดแทนเชื้อเพลิงจากฟอสซิลโดยกระบวนการทางชีวภาพ มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายมากขึ้น ในการพัฒนาที่ผ่านมา การผลิตไฮโดรเจนมีแนวโน้มที่จะเป็นพลังงานที่มีประสิทธิภาพในอนาคต เนื่องจากมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนไปเป็นพลังงานได้สูง ไม่ก่อมลพิษ (Hallenback and Ghosh, 2009) มีเทคโนโลยีที่หลากหลายสำหรับการผลิตไฮโดรเจนทางชีวภาพ การผลิตไฮโดรเจนโดยจุลินทรีย์จากของเสียอินทรีย์กำลังได้รับการสนใจ เนื่องจากเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงภายในห้องปฏิบัติการ (Angenent et al., 2004) นอกจากนี้ข้อดีของวิธีการนี้ คือ จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูง ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนค่อนข้างสูง การดำเนินการไม่จำเป็นต้องใช้แสง และไม่มีปัญหาข้อจำกัดออกซิเจน รวมทั้งต้นทุนในการผลิตต่ำในโรงงานขนาดเล็ก ($100-1,000 \text{ m}^3\text{H}_2/\text{h}$) (Hawkes et al., 2002; Levin et al., 2004) กระบวนการผลิตโดยจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบเป็นของเสียอินทรีย์ ที่มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลสและแป้ง ซึ่งพบได้ในของเสียจากการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร เช่น น้ำเสียจากอุตสาหกรรมเนย อุตสาหกรรมน้ำมันมะกอก อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม และอุตสาหกรรมขนมปัง ในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้ (Kapdan and Kargi, 2006)

ผลผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์จากของเสียอินทรีย์ เช่น น้ำเสียจากกระบวนการผลิตแอปเปิ้ล น้ำเสียจากกระบวนการผลิตมันฝรั่ง ของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร น้ำเสียจากอุตสาหกรรมแป้ง และน้ำเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม คือ $92 \text{ } 128 \text{ } 57 \text{ } 92$ และ $115 \text{ ml H}_2/\text{gCOD}$ (Van Ginkel et al., 2008; Zhang et al., 2003; O-Thong et al., 2007) น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Palm oil mill effluent; POME) เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนและมีปริมาณมากในประเทศไทย มาเลเซียและอินโดนีเซีย ในการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil; CPO) 18.8 ล้านตัน ทุกๆ หนึ่งตันของน้ำมันปาล์มดิบจะก่อให้เกิดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิต 5-7.5 ตัน หรือประมาณ 94 ล้านตันต่อปี (Gobi and Vadivelu, 2013) Hoanh et al. (2010) ประสบความสำเร็จในการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้จุลินทรีย์ผสมในการผลิตภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (55°C) ที่อัตราการผลิตไฮโดรเจน (biohydrogen production rate; HPR) $2.64 \text{ m}^3\text{H}_2/\text{m}^3\text{d}$ ภายในถังปฏิกรณ์แบบ CSTR ที่ระยะเวลากักเก็บ (hydraulic retention time; HRT) 4 วัน Prasertsan et al. (2009) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME) แบบต่อเนื่อง โดย *Thermoanaerobacterium*-rich sludge ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (60°C) ที่สภาวะที่เหมาะสม คือ HRT 2 วัน และ OLR (organic loading rate) $60 \text{ gCOD}/\text{l.d}$ ในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ $9.1 \text{ l H}_2/\text{l.d}$

(16.9 mmol H₂/l.h) ความก้าวหน้าของลักษณะของจุลินทรีย์ชอบร้อน (thermophilic microorganisms) ที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจนใหม่ๆ ที่ผ่านมาก มีจำนวนมากขึ้น และให้ผลได้ (hydrogen yields) ไฮโดรเจนสูงขึ้นในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (Willquist et al., 2012) **Thermoanaerobacterium thermo-saccharolyticum (Tbm. thermosaccharolyticum)** เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ผลิตไฮโดรเจน สามารถผลิตไฮโดรเจนได้ประมาณ 2-3 molH₂ ต่อ mole glucose จากของเสียอินทรีย์ ซึ่งค่าผลได้ไฮโดรเจนสูงสุดทางทฤษฎี คือ 4 mol H₂ ต่อ mole glucose (O-Thong et al., 2008) **Tbm. Thermosaccharolyticum** หลายสายพันธุ์ที่สามารถตัดแยกได้ เช่น สายพันธุ์ PSU-2 (O-Thong et al., 2008) สายพันธุ์ GD17 (Liu et al., 2008) สายพันธุ์ W16 (Cao et al., 2010) สายพันธุ์ KKU19 (Khamtib and Reungsang, 2012) สายพันธุ์ IIT BT-ST1 (Roy et al., 2014) นอกจากนี้ **Tbm. Thermosaccharolyticum** ยังสามารถเจริญได้ในของเสียอินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งของเสียประเภทเฮมิเซลลูโลสและลิกโนเซลลูโลส (Liu et al., 2008; Mamimin et al., 2012)

อย่างไรก็ตามความท้าทายของการผลิตไบโอไฮโดรเจน คือ การผลิตให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ ความท้าทายแรก คือ ประสิทธิภาพการเปลี่ยนไปของวัตถุดิบที่ต่ำ ซึ่งในการผลิตไฮโดรเจนแบบดั้งเดิมนั้นจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นพลังงาน (ไฮโดรเจน) ได้เพียงร้อยละ 7.5-15 ของพลังงานที่มีในของเสียอินทรีย์ ส่วนพลังงานที่เหลือ (ประมาณร้อยละ 65) ที่ไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนจะอยู่ในรูปของกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acids; VFA) (Hallenback and Ghosh, 2009) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นกรดบิวทีริก (butyric acid) กรดอะซิติก (acetic acid) กรดแลคติก (lactic acid) และกรดโพรไพโอนิก (propionic acid) ดังนั้น VFA จึงสามารถเปลี่ยนไปเป็นพลังงานอย่างเช่น มีเทน ผ่านกระบวนการเมทาโนจีเนซิส methanogenesis) โดยจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนเจน (methanogens) ภายใต้สภาวะการย่อยสลายแบบไร้อากาศ (Liu et al., 2013) การเปลี่ยน VFA ไปเป็นมีเทนผ่านกระบวนการย่อยสลายแบบไร้อากาศ (anaerobic digestion; AD) สามารถเปลี่ยนได้อย่างอย่างรวดเร็วและง่ายกว่าการเปลี่ยน VFA เป็นไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบใช้แสง (photo-fermentation) และกระบวนการทางชีวไฟฟ้าเคมี (microbial-electrolysis process) (Hallenback and Ghosh, 2009) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงการเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอไฮเทน (biohythane) ซึ่งเป็นส่วนผสมของไฮโดรเจนและมีเทน (Kongjan et al., 2011; Luo et al., 2011) ซึ่งนำไปใช้ในทางเคมีหรือใช้เป็นพลังงานในเครื่องยนต์ ไบโอไฮเทนสามารถผลิตได้ผ่านการหมักแบบสองขั้นตอนของจุลินทรีย์ (two-stage microbial fermentation) โดยในขั้นตอนแรก วัตถุดิบจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนและ VFA หลังจากนั้น VFA จะถูกเปลี่ยนไปเป็นมีเทนในขั้นตอนที่สอง (Liu et al., 2013) ผลิตภัณฑ์จากการผลิตไฮโดรเจนมีความสำคัญมากสำหรับการจัดการระบบไบโอไฮเทน เนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวส่งผลต่อการภาวะบรรทุกที่มีประสิทธิภาพและความเสถียรของระบบในระยะเมทาโนจีเนซิส (Wang and Zhao, 2009) อัตราการเปลี่ยนจาก VFA เป็นกรดอะซิติกจะส่งผลต่อคุณภาพของ

methanogenic archaea และมีผลต่ออัตราการย่อยสลายของกรดอะซิติกและผลได้มีเทน (methane yield)

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ พัฒนาระบบการหมักแบบสองขั้นตอน สำหรับการผลิตไบโอไฮเทนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของระบบผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบต่อเนื่อง ผลของกรดไขมันระเหยได้ (VFA) ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนต่อการผลิตมีเทนและโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูง และสุดท้ายการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์แบบ UASB นอกจากนี้แนวคิด bio-refinery ใหม่ ในอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันยังช่วยพัฒนาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (ไฮโดรเจนและมีเทน) เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการทั้งหมด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการหมักแบบไร้แสงที่อุณหภูมิสูง

1.2.2 ศึกษาศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำหมักหลังการผลิตไฮโดรเจนโดยกลุ่มจุลินทรีย์แบบไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง

1.2.3 ศึกษาผลของกรดไขมันระเหยได้ (VFA) ต่อการผลิตมีเทนและโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูง

1.2.4 ศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR) และมีเทน (ในถังปฏิกรณ์แบบ UASB) จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศสองขั้นตอนภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิสูง ศึกษาศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำหมักหลังการผลิตไฮโดรเจนโดยกลุ่มจุลินทรีย์แบบไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง และทำการศึกษาผลของกรดไขมันระเหยง่ายที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนต่อการผลิตมีเทน และโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ผลิตมีเทนที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังทำการผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR) และมีเทน (ในถังปฏิกรณ์แบบ UASB) จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศสองขั้นตอน

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Palm oil mill effluent; POME) ประกอบด้วยสารอินทรีย์ปริมาณสูง (COD อยู่ในช่วง 58-100 g COD/l) หากปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดมลพิษได้ จึงจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ไร้อากาศสามารถหมักสารอินทรีย์ใน POME สำหรับการผลิตไฮโดรเจนโดยกระบวนการหมักแบบไร้แสง (dark fermentation) แต่อย่างไรก็ตามยังคงเหลือพลังงานร้อยละ 65 ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ในรูปของกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid; VFAs) ซึ่ง VFA สามารถเปลี่ยนไปเป็นมีเทนได้โดยจุลินทรีย์เมทาโนเจนภายใต้สภาวะการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ส่วนผสมของไฮโดรเจนและมีเทนเป็นพลังงานที่มีประสิทธิภาพซึ่งรู้จักกันในนามไบโอไฮเทน ไบโอไฮเทนสามารถใช้เป็นสารเคมีหรือเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในปี 2553 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันมากกว่า 3,900,000 ไร่ (624,000 เฮกเตอร์) ใน 25 จังหวัด และพบมากในบริเวณภาคใต้ (จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง) (Department of Commercial Economics. 2010) โดยรวมแล้วอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันมีความสำคัญต่ออัตราการแลกเปลี่ยนผลกำไรและการเพิ่มขึ้นของมาตรฐานชีวิตโดยรวมของไทย (Wu et al., 2009)

2.1.1 น้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

การสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน มีการใช้น้ำในการผลิตมากและก่อให้เกิดน้ำทิ้งในขั้นตอนการแยกน้ำมัน เมื่อน้ำมันถูกกลั่นเข้าถังพักหรือถังลอย ส่วนของน้ำมันซึ่งเบากว่าน้ำจะลอยตัวอยู่ด้านบน และถูกแยกออกไป ส่วนด้านล่างจะเป็นของผสมลักษณะเหลวข้น เรียกว่า น้ำสลัดจ์ ถูกส่งเข้าถังตกจม (settling tank) และผ่านเข้าเครื่องแยกกรวดทราย ก่อนจะนำเข้าไปในเครื่องแยกน้ำมันโดยใช้ separator หรือ decanter ต่อไป สำหรับ decanter เมื่อใช้งานไประยะหนึ่งต้องมีการล้างทำความสะอาดในขั้นตอนนี้จะได้น้ำทิ้งออกมา 200-250 ลิตรต่อครั้ง จากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานจะมีน้ำทิ้งออกมามาก ส่วนใหญ่มาจากขั้นตอนการอบทะเลลายปาล์ม ในรูปน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (sterilizer condensate) และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10 ตันทะเลลายปาล์ม (Wu et al., 2009) ลักษณะของน้ำทิ้งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำทิ้งและกระบวนการสกัดที่ใช้ ได้แก่ น้ำทิ้งจากบ่อรวมน้ำเสีย น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ และน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ น้ำทิ้งจากบ่อรวมน้ำเสียของโรงงานมีค่า BOD สูง (20,000-60,000 mg/l) และ COD อยู่ในปริมาณสูง (40,000-120,000 mg/l) (Yusof et al., 2000) รวมทั้งค่ากรดไขมัน ปริมาณของแข็งทั้งในรูปสารที่ระเหยได้ และสารแขวนลอย น้ำทิ้งจากหม้อหนึ่งมีปริมาณสารแขวนลอยต่ำ (เฉลี่ย 10.30 g/l) และมีน้ำมันค่อนข้างสูง (เฉลี่ย 14.57 g/l) ส่วนน้ำทิ้งจาก separator ยังคงมีน้ำมันเหลืออยู่ 12.87 g/l ในขณะที่น้ำมันจากดีแคนเตอร์มีน้ำมันอยู่ 15.21 g/l ส่วนน้ำทิ้งจากบ่อบำบัดน้ำทิ้งรวมมีน้ำมัน 9.45 g/l นอกจากนี้ยังมีรายงานองค์ประกอบของ น้ำทิ้ง และแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญ ซึ่งแร่ธาตุที่มีมากที่สุด คือ โพแทสเซียม (K) ซึ่งมีสูงถึง 3475 mg/l รองลงมาคือ แมกนีเซียม (Mg) และแคลเซียม (Ca) ในปริมาณ 212 และ 185 mg/l ตามลำดับ (Wu et al., 2009)

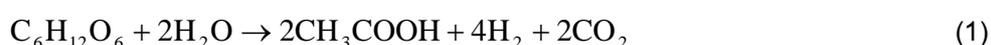
ตารางที่ 2.1 ลักษณะน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

องค์ประกอบ	อ้างอิง			
	Zinatizadeh, et al., 2006	Bhatia, et al., 2007	Ahmad, et al., 2007	Vijayaraghavan, et al., 2007
BOD* (mg/l)	22,700	–	25,000	25,545
pH	4.0	4.5	4.7	3.5
SS* (mg/l)	–	17,927	18,000	18,479
Total solids (mg/l)	19,780	39,470	40,500	–
COD* (mg/l)	44,300	40,200	40,200	55,775
Nitrogen (mg/l)	780 (TKN)	800 (TKN)	35 (NH ₃ -N)	711
Phosphorus (mg/l)	–	–	180	–

* BOD = Biochemical oxygen demand, SS = Suspended solids, COD = Chemical oxygen demand

2.2 ไฮโดรเจน

ไฮโดรเจนถือได้ว่าเป็นพลังงานเชื้อเพลิงอนาคต (Lee et al., 2010) เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการเผาไหม้ของไฮโดรเจนให้ค่าพลังงานสูงได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำแตกต่างจากเชื้อเพลิงอื่นๆ ที่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลพลอยได้ซึ่งเป็นก๊าซเรือนกระจก ไฮโดรเจนจึงเป็นพลังงานเชื้อเพลิงสะอาดที่สามารถผลิตได้จากซัสเตรทหมุนเวียน (O-Thong et al., 2011) ก๊าซไฮโดรเจนสามารถผลิตได้โดยกระบวนการหมักสารอินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โดยอาศัยแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น กลุ่มของ *Enterobacter*, *Bacillus* และ *Clostridium* (Khanal, 2008) ปริมาณของก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากการหมักขึ้นอยู่กับสารตั้งต้น วิธีของกระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น หากใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลกลูโคส และ pathway ของการหมักทำให้ได้กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะผลิตไฮโดรเจนได้ 4 mol/mol glucose (สมการที่ 1) ในขณะที่เมื่อผลิตภัณฑ์สุดท้าย เป็นกรดบิวทริกจะผลิตไฮโดรเจนได้เพียง 2 mol/mol glucose (สมการที่ 2)



โดยทางทฤษฎีนั้น pathway ของการหมักที่จะให้ปริมาณ H₂ มากที่สุด คือ acetate pathway ในทางปฏิบัติการหมักที่ได้ end products เป็น acetate และ butyrate ให้ผลผลิต H₂ สูง แต่ถ้า end products เป็น propionate และ reduced end products อื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์ และ

lactic acid จะให้ผลผลิต H_2 ที่ต่ำกว่า ดังนั้นสิ่งแวดล้อมในการหมักจึงควรสนับสนุนให้การหมักก่อให้เกิดกรดไขมันระเหย (volatile fatty acid ,VFA) ซึ่งเทคโนโลยีด้านนี้ได้มีการพัฒนาไปมากแล้วในด้านการจัดการน้ำเสีย จากแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในกลุ่มของ *Enterobacter*, *Bacillus* และ *Clostridium* พบว่า ***Clostridium pasterianum***, ***C. butyricum*** และ ***C. beijerinckii*** เป็นแบคทีเรียที่ให้ผลผลิตไฮโดรเจนสูง ในขณะที่ ***C. propionicum*** ให้ผลผลิตไฮโดรเจนต่ำ ปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายประการที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ มีผลต่อการผลิตก๊าซไฮโดรเจนด้วย เช่น pH, hydraulic retention time (HRT) และ partial pressure ของก๊าซ H_2

ตารางที่ 2.2 กระบวนการผลิตไฮโดรเจน

กระบวนการ	ปฏิกิริยา	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง
1. Direct biophotolysis	$2H_2O + \text{light} \rightarrow 2H_2 + O_2$	Microalgae
2. Photo fermentations	$CH_3COOH + 2H_2O + \text{light} \rightarrow 2H_2 + O_2$	Purple bacteria, Microalage
3. Indirect biophotolysis	a $6CO_2 + 6H_2O + \text{light} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$	Microalgae
	b $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2 CH_3COOH + 2CO_2$	Microalgae
	c $2 CH_3COOH + 4H_2O + \text{light} \rightarrow 8H_2 + 4CO_2$	Cyanobacteria
4. Water gas shift reaction	$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$	Fermentative bacteria
		Photosynthetic bacteria
5. Two-phase $H_2 + CH_4$ fermentation	a $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2 CH_3COOH + 2CO_2$	Fermentative bacteria +
	b $2 CH_3COOH + 6H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2CO_2$	Methanogenic bacteria
6. High yield dark fermentations	$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 12H_2 + 6CO_2$	Fermentative bacteria

ที่มา : Reith et al. (2003)

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

การผลิตไฮโดรเจนโดยแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสับสเตรต ความเป็นกรด-ด่าง และระยะเวลาการกักเก็บ ซึ่งสภาวะเหล่านี้มีผลกระทบต่อความสมดุลของระบบเมตาบอลิซึม ดังนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมักจึงขึ้นอยู่กับสภาวะของสิ่งแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญอยู่ และผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากระบบการหมัก เช่น เอทานอล บิวทานอล และ แลคเตท รวมทั้งจะมีไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยเพียงแต่ไม่ถูกปลดปล่อยออกมาในรูปก๊าซ

1) ปริมาณของสับสเตรต

ชนิดและปริมาณของสับสเตรตมีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวภาพ ส่วนใหญ่มักจะเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นแหล่งพลังงานของสิ่งมีชีวิต (Kapdan and Kargi, 2006) ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องการสับสเตรตช่วยในกระบวนการเมตาบอลิซึม แต่ปริมาณสับสเตรตต้องเหมาะสมจึงจะสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์และ

เกิดผลผลิตได้สูง จากรายงานของ Chen et al. (2005) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจาก *C. butyricum* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสับสเตรต พบว่า ปริมาณซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนคือ 20 gCOD/l หรือ 17.8 g/l สามารถให้ผลได้ไฮโดรเจนเท่ากับ 2.91 mol H₂/mol Sucrose ถ้าเพิ่มปริมาณซูโครสสูงถึง 30 gCOD/l ทำให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนลดลง โดยมีผลได้ไฮโดรเจนเท่ากับ 1.73 mol H₂/mol Sucrose แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนโดยสับสเตรตที่มีความเข้มข้นสูง

ตารางที่ 2.3 ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตไฮโดรเจน

Factor	Affects	References
สับสเตรต	- แมทาบอไลซิซึมการหมัก กิจกรรมของจุลินทรีย์	Kraemer and Bagley (2006)
กล้ำเชื้อ	- แมทาบอไลซิซึมการหมัก	
พีเอช	- แมทาบอไลซิซึมการหมัก กิจกรรมของจุลินทรีย์ ประจุผนังเซลล์จุลินทรีย์	Hawkes et al. (2007)
อุณหภูมิ	- แมทาบอไลซิซึมการหมัก กิจกรรมของจุลินทรีย์	Fang and Yu (2001)
HRT	- แมทาบอไลซิซึมการหมัก กิจกรรมของจุลินทรีย์	Li and Fang (2007)
สารอาหาร	- จำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ ส่งผล ต่อโครงสร้างเอนไซม์และการผลิตไฮโดรเจน	Khanal (2008)
แรงดัน H ₂	- อาจส่งผลต่อแอมทาบอไลซิซึมและกิจกรรมการหมัก อาจส่งผลต่อกิจกรรมของ acetogens และ methanogen	Hawkes et al. (2007)

2) กล้ำเชื้อ

จุลินทรีย์หลากหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรีย อาเคียและยีสต์ สามารถผลิตไฮโดรเจนผ่านกระบวนการหมักแบบไร้แสง (dark fermentation) โดย Clostridia และ enteric bacteria เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในการผลิตไฮโดรเจน Clostridia เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น ส่วน Enteric bacteria สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตไฮโดรเจนแพร่หลายอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น สลัดจ์ในระบบบำบัดน้ำเสีย ดิน สลัดจ์ในน้ำทิ้ง ปุ๋ยหมัก เป็นต้น (Lay et al., 2010) ดังนั้นจึงมีการนำวัสดุเหล่านี้มาใช้เป็นกล้ำเชื้อผลิตไฮโดรเจน หลายงานวิจัยมีการใช้เชื้อผสมจากสลัดจ์ ตะกอนน้ำพุร้อน ปุ๋ยหมักและดินเป็นกล้ำเชื้อในการผลิตไฮโดรเจน (Lay et al., 2010) ซึ่งการใช้กล้ำเชื้อผสมมีข้อดีกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์ในแง่ของการควบคุมที่ง่ายและสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายหลายขึ้น (Li and Fang, 2007)

3) สภาวะความเป็นกรดต่างและกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acids, VFAs)

สภาวะความเป็นกรด-ต่าง มีความสำคัญต่อการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากความเป็นกรด-ต่างมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Zheng and Yu, 2005) จากรายงานการศึกษาพบว่า การผลิตไฮโดรเจนของ *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 ที่ความเป็นกรด-ต่างเริ่มต้นที่ 4 และ 5 มีปริมาณไฮโดรเจนสะสมเท่ากับ 70.9 และ 117.5 ml mol ตามลำดับ และในระหว่างการหมักแบบไม่ใช้ออกาศผลผลิตที่เกิดขึ้นคือ กรดไขมันระเหยง่าย ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ (Kapdan and Kargi, 2006) ถ้ามีกรดไขมันระเหยง่ายในน้ำหมักปริมาณที่มากเกินไปจะมีผลต่อการผลิตไฮโดรเจน เพราะปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรด-ต่างในกระบวนการหมักและในเซลล์ของจุลินทรีย์ คือ เมื่อกรดไขมันระเหยง่ายมีปริมาณมากก็สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ทำให้สภาวะกรด-ต่างในเซลล์ลดลง ทำให้จุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานในการปรับสภาวะกรด-ต่างของเซลล์ให้สมดุล โดยการปั๊มไอออนเข้า-ออกจากเซลล์ เช่น โปแตสเซียมปั๊ม ทำให้พลังงานของเซลล์ไม่พอในการสร้างเซลล์จุลินทรีย์ใหม่หรือบางเซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถปรับสภาวะกรด-ต่างได้ จะทำให้เซลล์แตกและทำให้การผลิตไฮโดรเจนลดลง จากการศึกษาของ Zheng and Yu (2005) พบว่า ผลได้ของไฮโดรเจนลดลงจาก 1.85 เป็น 0.32 mol H₂/mol Glucose เมื่อเติมกรดบิวทริกที่ความเข้มข้นระหว่าง 4.18 ถึง 25.08 g/l ในส่วนของกรดอะซิติกก็แสดงผลการผลิตไฮโดรเจนเช่นเดียวกับกรดบิวทริก

ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในขั้นตอนแรกมีปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย (VFA) ในปริมาณสูง โดยมีกรดอะซิติกและกรดบิวทริกเป็นองค์ประกอบหลักส่งผลให้ค่าซีโอดีในน้ำทิ้งเพิ่มสูงขึ้น (18,500 mg-COD/l) หากมีการปลดปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมจะนำมาซึ่งปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ และเนื่องจากกรดไขมันระเหยง่าย (VFA) สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซชีวภาพได้ ดังนั้นการนำน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมาใช้ในกระบวนการผลิตก๊าซชีวภาพจึงเป็นที่น่าสนใจ และสามารถลดปริมาณ COD ในน้ำทิ้งได้สูง แต่อย่างไรก็ตามการสะสมของกรดโพธิโอติกส่งผลต่อการทำงานที่ล้มเหลวของเมทาโนเจน จากงานวิจัยของ Siegert and Banks (2005) ที่ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นกรดไขมันระเหยง่ายต่อกระบวนการย่อยสลายไร้อากาศของเซลล์ูโลสและกลูโคส พบว่าที่ความเข้มข้นกรดไขมันระเหยง่ายสูงกว่า 2,000 mg/l นำไปสู่การยับยั้งการย่อยสลายเซลล์ูโลส ในขณะที่ความเข้มข้นกรดไขมันระเหยง่ายสูงกว่า 4,000 mg/l นำไปสู่การยับยั้งการย่อยสลายกลูโคสเพียงเล็กน้อย

4) อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ก็เพิ่มขึ้นเนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีและเอนไซม์ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เมทาบอลิซึมของ dark fermentation สามารถดำเนินการได้ในช่วงกว้าง การผลิตไฮโดรเจนในงานวิจัยส่วนใหญ่ดำเนินการในช่วงมีโซฟิลิกที่ 35-40 °C จากการศึกษาผลของ

อุณหภูมิมีโซฟิลิกและเทอโมฟิลิกต่อการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำตาลกลูโคสในถังปฏิกรณ์แบบ CSTR ผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิเทอโมฟิลิก ($\sim 2.1 \text{ mol/mol glucose}_{\text{consumed}}$) ให้ผลได้ไฮโดรเจนสูงกว่าที่อุณหภูมิมีโซฟิลิก ($\sim 1.7 \text{ mol/mol glucose}_{\text{consumed}}$) และให้อัตราการผลิตไฮโดรเจน ($\text{mmol/h}\cdot\text{L}\cdot\text{g VSS}$) สูงกว่า 5-10 เท่า ที่ HRT 12 วัน

5) ระยะเวลาที่เก็บ (Hydraulic Retention Time : HRT)

ระยะเวลาที่เก็บสัมพันธ์ต่ออัตราการเติมสารอาหารและอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (Lay, 2000) HRT เป็นพารามิเตอร์ที่หลักในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่อง โดยทั่วไป HRT สั้น (อัตราการไหลสูง) สนับสนุนเมแทบอลิซึมการหมักไฮโดรเจน โดย HRT ที่เหมาะสมคือ 0.25 h ที่อุณหภูมิมีโซฟิลิก (Zhang et al., 2008)

2.3 กระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกาศ (Anaerobic process)

ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกาศ มีปฏิกิริยาหลักๆ เกิดขึ้นอยู่ 2 ขั้นตอน (Two phase anaerobic process: TPAP) คือ 1) กระบวนการผลิตกรด (Acidogenesis) 2) กระบวนการผลิตมีเทน (Methanogenesis) ซึ่งพบว่ากระบวนการ TPAP นี้ สามารถผลิตได้ทั้งมีเทนและก๊าซไฮโดรเจนออกมาพร้อมๆ กันได้ ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ของกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกาศ (Anaerobic process) เกิดขึ้น 4 ขั้นตอนย่อยตามลำดับ ดังนี้

1) กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

ไฮโดรไลซิสเป็นกระบวนการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ให้กลายเป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโน กรดไขมัน ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ปล่อยออกมา

2) กระบวนการสร้างกรด (Acidogenesis)

ผลผลิตจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในขั้นตอนที่ 1 จะถูกแบคทีเรียพวกสร้างกรดนำไปใช้เพื่อผลิตกรดไขมันระเหยง่าย (VFA) เช่น กรดอะซิติก กรดโพรไพโอนิก กรดบิวทริก เป็นต้น ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และมีคาร์บอนอะตอมไม่เกิน 5 ตัว

3) กระบวนการสร้างกรดอะซิติกจากกรดไขมันระเหยง่าย (Acetogenesis)

กรดไขมันระเหยง่ายที่ได้จากกระบวนการสร้างกรดจะถูกแบคทีเรียอะซิโตจีนิค (Acetogenic bacteria) เปลี่ยนให้เป็นกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน ปฏิกิริยานี้มีความสำคัญเนื่องจากการลดการสะสมของกรดไขมันระเหย ซึ่งการสะสมของกรดไขมันระเหยในปริมาณสูงสามารถยับยั้งการสร้างมีเทนได้

4) กระบวนการสร้างมีเทน (Methanogenesis)

กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาของแบคทีเรียที่สร้างกรด จะถูกแบคทีเรียสร้างมีเทน (Methanogenic bacteria) ใช้สร้างมีเทน

ขั้นตอนการย่อยสลายสารอินทรีย์ (ขั้นตอนการเกิดก๊าซชีวภาพ) คือ การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยกลุ่มแบคทีเรียในสภาวะไร้อากาศ (ไร้ออกซิเจน) ผลที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ ก๊าซชีวภาพ ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นก๊าซมีเทน

2.3.1 การผลิตก๊าซชีวภาพแบบสองขั้นตอน

กระบวนการหมักไร้อากาศแบบสองขั้นตอน ได้พัฒนาใช้ในการผลิตมีเทนจากของเสียมวลชีวภาพ โดยการแยกกระบวนการ hydrolysis หรือ acidogenesis ในถึงขั้นแรกเพื่อย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงและตามด้วย methanogenesis ในถึงที่สองเพื่อผลิตมีเทน ส่งผลให้ผลผลิตก๊าซชีวภาพและประสิทธิภาพการลดมลพิษสูงกว่าระบบแบบขั้นตอนเดียว และยังมีรายงานว่าระบบสองขั้นตอนสามารถลดจำนวนแบคทีเรียในกลุ่มเชื้อก่อโรคในน้ำปล่อยทิ้งจากระบบสองขั้นตอนได้สูง กระบวนการหมักไร้อากาศแบบสองขั้นตอน ป้องกันการเกิดปัญหาจากการมีภาระบรรทุกสารอินทรีย์ในระบบเกิน (overload) ซึ่งส่งเสริมปฏิบัติการย่อยสลายของแบคทีเรียในกลุ่ม acidogenic bacteria แต่มีผลกระทบต่อ methanogenic archaea จากภาระบรรทุกสารอินทรีย์สูงขึ้น ส่งผลให้ไม่มีความเสถียรในการดำเนินการแบบขั้นตอนเดียวกับน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์สูง โดยเฉพาะกับน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม ข้อดีข้อเสียของกระบวนการหมักไร้อากาศแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอนดังแสดงในตารางที่ 2.4

ปัจจัยแวดล้อม เช่น ความเข้มข้นของสาร อุณหภูมิ พีเอช และโลหะไอออน มีอิทธิพลต่อการผลิตก๊าซมีเทนจากกระบวนการย่อยสลายไร้อากาศ รวมทั้งความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่าย เพื่อให้สามารถเข้าถึงความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละปัจจัย วิธีการออกแบบการทดลองด้วย response surface methodology (RSM) จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาปัจจัยสำคัญ (ความเข้มข้นของสารตั้งต้น สัดส่วน NaHCO_3 ต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นและพีเอชเริ่มต้น) ที่มีผลต่อการผลิตก๊าซมีเทนจากน้ำเสียที่มีความเป็นกรดจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำคั้นอ้อย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นพีเอชเริ่มต้นส่งผลกระทบบต่อผลผลิตก๊าซชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างแต่ละปัจจัย ผลผลิตมีเทนสูงสุดที่ $367 \text{ ml CH}_4/\text{g-volatile solid (VS) added}$ ที่สภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นสารตั้งต้น $13,823 \text{ mg-COD/l}$ สัดส่วนความเข้มข้นของ NaHCO_3 ต่อสารตั้งต้น 3.09 และพีเอชเริ่มต้น 7.07 คิดเป็น 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งเพียงอย่างเดียว (Reungsang et al., 2012)

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของกระบวนการหมักไร้อากาศแบบชั้นตอนเดียวและแบบสองชั้นตอน

ข้อเปรียบเทียบ	กระบวนการหมักไร้อากาศแบบชั้นตอนเดียว	กระบวนการหมักไร้อากาศแบบสองชั้นตอน
พลังงานที่ใช้ในการดูแลระบบ	ใช้พลังงานในการกวนสูงและมีปัญหาเกิดโฟมในระบบ	ใช้พลังงานในการกวนต่ำ ไม่มีปัญหาเกิดโฟมในระบบ
ความเสถียรของกระบวนการ	น้อย	มาก
ผลผลิตมีเทน	ต่ำ	สูง
ผลผลิตไฮเทน	ไม่มี	ได้
การผสมสับสเตรตให้เป็นเนื้อเดียวกัน	ทำได้ยาก	ทำได้ง่าย
ลักษณะของเสียในระบบ	ของเสียเดี่ยว	หมักร่วมกับของเสียหลายชนิดได้
ขนาดถัง	ใหญ่	เล็ก
HRT (ระยะเวลา)	นาน	สั้น

2.4 ไฮเทนและการใช้ประโยชน์

ปัจจุบันเชื้อเพลิงไฮเทน (Hythane) ซึ่งเป็นก๊าซผสมระหว่างไฮโดรเจนและมีเทน ได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นพลังงานสะอาด นอกจากนี้ไฮเทนจะผลิตได้จากกระบวนการ steam reforming ของก๊าซธรรมชาติแล้ว ไฮเทนยังสามารถผลิตได้จากมวลชีวภาพโดยกระบวนการหมักแบบสองชั้นตอน ด้วยการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในถังแรก โดยการแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มผลิตมีเทนออกจากถังปฏิกรณ์โดยการควบคุมพีเอชระหว่าง 4.0-5.5 อัตราการบรทุก (OLR) 5-30 kg COD//d และระยะเวลาพักกักเก็บน้ำ (HRT) สั้นเพียง 1-3 วัน สามารถผลิตไฮโดรเจนแบบอัตราสูงได้ในชั้นตอนที่สองกรดอินทรีย์ซึ่งเป็น by product จากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นมีเทน ในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศสองชั้นตอนจะได้ก๊าซผสมระหว่างมีเทนร้อยละ 50-60 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 35-45 และ ไฮโดรเจนร้อยละ 5-10 ก๊าซผสมนี้เรียกว่าไฮเทน (Cavinato et al., 2010) ไฮโดรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไฮโดรเจน 1 กิโลกรัม ให้ค่าพลังงานเท่ากับก๊าซธรรมชาติ 2.1 กิโลกรัม หรือเท่ากับก๊าซโซลีน 2.8 กิโลกรัม เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับผลิตกระแสไฟฟ้าและพลังงานเชื้อเพลิงเพื่อการคมนาคมขนส่งหรือเซลล์เชื้อเพลิง (fuel cell) (Yokoi et al., 2002) การผลิตก๊าซไฮโดรเจนให้มีประสิทธิภาพในปัจจุบันมีทั้งวิธีทางเคมีและทางชีวภาพ แต่การผลิตโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ (โดยจุลินทรีย์) จะไม่ก่อให้เกิดมลพิษ เนื่องจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้เป็นผลผลิตทางชีวภาพที่ง่ายต่อการกำจัด นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตยัง

มีความหลากหลาย และมีราคาถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจากกระบวนการทางชีวภาพนั้นแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) Photosynthetic microorganisms เช่น สาหร่าย และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น **Rhodospirillum rubrum** (Miyake et al., 1999) เป็นต้น และ 2) Fermentative hydrogen-producing microorganism ซึ่งส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ประเภท facultative anaerobes เช่น **Enterobacter aerogenes** และ obligate anaerobes เช่น **Clostridium butyricum**, **Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum** เป็นต้น (O-Thong et al., 2008; Prasertsan et al., 2009)

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนโดยใช้จุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสับสเตรต ชนิดของจุลินทรีย์ อุณหภูมิ ระยะเวลาการกักเก็บ ชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ และความเป็นกรดเป็นด่าง เป็นต้น ซึ่งสภาวะเหล่านี้มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมักจึงขึ้นอยู่กับสภาวะของสิ่งแวดล้อมที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดี

O-Thong et al. (2008) และ Prasertsan et al. (2009) รายงานว่าน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีศักยภาพสูงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน ดังนั้นจึงมีการศึกษาผลของการใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME) ต่อการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน

สับสเตรต	เชื้อจุลินทรีย์	เครื่องปฏิกรณ์	ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสับสเตรต	ผลได้ของไฮโดรเจน	ผลได้ของมีเทน
POME + RF (Alrawi et al., 2011)	Anaerobic sludge	SCSTR	4.6 gCOD/L d	-	61.9%
POME (Badiei et al., 2011)	Mixed microflora	ASBR	20 gCOD/L d	340 mL/gCOD	-
POME (Fang et al., 2011)	Cow manure	UASB	5.8 gCOD/L _{reactor} d	-	436 mL/gVS _{added}
POME (Fang et al., 2011)	Cow manure	EGSB	5.8 gCOD/L _{reactor} d	-	438 mL/gVS _{added}
Deoiled POME (Fang et al., 2011)	Cow manure	UASB	2.6 gVS/L _{reactor} d	-	600 mL/gVS _{added}
Deoiled POME (Fang et al., 2011)	Cow manure	EGSB	2.6 gVS/L _{reactor} d	-	555 mL/gVS _{added}

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนโดยใช้จุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสับสเตรต ชนิดของจุลินทรีย์ อุณหภูมิ ระยะเวลาการกักเก็บ ชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ และความเป็นกรดเป็นด่าง เป็นต้น ซึ่งสภาวะเหล่านี้มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมักจึงขึ้นอยู่กับสภาวะของสิ่งแวดล้อมที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดี

ตารางที่ 2.6 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME)

สับสเตรต	เชื้อจุลินทรีย์	เครื่องปฏิกรณ์	อุณหภูมิ (°C)	ผลได้ของไฮโดรเจน	ผลได้ของมีเทน
POME + RF (Alrawi et al., 2011)	Anaerobic sludge	SCSTR	37	-	61.9 %
POME (Badiei et al., 2011)	Mixed microflora	ASBR	37	0.34 L/gCOD	-
POME (Fang et al., 2011)	Cow manure	UASB	55	-	436 mL/gVS _{added}
POME (Fang et al., 2011)	Cow manure	EGSB	55	-	438 mL/gVS _{added}
Deoiled POME (Fang et al., 2011)	Cow manure	UASB	55	-	600 mL/gVS _{added}
Deoiled POME (Fang et al., 2011)	Cow manure	EGSB	55	-	555 mL/gVS _{added}
POME + Sucrose (Ismail et al., 2010)	Mixed microflora	CSTR	55	52%	-

O-Thong et al. (2008) และ Prasertsan et al. (2009) รายงานว่าน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีศักยภาพสูงในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน ดังนั้นจึงมีการศึกษาผลของการใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทน ดังแสดงในตารางที่ 2.5 อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ มีรายงานว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการหมักจะทำให้อัตราการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้น แต่ถ้าหากเพิ่มอุณหภูมิในการหมักที่มากเกินไปจะส่งผลทำให้การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนลดลง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักด้วย โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนแบ่งออกได้ 3 ประเภท คือ อุณหภูมิต่ำ (Ambient) อุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic) และอุณหภูมิสูง (Thermophilic) การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME) ดังแสดงในตารางที่ 2.6

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อผลิตไฮโดรเจนและมีเทน

กล้าเชื้อสำหรับการผลิตไฮโดรเจนได้มาจากตะกอนสลัดจ์จากระบบผลิตก๊าซชีวภาพจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากนั้นนำตะกอนสลัดจ์มาเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ผลิตไฮโดรเจนตามวิธีการของ Mamimin et al. (2012) นำตะกอนสลัดจ์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME) ในอัตราส่วนร้อยละ 50-100 เปลี่ยนอาหารทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตไฮโดรเจน สำหรับกล้าเชื้อไร้อากาศที่ใช้ในกระบวนการผลิตมีเทน นำมาจากระบบผลิตก๊าซชีวภาพของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เพื่อลดบทบาทของสารอินทรีย์ในกล้าเชื้อตะกอนสลัดจ์ที่ได้มาตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน จนกระทั่งหยุดการผลิตก๊าซชีวภาพ

3.2 ศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการหมักแบบไร้แสงที่อุณหภูมิสูง

3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อผลิตไฮโดรเจนและการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตรัง น้ำมันปาล์ม ในจังหวัดตรัง วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำทิ้ง ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งสารอินทรีย์ระเหยได้ (VS) ไขมัน ค่าความเป็นด่าง พี เอช ซี โอ ดี (Chemical oxygen demand: COD) บี โอ ดี (Biochemical oxygen demand) คาร์โบไฮเดรต ฟอสฟอรัส ของแข็งแขวนลอย (SS) และแก้ว (APHA et al., 1998)

3.2.2 การทดสอบแนวโน้มในการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เนื่องจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมี pH ต่ำซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน ในการทดลองทำการปรับ pH น้ำทิ้งด้วย 6M NaHCO₃ หรือ 4M acetic acid ให้มี pH เท่ากับ 5.5 หลังจากนั้นทำการทดลองในขวดน้ำเกลือนขนาด 500 mL โดยใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มร้อยละ 80 ของปริมาตรทดลอง ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารอินทรีย์เริ่มต้นที่ 20 40 และ 60 gCOD/l และกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 20 ของปริมาตรทดลอง ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 7 วัน วัดปริมาตรการผลิตไฮโดรเจนโดยการแทนที่น้ำทุก 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์องค์ประกอบของไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีทุกวัน

3.3 ศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังการผลิตไฮโดรเจนโดยกลุ่มจุลินทรีย์แบบไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง

3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในงานวิจัยนี้ นำมาจากระบบการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายใต้อุณหภูมิสูง วิเคราะห์องค์ประกอบน้ำทิ้ง ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งสารอินทรีย์ระเหยได้ (VS) ไขมัน ค่าความเป็นด่าง และพีเอช (APHA et al., 1998) สำหรับการวิเคราะห์กรดไขมันระเหย (กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก) และแอลกอฮอล์ ได้ทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง gas chromatography (HP6850, Hewlett Packard)

3.3.2 การทดสอบแนวโน้มในการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังการผลิตไฮโดรเจน

การทดสอบแนวโน้มในการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน น้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น VFAs เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดโพรพิโอนิก ซึ่งเป็นซับสเตรตที่สำคัญสำหรับการผลิตมีเทน ถูกนำมาใช้ในการทดลองนี้ ทำการทดลองในขวดน้ำเกลือขนาด 500 ml เชื้อเริ่มต้น (non-defined mix culture) ร้อยละ 80 ของปริมาตรทดลอง แปรผันปริมาณน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน 7.2, 14.4, 21.6 และ 28.8 gVS/l (คิดเป็นความเข้มข้น VFA 0.18, 0.36, 0.72 และ 0.94 g/l) ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 1 M NaOH ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 45 วัน (Angelidaki et al., 2009) เปรียบผลผลิตก๊าซที่เกิดขึ้นเทียบกับชุดการทดลองเติมน้ำกลั่นแทนน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ชุดควบคุมบวก (positive controls) เติมเซลล์ูโลส 20 g/l เติมกรดอะซิติก และกรดบิวทีริก 5 g/l วัดปริมาตรการผลิตก๊าซชีวภาพโดยการแทนที่น้ำทุกวัน และวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ทุกสองวัน

3.4 ผลของกรดไขมันระเหยได้ (VFA) ต่อการผลิตมีเทนและโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูง

กระบวนการหมักแบบกะ ดำเนินการทดลองในขวดซีรัมขนาด 500 mL นำน้ำหมักที่เหลือจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาตรร้อยละ 20 ของปริมาตรการทดลอง มาเติมกรดแลคติก (X1) กรดอะซิติก (X2) กรดบิวทีริก (X3) และกรดโพรพิโอนิก (X4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตาราง จากนั้นเติมหัวเชื้อไร้อากาศร้อยละ 80 ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 1 M NaOH ทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนผสมกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตราส่วน 80/20 โดยการประยุกต์ใช้วิธีทางสถิติ Response Surface Method (RSM) ร่วมกับ Central Composite Design (CCD) ในการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของ VFA ต่อการผลิตมีเทน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 45 วันระหว่างการทดลองจะทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน และทำการวิเคราะห์พารามิเตอร์ระหว่างการทดลอง คือ ปริมาณและชนิดกรดไขมันระเหยง่าย ด้วยเครื่อง HPLC วัดปริมาตรก๊าซ

วิเคราะห์ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของก๊าซที่เกิดขึ้น เช่น มีเทน ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และไนโตรเจน ที่เกิดขึ้น (โดยใช้ GC-TCD) และวิเคราะห์ค่า COD ของน้ำหมัก จนกระทั่งได้ปริมาณมีเทนสะสมคงที่จึงหยุดการทดลอง จากขั้นตอนนี้จะได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตมีเทนโดยจุลินทรีย์แต่ละชนิด ศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคีย ด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

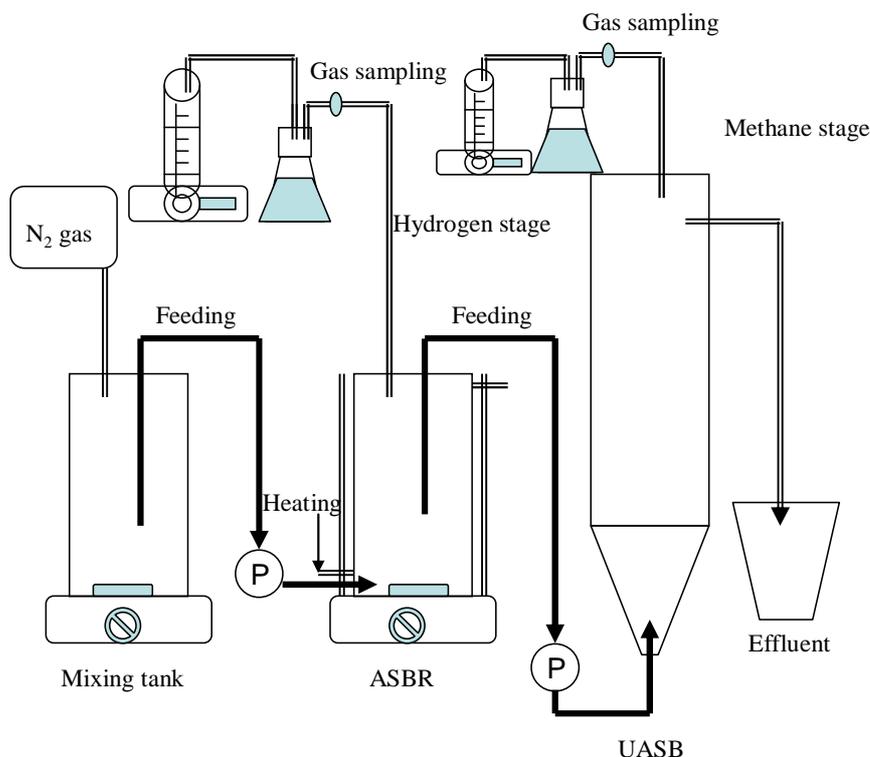
ตารางที่ 3.1 การออกแบบการทดลองแบบ central composite experimental

Run	Parameter (g/L)				Response		
	Lactic acid (X ₁)	Acetic acid (X ₂)	Butyric acid (X ₃)	Propionic acid (X ₄)	Methane (mL CH ₄)	Methane yield (mL CH ₄ /gVS)	Biodegradability (%)
1	1.5	5.5	4.25	1.5			
2	3	8	3	0			
3	1.5	5.5	5.5	1.5			
4	1.5	5.5	5.5	1.5			
5	1.5	5.5	6.75	1.5			
6	1.5	4.25	5.5	1.5			
7	1.5	5.5	5.5	2.25			
8	0	8	3	3			
9	3	8	8	0			
10	0	3	8	0			
11	3	3	3	3			
12	3	3	8	3			
13	0.75	5.5	5.5	1.5			
14	1.5	5.5	5.5	1.5			
15	1.5	5.5	5.5	1.5			
16	1.5	6.75	5.5	1.5			
17	0	3	3	0			
18	1.5	5.5	5.5	0.75			
19	0	8	8	3			
20	2.25	5.5	5.5	1.5			
21	1.5	5.5	5.5	1.5			
H ₂ effluent	0	0	0	0			

3.5 การผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR) และมีเทน (ในถังปฏิกรณ์แบบ UASB) จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศสองขั้นตอน

ระบบการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูงและการผลิตมีเทนที่อุณหภูมิมิโซฟิลิกสองขั้นตอน กระบวนการผลิตประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ถังผสม ถังปฏิกรณ์แบบ ASBR สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และถังปฏิกรณ์แบบ UASB สำหรับการผลิตมีเทน แสดงดังภาพที่ 3.1 น้ำทิ้งจากถังผสมจะถูกนำเข้าสู่ถังปฏิกรณ์แบบ ASBR ขนาด 1 ลิตร ที่อัตราการไหล 100 ml/d โดย 1 รอบการเติมน้ำเสียเข้าถัง คือ 24 ชั่วโมง ซึ่งประกอบด้วย การเติม 30 นาที การเกิดปฏิกิริยา 22 ชั่วโมง 40 นาที ตกตะกอน 30 นาที และ 20 นาที สำหรับการพักนิ่ง ทำการเดินระบบที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 55°C ที่ระยะเวลาพักเก็บ (HRT) 2 วัน เติมหักเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 50 ของปริมาตรทำงาน ระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) เมื่อปริมาณไฮโดรเจน องค์กรประกอบไฮโดรเจน และความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ (VFA) ในน้ำทิ้งคงที่ (มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 10) เก็บตัวอย่างของเหลวเพื่อวิเคราะห์ค่า pH ทุกวัน และวิเคราะห์หาค่าซีโอดี และกรดไขมันระเหยง่าย ทุกสัปดาห์ และวัดปริมาณก๊าซที่ผลิตขึ้นทุกวันในถังเก็บก๊าซโดยดูปริมาณการแทนที่น้ำและเก็บตัวอย่างก๊าซทุกสัปดาห์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี เมื่อเข้าสู่สภาวะคงที่วิเคราะห์ค่าได้แก่ พีเอช บีโอดี ซีโอดี ของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหยได้ทั้งหมด ของแข็งแขวนลอย กรดไขมันระเหยง่ายและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (APHA et al., 1998) ติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค DGGE

สำหรับการผลิตก๊าซมีเทน ทำการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบ UASB ขนาด 3 ลิตร การเริ่มต้นเดินระบบจะใช้เม็ดตะกอนจุลินทรีย์จากระบบผลิตก๊าซชีวภาพร้อยละ 80 ของปริมาตรการทดลอง จากนั้นเติมน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนร้อยละ 20 ของปริมาตรการทดลอง ทำให้ภายในถังหมักอยู่ในสภาวะไร้อากาศโดยพนัก๊าซไฮโดรเจนเป็นเวลา 10 นาที ทำการแปรผันระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) ที่ 20 วัน เดินระบบในแต่ละ HRT จนกระทั่งระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) เมื่อปริมาณมีเทน องค์กรประกอบมีเทน ในน้ำหมักคงที่ (มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าร้อยละ 5) เป็นเวลา 45 วัน (Kaparaju et al., 2009) ระบบ UASB ทำการเดินระบบที่อุณหภูมิ 35 °C pH 7.5 หลังจากนั้นทำการแปรผันระยะเวลาพักเก็บจาก 10-20 วัน ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัด pH ทุกวัน VFAs วิเคราะห์ทุกสัปดาห์ วัดปริมาตรการผลิตก๊าซชีวภาพโดยการแทนที่น้ำทุกวัน และวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ทุกสองวัน วิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์โดยเทคนิค PCR-DGGE เปรียบเทียบกับชุดการทดลองการหมักมีเทนแบบเดียวที่มีการเดินระบบที่อุณหภูมิ 35 °C pH 7.3-7.5 ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 17 วัน



ภาพที่ 3.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนและมีเทนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศสองขั้นตอน

3.6 การศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

สกัด total genomic DNA จากตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ในชุดการผลิตมีเทน หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR สำหรับการทำให้ PCR ครั้งแรก total genomic DNA ถูกใช้เป็นตัวเอ็นเอต้นแบบร่วมกับไพรเมอร์ Arch21f (5' TTCCGGTTGATCCYGC-CGGA 3') และ Arch958r (5' YCCGGCGTTGAMTCCAATT 3') (สำหรับศึกษาประชากรอาเคียรี) 1492r (5' GAAAGGAGGTGATCCAGCC 3') และ 27f (5' GAGTTTGATCCTTGCTCAG 3') (สำหรับศึกษาประชากรแบคทีเรีย) นำ PCR Product ครั้งแรกใช้ในการทำ PCR ครั้งที่สองสำหรับอาเคียรีใช้ไพรเมอร์ Arch519r (5' TTACCGCGGCKGCTG 3' with 40 bp GC clamp) และ Arch340f (5' CCTACGGGGYGCASCAG 3' with 40 bp GC clamp) สำหรับแบคทีเรียใช้ไพรเมอร์ 518r (5' ATTACCGAGCTGCTGG 3' with 40 bp GC clamp) และ 357f (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3' with 40 bp GC clamp) นำ PCR products ครั้งที่สอง วิเคราะห์บน 8% (v/v) polyacrylamide gels, denaturant gradient ที่ร้อยละ 40-70, electrophoresis ที่ 70

โวลต์ นาน 16 ชั่วโมง ใน 0.5x TAE buffer ที่ 60 องศาเซลเซียส ตัดแถบแบนดีเอ็นเอเด่นจากเจล DGGE แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ จุลินทรีย์อ้างอิง ในฐานะข้อมูล NCBI web interface (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kongjan et al., 2010)

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการหมักแบบไร้แสงที่อุณหภูมิสูง

4.1.1 องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

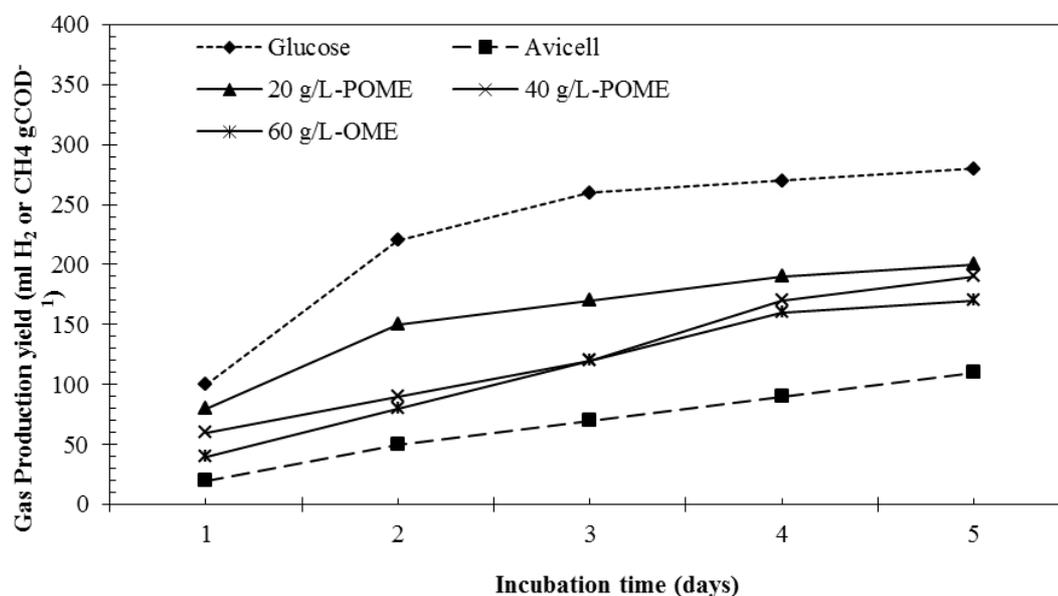
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตรังน้ำมันปาล์ม ในจังหวัดตรัง แสดงดังตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล มีอุณหภูมิสูง (90 °C) มีปริมาณไขมันร้อยละ 10.6 คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 16.2 g/l ของแข็งทั้งหมดร้อยละ 4.2 ของแข็งแขวนลอยร้อยละ 0.8 ของแข็งละลายร้อยละ 3.3 และซีโอดี 85.5 gCOD/l ไนโตรเจนทั้งหมด 830 mg/l ฟอสฟอรัสทั้งหมด 130 mg/l และเหล็ก 3 mg/l และน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังมีค่าพีเอชต่ำ (pH 4.5) จึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ก่อนทำการผลิตก๊าซไฮโดรเจนต้องมีการปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 5.5 โดยใช้ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (O-Thong et al., 2008)

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น (g/l)
บีโอดี (Biochemical oxygen demand)	48.3 ± 0.6
ซีโอดี (Chemical oxygen demand)	85.5 ± 0.3
คาร์โบไฮเดรต	16.2 ± 0.2
ไนโตรเจน	0.83 ± 0.1
แอมโมเนีย-ไนโตรเจน	0.03 ± 0.001
ฟอสฟอรัส	0.13 ± 0.001
ฟอสเฟส	0.021 ± 0.001
ไขมัน	10.6 ± 0.02
ของแข็งทั้งหมด (TS)	62.0 ± 0.3
ของแข็งละลายได้ทั้งหมด (VS)	55.0 ± 0.4
ของแข็งแขวนลอย (SS)	8.5 ± 0.2
ถั่ว	4.2 ± 0.2
Fe	0.003 ± 0.0001

4.1.2 ศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิสูง

ศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ไฮโดรเจนสามารถเริ่มผลิตได้เกือบจะทันที แสดงให้เห็นว่าหัวเชื้อที่ใช้มีประสิทธิภาพจึงมีระยะ lag phase สั้น ความเข้มข้นของไฮโดรเจนในก๊าซชีวภาพอยู่ในช่วงร้อยละ 45-60 โดยไม่มีการตรวจพบก๊าซมีเทนในระบบ ผลได้ไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายใต้อุณหภูมิสูงอยู่ในช่วง 130-200 ml H₂/g COD หลังจากทำการหมักไปได้ 2 วัน ซึ่งผลผลิตไฮโดรเจนมากกว่าร้อยละ 90 ถูกผลิตขึ้นภายใน 2 วัน (ภาพที่ 4.1) เมื่อสิ้นสุดการหมัก กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้น 23,450-3,580 และ 3,250-4,250 mg/l เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน การผลิตกรดไขมันระเหยได้เป็นสาเหตุของการลดลงของพีเอชจาก 5.5 เป็น 4.3 หลังจากทำการหมักไป 5 วัน



ภาพที่ 4.1 ก๊าซไฮโดรเจนสะสมจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้นสารอินทรีย์เริ่มต้นแตกต่างกัน

4.2 ศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังการผลิตไฮโดรเจนโดยกลุ่มจุลินทรีย์แบบไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง

4.2.1 องค์ประกอบของน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีองค์ประกอบของกรดไขมันระเหยได้สูง 9.4 g/l ปริมาณไขมัน 8.1 g/l ปริมาณของแข็งทั้งหมด 68 g/l และมีพีเอชต่ำ (4.3) กรดไขมันระเหยได้ที่พบในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนประกอบด้วย กรดบิวทีริก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก

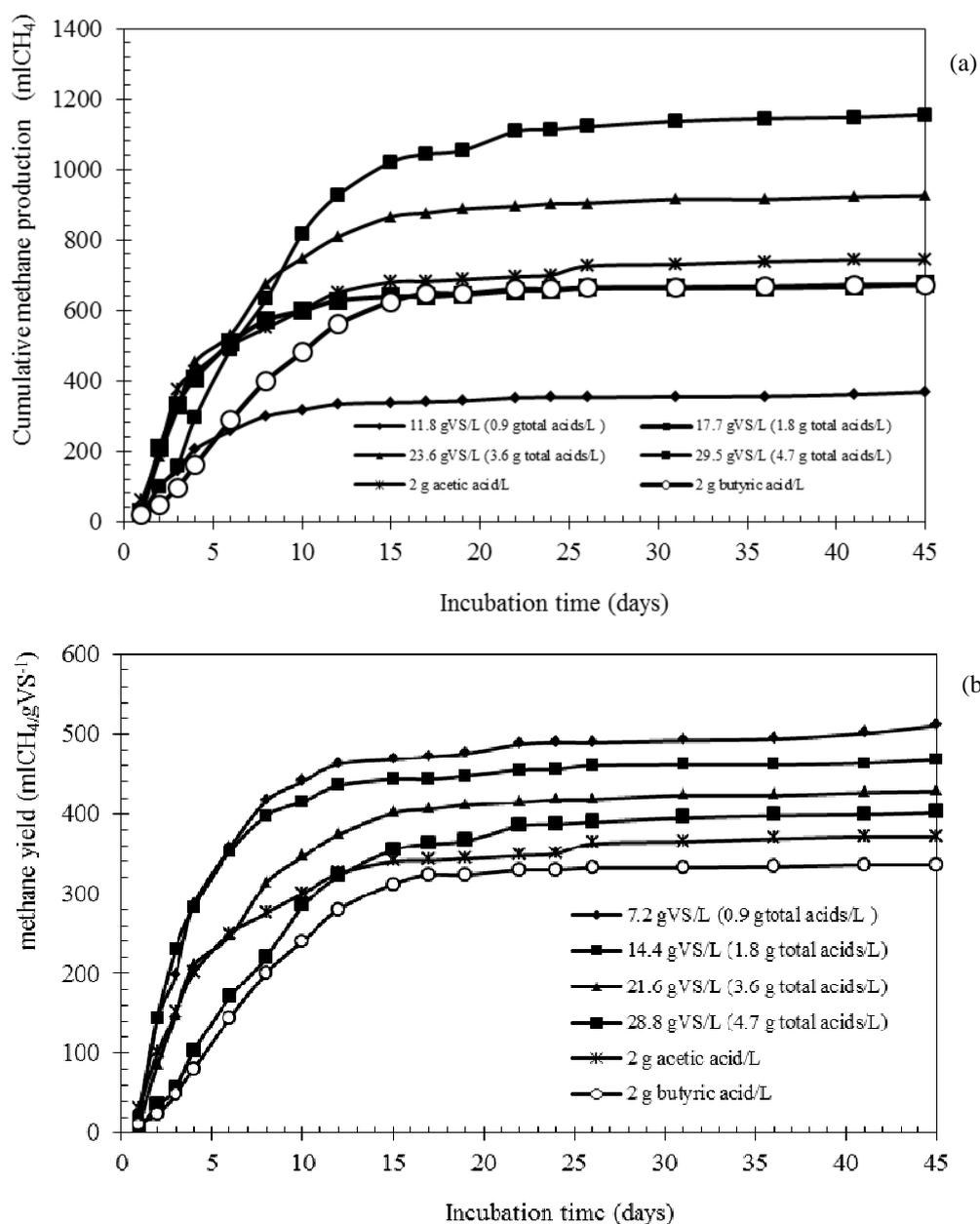
กรดแลคติก และเอทานอลที่ความเข้มข้น 3.95 2.13 0.25 1.5 และ 0.99 g/l, ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 แสดงองค์ประกอบของน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

พารามิเตอร์	ความเข้มข้น (g/l)
ของแข็งทั้งหมด	68
ของแข็งระเหยได้	62
ไนโตรเจน	2.3
ไขมัน	8.1
กรดไขมันระเหยได้	9.4
กรดอะซิติก	2.13
กรดบิวทีริก	3.95
กรดแลคติก	1.5
กรดโพรพิโอนิก	0.25
เอทานอล	0.99
ความเป็นต่าง (g CaCO ₃ /l)	1.3
พีเอช	4.3

4.2.2 ศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูง การศึกษาศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ทำการทดลองที่ปริมาณสารอินทรีย์ 11.8 17.7 23.6 และ 29.5 gVS/l (คิดเป็นกรดไขมันระเหยได้เริ่มต้น 0.9 1.8 3.6 และ 4.7 g/l ตามลำดับ) โดยให้มีเทนสะสม เท่ากับ 367 673 925 และ 1155 ml CH₄ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2a) คิดเป็นผลได้มีเทน เท่ากับ 510 467 428 และ 401 ml CH₄/g VS ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2b) มีเทนสะสมจากกรดอะซิติกและกรดบิวทีริก คือ 742 และ 671 ml CH₄ (คิดเป็นผลได้มีเทน 371 และ 335 ml CH₄/g VS) แสดงให้เห็นถึงคุณภาพที่ดีของหัวเชื้อในการผลิตมีเทน ที่ปริมาณสารอินทรีย์ 11.8 และ 17.7 gVS/l ผลผลิตมีเทนมากกว่าร้อยละ 90 เกิดขึ้นภายใน 6 วัน และให้ผลได้มีเทนสูงกว่าผลได้มีเทนที่ปริมาณสารอินทรีย์ 23.6 และ 29.5 gVS/l กรดไขมันระเหยได้และกรดแลคติกแม้ว่าจะเป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับการผลิตมีเทนแต่กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้นสูงจะส่งผลยับยั้งกระบวนการ methanogenesis (Wagner et al., 2011) น้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนสามารถย่อยสลายได้ง่ายและเกิดมีเทนได้เร็ว แต่ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ความเข้มข้นกรดไขมันระเหยได้สูง (23.6 และ 29.5 gVS/l) เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพไม่ดีเนื่องจากปริมาณกรดไขมันระเหยได้ที่สูงส่งผลให้พีเอชในระบบต่ำ

สารอินทรีย์ทั้งหมดในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจะถูกย่อยสลายและเปลี่ยนไปเป็นมีเทนได้ร้อยละ 76–89 ของผลได้มีเทนทางทฤษฎี ในขณะที่ปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ (11.8 gVS/l) อยู่ที่ร้อยละ 97 ของผลได้มีเทนทางทฤษฎี



ภาพที่ 4.2 มีเทนสะสม (a) และผลได้มีเทน (b) จากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ที่ความเข้มข้นสารอินทรีย์แตกต่างกัน

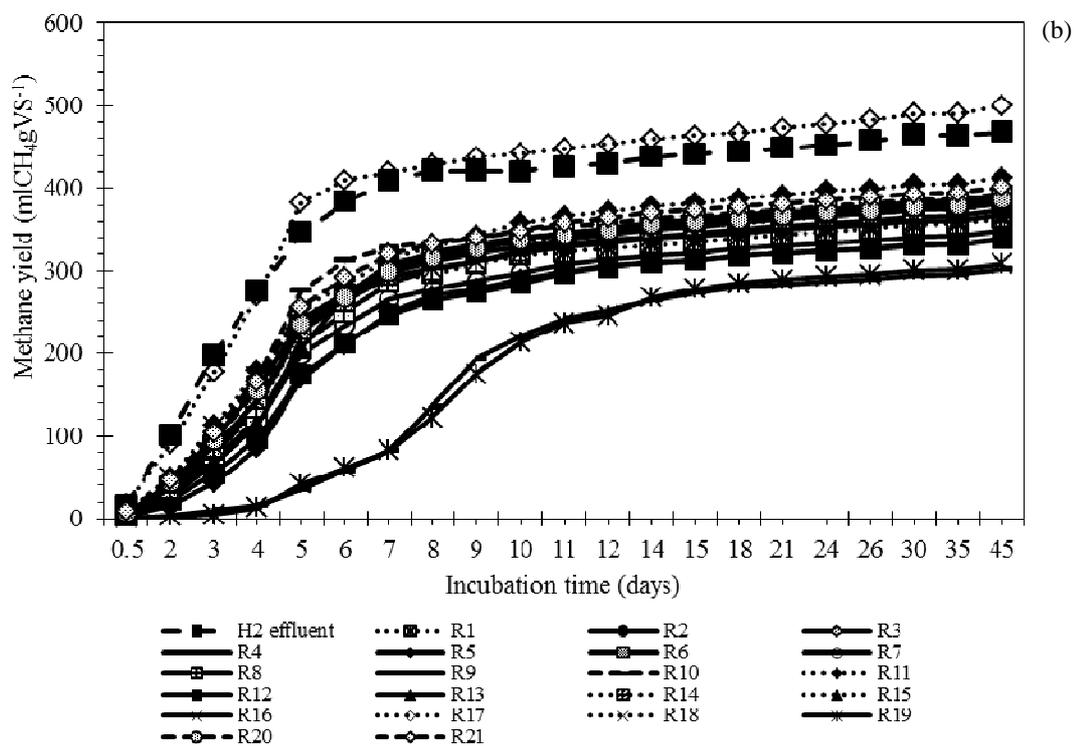
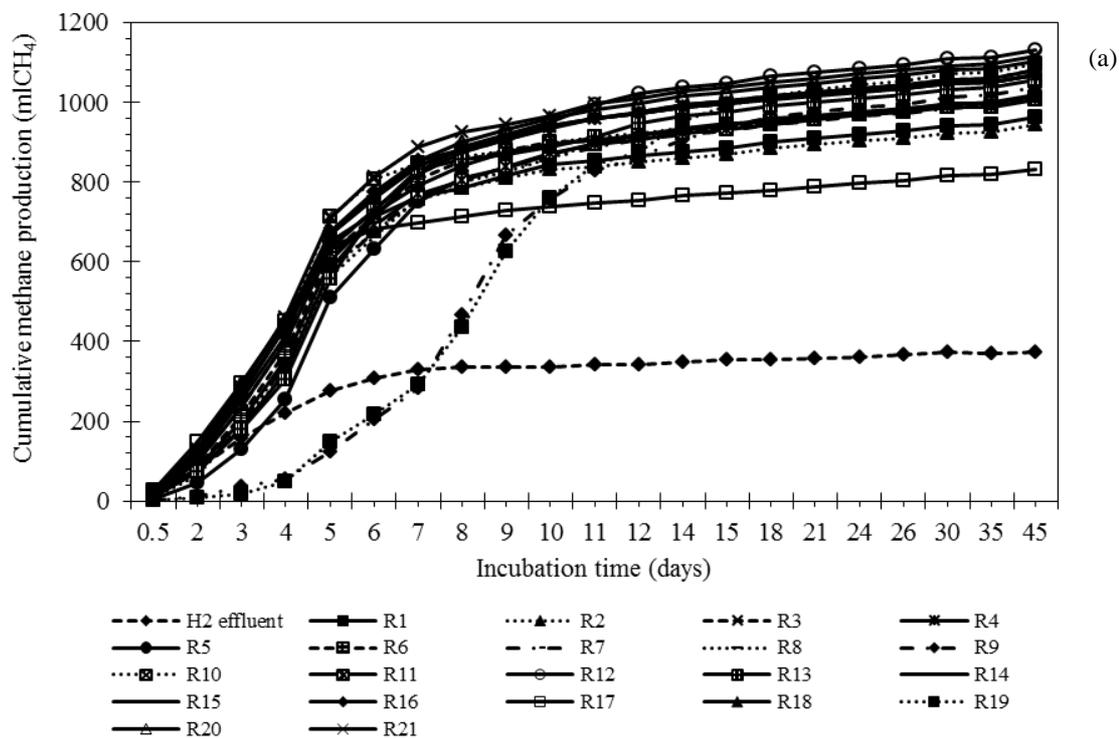
ตารางที่ 4.3 แสดงศักยภาพชีวเคมีของมีเทน ผลได้มีเทน และการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำทิ้ง หลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

วัตถุดิบ	สารอินทรีย์ เริ่มต้น (gVS/l)	ผลได้มีเทนจาก การทดลอง (mlCH ₄ gVS ⁻¹)	ผลได้มีเทน ทางทฤษฎี (mlCH ₄ /g VS)	Biodegradability (%)
ชุดควบคุม (กรดอะซิติก)	2	371	373	99
ชุดควบคุม (กรดบิวทีริก)	2	335	530	63
	11.8	510	522	97
น้ำทิ้งหลังการ ผลิตไฮโดรเจน	17.7	467	522	89
	23.6	428	522	82
	29.5	401	522	76

4.3 ผลของกรดไขมันระเหยได้ (VFA) ต่อการผลิตมีเทนและโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูง

4.3.1 ผลของกรดไขมันระเหยได้ (VFA) ต่อการผลิตมีเทน

กรดไขมันระเหยได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตมีเทน ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตมีเทน อย่างไรก็ตามการศึกษาผลกระทบของกรดไขมันระเหยได้ต่อผลได้มีเทนและการเจริญของจุลินทรีย์เมทาโนเจนยังไม่มีการศึกษาที่แพร่หลายเพื่อศึกษาผลกระทบดังกล่าว กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก ถูกเติมในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนซึ่งถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ประสิทธิภาพการย่อยสลายกรดแลคติกและกรดไขมันระเหยได้ในทุกชุดการทดลองสูงกว่าร้อยละ 80 ยกเว้นในชุดการทดลอง R5 R7 R9 R12 และ R19 ซึ่งมีประสิทธิภาพการย่อยสลายอยู่ที่ร้อยละ 75 78 65 78 และ 68 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3) อย่างไรก็ตามมีการสะสมของกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิกสูงในชุดการทดลอง R9 และ R19 (ภาพที่ 4.4) ความเข้มข้นกรดอะซิติก และกรดบิวทีริกที่สูงถึง 8 g/l ส่งผลต่อการผลิตมีเทน (ภาพที่ 4.3) ความเข้มข้นกรดบิวทีริกสูงถึง 8 g/l และผสมกับกรดชนิดอื่นส่งผลยังยั้งการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้จำนวนและความหลากหลายของแบคทีเรียและอาร์เคียลดลง ผลกระทบดังกล่าวส่งผลให้เกิดการสะสมของกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิก และส่งผลให้ผลได้มีเทน (302-308 ml CH₄ g/Vs) และประสิทธิภาพการย่อยสลายต่ำ (ร้อยละ 65-68)



ภาพที่ 4.3 มีเทนสะสม (a) และผลได้มีเทน (b) จากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่มีการเติมกรดไขมันระเหยได้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.4 การออกแบบการทดลองแบบ central composite experimental ที่มีตัวแปรอิสระ 4 ชนิด และผลผลิตมีเทน จากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

Run	พารามิเตอร์ (g/l)				Response		
	Lactic acid (A)	Acetic acid (B)	Butyric acid (C)	Propionic acid (D)	Methane (mlCH ₄)	Methane yield (mlCH ₄ /gVS)	Biodegradability (%)
1	1.5	5.5	4.25	1.5	963	364	85
2	3	8	3	0	943	374	83
3	1.5	5.5	5.5	1.5	1080	389	93
4	1.5	5.5	5.5	1.5	1069	385	91
5	1.5	5.5	6.75	1.5	1019	339	75
6	1.5	4.25	5.5	1.5	1008	381	88
7	1.5	5.5	5.5	2.25	1008	349	78
8	0	8	3	3	1016	383	89
9	3	8	8	0	1038	302	65
10	0	3	8	0	1014	394	92
11	3	3	3	3	1008	413	99
12	3	3	8	3	1133	338	78
13	0.75	5.5	5.5	1.5	1056	392	93
14	1.5	5.5	5.5	1.5	1080	389	93
15	1.5	5.5	5.5	1.5	1069	385	91
16	1.5	6.75	5.5	1.5	1070	368	85
17	0	3	3	0	744	446	100
18	1.5	5.5	5.5	0.75	1016	381	88
19	0	8	8	3	1098	308	68
20	2.25	5.5	5.5	1.5	1104	387	92
21	1.5	5.5	5.5	1.5	1116	402	98
H ₂ effluent	0	0	0	0	380	475	98

ก่อนการย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อเปลี่ยนไปเป็นมีเทน กรดไขมันระเหยได้ทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก สำหรับอัตราการย่อยสลายของกรดไขมันระเหยได้ไปเป็นมีเทน เริ่มจาก กรดอะซิติก > เอทานอล > กรดบิวทีริก > กรดโพรพิโอนิก (Ren et al., 2006) ส่งผลให้เกิดการ

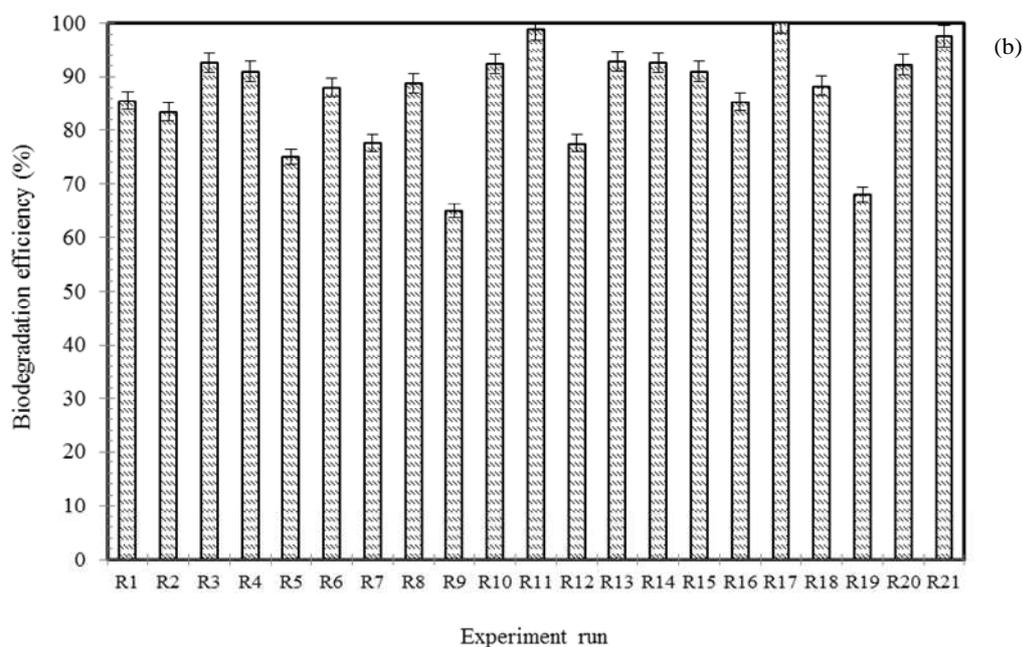
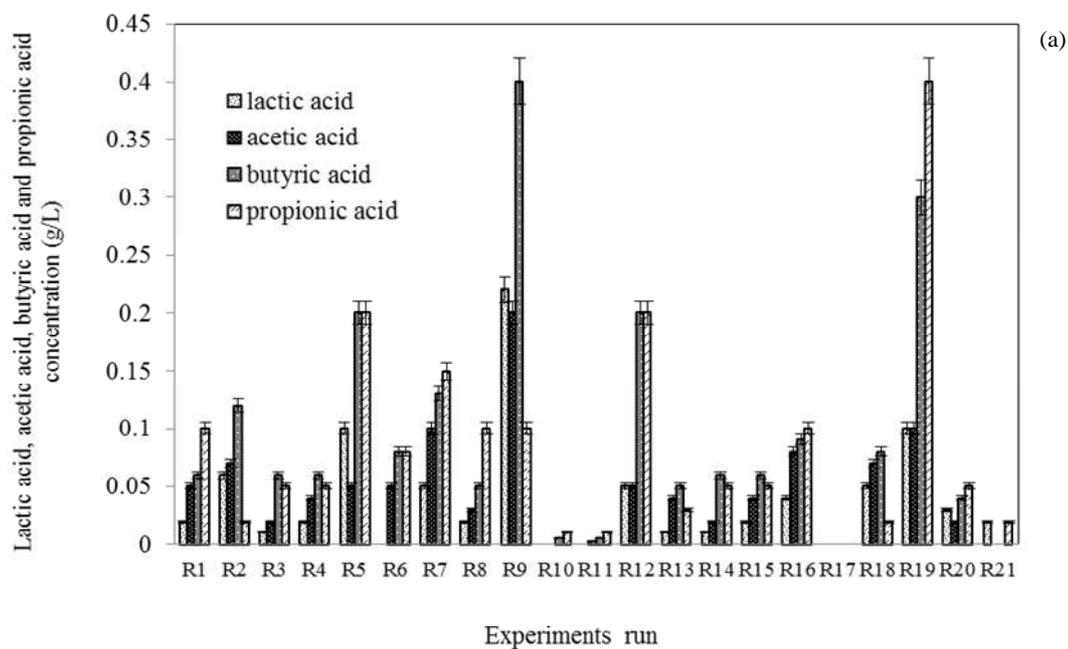
สะสมกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิกในกระบวนการ สอดคล้องกับกับผลการศึกษานี้ที่พบว่า เมื่อมีการสะสมของกรดโพรพิโอนิกทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเมทาโนเจนอาศัยร์นำไปสู่การชะงักของการหมัก Barredo and Evison (1991) พบว่าปริมาณก๊าซมีเทนอาจลดลงตามปัจจัยสองปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิก

ตารางที่ 4.5 ค่าทางสถิติของผลของกรดไขมันระเหยได้ต่อการผลิตมีเทน

Factor	Methane accumulation		Methane yield		Biodegradation efficiency	
	Coefficient estimate	Probability	Coefficient estimate	Probability	Coefficient estimate	Probability
Intercept	1053.5	-	378.4182	-	88.75592	-
A-Lactic acid	48	0.4138	-5	0.8238	-1	0.9072
B-Acetic acid	62	0.3001	-13	0.5674	-3	0.7279
C-Butyric acid	70.58824	0.0018*	-33.7059	0.0006*	-8.58824	0.0051*
D-Propionic acid	-8	0.8885	-32	0.1871	-10	0.2699
A ²	-72.5	0.2457	-22.75	0.3441	-9.25	0.3173
B ²	-16.5	0.2728	-2.5	0.6581	-1.25	0.5657
C ²	37.5	0.5305	15	0.5236	5	0.5770
D ²	-27.25	0.0933	-2.5	0.6581	-1.25	0.5657
AB	16.75	0.7763	8	0.7304	2	0.8214
AC	-19.75	0.1986	-3.25	0.5674	-2	0.3685
AD	184.1323	0.0201*	75.21232	0.0100*	26.82723	0.0910*
BC	20.13225	0.8389	15.21232	0.6973	2.827229	0.8495
BD	-171.868	0.0980*	-76.7877	0.0850*	-23.1728	0.0155*
CD	-87.8677	0.0898*	-22.7877	0.0633*	-11.1728	0.0463*

กรดอะซิติกเดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้น 3-8 g/l ไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมทาโนจีนิซิส อย่างไรก็ตามเมื่อมีการผสมกันของกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิกเกิดการยับยั้งการผลิตมีเทนและประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) กรดบิวทีริกเดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้น 3-8 g/l เกิดการยับยั้งกระบวนการเมทาโนจีนิซิส กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดบิวทีริกเดี่ยวๆ ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมทาโนจีนิซิส ในขณะที่กรดโพรพิโอนิกเดี่ยวๆ ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมทาโนจีนิซิส เมื่อเกิดการผสมกันของกรดแลคติกและกรดอะซิติก กรดอะซิติกและกรดบิวทีริก กรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมทาโนจีนิซิสอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4.5) โดยสภาวะเหมาะสมที่กรด

แลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้น 2.88 5.01 0.44 และ 5.55 g/l ตามลำดับ ให้มีเทนสะสมสูงสุดที่ 1,194 ml และผลได้มีเทน 447 ml CH₄/gVS



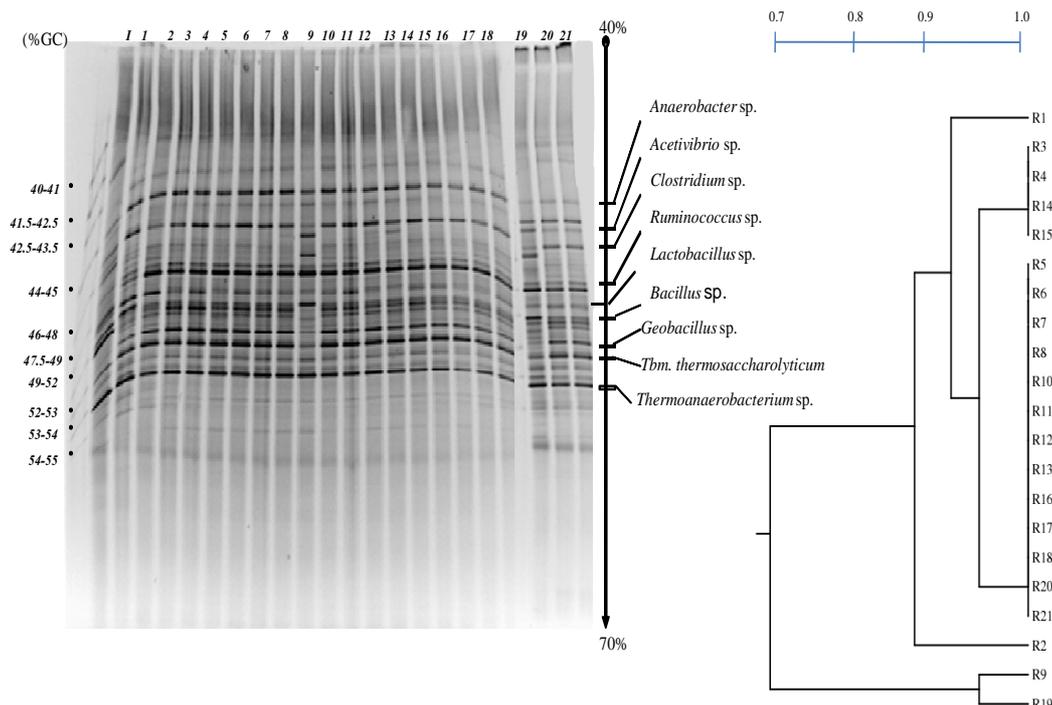
ภาพที่ 4.4 ความเข้มข้นของกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ในน้ำหมักหลังการผลิตไฮโดรเจน (a) และประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพ (b) จากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่มีการเติมกรดไขมันระเหยได้

การผสมกันของกรดแลคติกและกรดบิวทีริก กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมทาโนจีนิซิสอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญกว่ากรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก Demirel and Yenigun (2002) ยังพบว่ากรดโพรพิโอนิกจะยับยั้งกระบวนการเมทาโนจีนิซิสเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 951 mg/l การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อกรดอะซิติกผสมกับกรดโพรพิโอนิกจะไปยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการเมทาโนจีนิซิส ส่งผลให้อัตราการย่อยสลายกรดไขมันระเหยได้ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสมของกรดไขมันระเหยได้ แสดงให้เห็นว่ากรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิกเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญที่ส่งผลต่อการย่อยสลายของกรดไขมันระเหยได้ ในกรดไขมันระเหยได้ทั้งหมด เมทาโนเจนทนต่อการยับยั้งของกรดโพรพิโอนิกได้ต่ำที่สุด และเกิดการยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 5,000 mg/l คิดเป็น 5 เท่าของความเข้มข้นของกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่จะเกิดการยับยั้ง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญของกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกเท่ากับ 2,400 และ 1,800 mg/l ตามลำดับ

4.3.1 ผลของกรดไขมันระเหยได้ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์

จากภาพที่ 4.5 ความหลากหลายและปริมาณ methanogenic bacteria มีความคล้ายคลึงกันในทุกชุดการทดลองยกเว้นในชุดการทดลอง R1, R3, R4, R14, R15, R2, R9 และ R19 โดยในชุดการทดลอง R1, R3, R4, R14, R15 และ R2 มีโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์แตกต่างกับชุดการทดลองทั้งหมดเพียงเล็กน้อย แต่มีเทนสะสมและประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพไม่แตกต่างกับชุดการทดลองทั้งหมด เนื่องจาก methanogenic bacteria มีการเปลี่ยนแปลงแต่สามารถปรับตัวได้เร็วในระหว่างการทดลอง ในขณะที่ชุดการทดลอง R9 และ R19 methanogenic bacteria ไม่สามารถปรับตัวได้เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้สูงจึงไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่งผลให้ได้มีเทนสะสมต่ำ DGGE ถูกใช้เป็นเครื่องมือติดตามการเปลี่ยนแปลงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ ซึ่งสัมพันธ์กับผลผลิตมีเทน และคุณภาพของ methanogenic archaea มีความสัมพันธ์กับผลได้มีเทน ปริมาณกรดอะซิติกและกรดแลคติกที่สูงส่งผลให้เกิดการสร้างมีเทนสูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของกรดอื่นๆ (กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก) ที่สูง จะไปยับยั้งกระบวนการสร้างมีเทน DGGE โปรไฟล์แสดง thermophilic bacteria คือ **Anaerobacter sp.** **Acetivibrio sp.** **Clostridium sp.** **Ruminococcus sp.** **Lactobacillus sp.** **Bacillus sp.** **Geobacillus sp.** **Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum** **Thermoanaerobacterium sp.** และ **Clostridium sp** โดยแบคทีเรียสปีชีส์ **Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum** และ **Thermoanaerobacterium sp.** เป็นประชากรกลุ่มเด่นในสภาวะปกติและไม่ปรากฏในสภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทน (ภาพที่ 4.5) ลักษณะแถบแบน DGGE แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในหัวเชื้อมีเทนมีความคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์กลุ่มเด่นในตะกอน

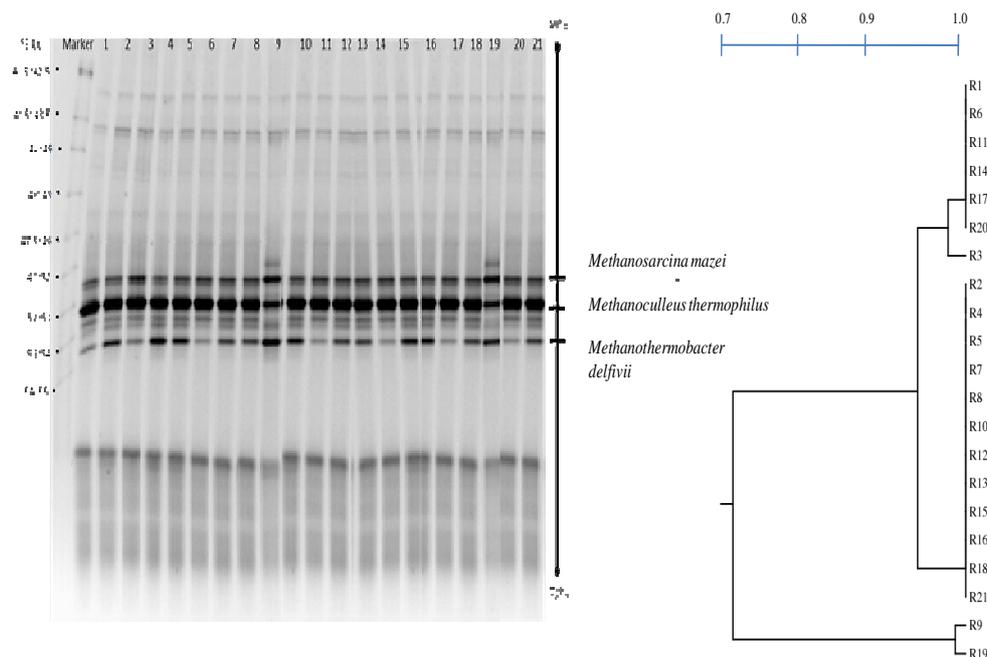
จุลินทรีย์จากชุดการทดลองผลิตมีเทน มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่โดดเด่นตลอดกระบวนการหมัก และไม่ได้รับผลกระทบจากการเติมกรดไขมันระเหยได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ จุลินทรีย์สายพันธุ์ **Thermoanaerobacterium** ได้รับการรายงานว่าเป็นจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญที่ 60 °C และสามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นไฮโดรเจนโดยให้กรดบิวทีริกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในน้ำหมัก (O-Thong et al., 2008)



ภาพที่ 4.5 DGGE โปรไฟล์ ซีนียีน 16S rRNA ของแบคทีเรียจากระบบผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่มีการเติมกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และดัชนีความคล้ายคลึงกัน (SI) ที่สอดคล้องกับ dendrogram (UPGMA clustering)

การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรอาศัยแสดงจุลินทรีย์กลุ่มเด่นสามชนิดใน DGGE โปรไฟล์ (ภาพที่ 4.6) Methanogenic archaea มีความคล้ายคลึงกันทั้งด้านจำนวนและความหลากหลายของในทุกชุดการทดลองยกเว้นในชุดการทดลอง R1 R6 R9 R11 R17 R19 และ R20 โดยในชุดการทดลอง R1, R6, R9, R11, และ R17 มีโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์แตกต่างกันเล็กน้อยกับชุดการทดลองทั้งหมด แต่มีเทนสะสมและประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพไม่แตกต่างกับชุดการทดลองทั้งหมด ในขณะที่ประชากรเด่นมีปริมาณต่ำในชุดการทดลอง R9 และ R19 สอดคล้องกับการผลิตมีเทนต่ำเช่นเดียวกันเนื่องจากประสิทธิภาพการย่อยสลายกรดไขมัน

ระเหยได้ต่ำ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นกรดไขมันระเหยได้สูงส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ ปริมาณกรดอะซิติกและกรดแลคติกที่สูงส่งผลให้เกิดการสร้างมีเทนสูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิกที่สูง จะไปยับยั้งกระบวนการสร้างมีเทน คุณภาพของ methanogenic bacteria และ methanogenic archaea สัมพันธ์กับผลได้มีเทน ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ผลได้มีเทนสะสมต่ำในชุดการทดลอง R9 และ R19 โดยกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ส่งผลยับยั้งการเจริญของ methanogenic archaea อย่างมีนัยสำคัญ **Methanoculleus thermophilus** **Methanothermobacter delphvii** และ **Methanosarcina mazei** เป็นประชากรอาศัยเด่นในการผลิตมีเทน ซึ่ง Methanoculleus thermophiles เป็นประชากรกลุ่มเด่นในสภาวะปกติและไม่ปรากฏในสภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทน สายพันธุ์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายที่อุณหภูมิสูงและผลผลิตมีเทนที่เพิ่มขึ้นแตกต่างกัน โดย **Methanothermobacter** และ **Methanoculleus** เป็น hydrogenotrophic methanogens อาจเป็นตัวแทนของประชากรกลุ่ม acetogenic

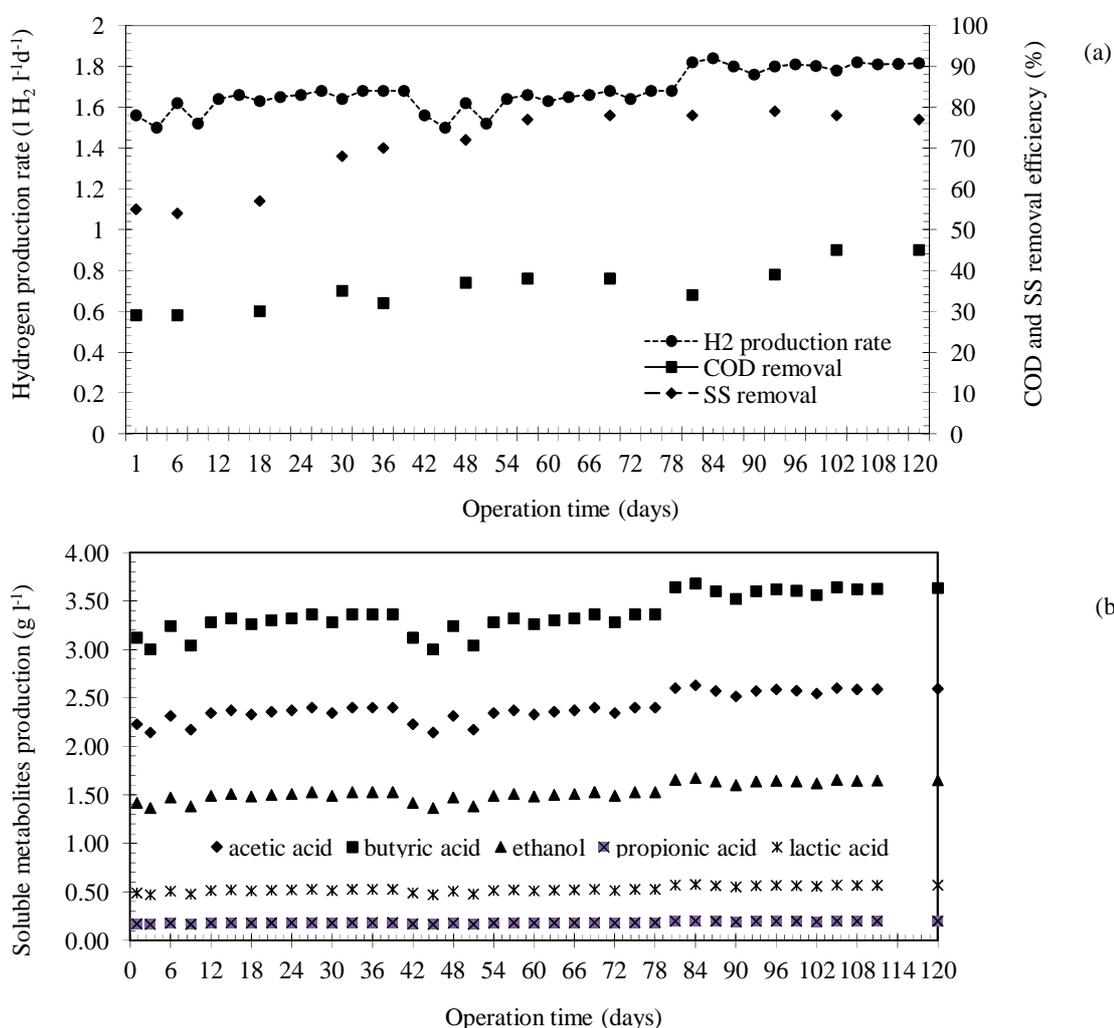


ภาพที่ 4.6 DGGE โปรไฟล์ ซีนียีน 16S rDNA ของอาศัยร์จากระบบผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่มีการเติมกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และดัชนีความคล้ายคลึงกัน (SI) ที่สอดคล้องกับ dendrogram (UPGMA clustering)

4.4 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR และมีเทนในถังปฏิกรณ์แบบ UASB จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศสองขั้นตอน

4.4.1 การผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR

ภาวะบรรทุสารอินทรีย์ (OLR) ที่ 60 gCOD/l และระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) 2 วัน เป็นสภาวะที่ถูกเลือกมาเดินระบบการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยจุลินทรีย์ไร้อากาศที่อุณหภูมิสูงภายในถังปฏิกรณ์ ASBR ตามการศึกษาการก่อนหน้า (Prasertsan et al., 2009)



ภาพที่ 4.7 อัตราการผลิตไฮโดรเจน ประสิทธิภาพการกำจัด COD และประสิทธิภาพการกำจัด SS (a) และผลิตภัณฑ์ที่พบในน้ำทิ้งหลังกระบวนการหมัก (b) จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR ที่ HRT 2 วัน ภายใต้อุณหภูมิสูง

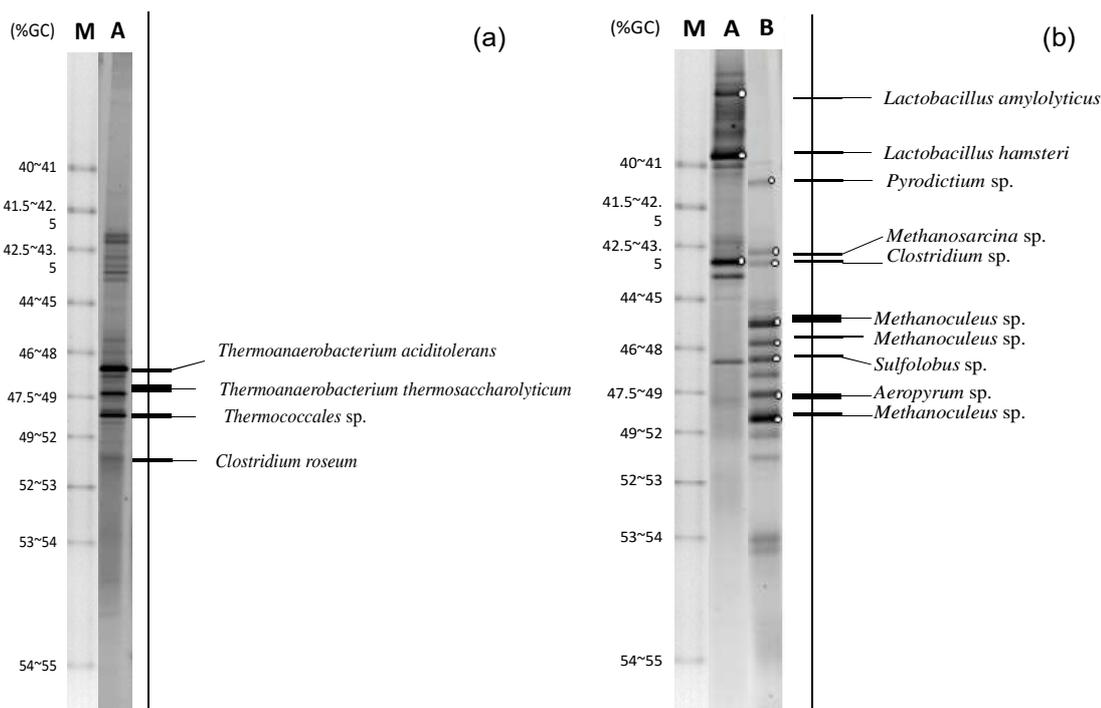
ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพของกระบวนการและลักษณะน้ำทิ้งจากระบบการผลิตไฮโดรเจนและมีเทนสองขั้นตอน และระบบการผลิตมีเทนขั้นตอนเดียว

	Two stage process operation		Single stage
	Hydrogen reactor	Methane reactor	Methane reactor
Culture condition			
HRT (d)	2	15	17
LOR (gCOD l ⁻¹ d ⁻¹)	60	6	6
pH	5.5	7.3-7.5	7.3-7.5
Gas production (L biogas l ⁻¹ d ⁻¹)	1.84	2.4	1.72
Gas Yield (ml H ₂ or CH ₄ gCOD ⁻¹)	210	315 ^a	227 ^a
Removal efficiency			
Total COD (%)	38	95	84
SS (%)	75	96 ^a	73 ^a
Carbohydrate consumption (%)	92	99	95
Effluent			
pH	4.3	8.2	7.9
Ethanol (mg l ⁻¹)	200	10	40
Propanol (mg l ⁻¹)	408	5	50
Acetic acid (mg l ⁻¹)	4,866	20	150
Propionic acid (mg l ⁻¹)	150	0	50
Butyric acid (mg l ⁻¹)	7,855	50	340
Valeric acid (mg l ⁻¹)	146	0	30

^a มีนัยสำคัญ (P<0.05)

อัตราการผลิตไฮโดรเจนจากถังปฏิกรณ์ ASBR แสดงดังภาพที่ 4.7a อัตราผลผลิตไฮโดรเจนสูงสุด คือ 1.84 l-H₂/l/d ในวันที่ 90-120 ของการเดินระบบ คิดเป็นอัตราการผลิตเฉลี่ยของการทดลองทั้งหมดเท่ากับ 1.8 l-H₂/l/d ความเข้มข้นก๊าซไฮโดรเจนในก๊าซชีวภาพที่ได้ คือ ร้อยละ 40-60 เฉลี่ยทั้งการทดลอง คือ ร้อยละ 55 และไม่พบก๊าซไฮโดรเจนในองค์ประกอบของก๊าซชีวภาพที่ได้ นั้นแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดกิจกรรมของเมทาโนจีนีซิสในถังปฏิกรณ์ผลิตไฮโดรเจนผลได้ไฮโดรเจนสูงสุดเฉลี่ยจากการคำนวณเท่ากับ 210 ml H₂/gCOD โดยมีกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมัก (ภาพที่ 4.7b) ผลผลิตไฮโดรเจนต่อลิตรน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม คือ 9.0 l-H₂/l-POME ซึ่งให้ผลได้ไฮโดรเจนสูงกว่าผลได้ไฮโดรเจน (4.7 l-H₂/l-POME)

จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายใต้อุณหภูมิสูงในการผลิตแบบกะ (Atif et al., 2005) การผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูงช่วยเพิ่มผลผลิตก๊าซชีวภาพโดยการลดความสามารถในการละลายของก๊าซชีวภาพและลดความดันไฮโดรเจนบริเวณ head space นอกจากนี้การหมักไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูงยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย (O-Thong Prasertsan, Intrasungka, Dhamwichukorn and Birkeland, 2007) ที่อุณหภูมิสูง (60°C) จะนำไปสู่ผลได้ไฮโดรเจนที่สูงกว่าที่อุณหภูมิเมโซฟิลิก



ภาพที่ 4.8 โครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (a) จากถังปฏิกรณ์ ASBR สำหรับการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิสูง และ (b) จากถังปฏิกรณ์ UASB สำหรับการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิเมโซฟิลิก (M) DGGE Marker (A) bacterial profile และ (B) archaea profile

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน อัตราการกำจัด COD คือร้อยละ 38 โดยมี COD คงเหลือในน้ำทิ้งเฉลี่ยอยู่ที่ 59.5 g/l ประสิทธิภาพการกำจัด COD ต่ำในขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจน เนื่องจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศไม่สมบูรณ์ ประสิทธิภาพการย่อยสลายของแข็งแขวนลอย (SS) :ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงการย่อยสลายของวัสดุของแข็งในระหว่างการเดินระบบอยู่ที่ร้อยละ 70 ของ SS ในน้ำเข้าถูกย่อยสลายในขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจน กระบวนการหมักที่อุณหภูมิสูงโดยถังปฏิกรณ์ ASBR เหมาะสมสำหรับของเสียที่มีปริมาณของแข็งแขวนลอยสูงอย่างเช่นน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เนื่องจากให้กิจกรรมการย่อย

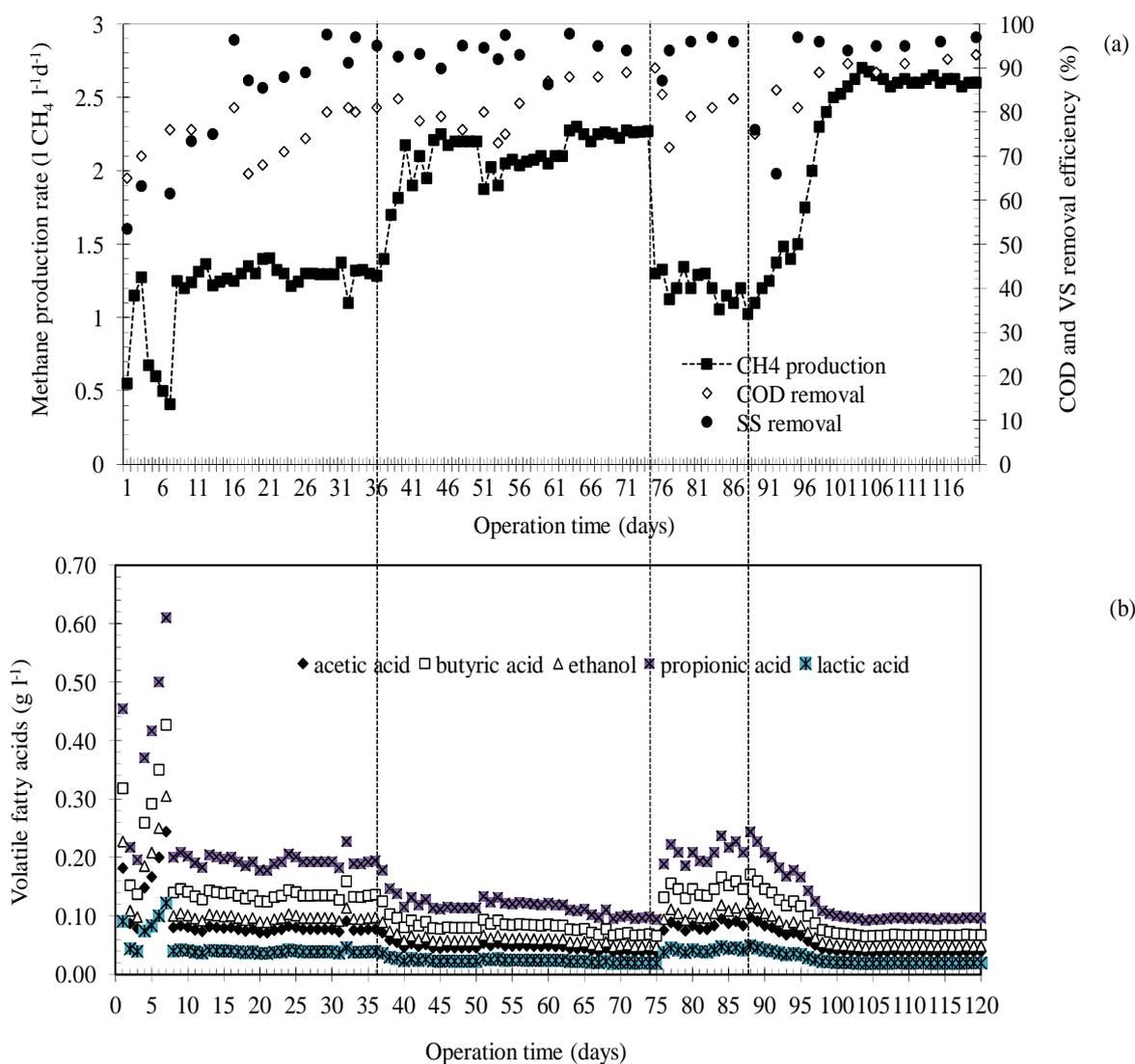
สลายสูง ASBR ถูกใช้สำหรับการผลิตไฮโดรเจนเนื่องจากเป็นกระบวนการที่ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงและมีระยะเวลาการกักเก็บน้ำ (HRT) สั้น และมีความยืดหยุ่นในการดำเนินงานสูง (Kim et al., 2005) และยังป้องกันการรบกวนของของแข็งปริมาณสูงในการเติมสารตั้งต้นเข้าระบบ (Prasertsan et al., 2009) ในขั้นตอนการผลิตไฮโดรเจนมีการสะสมของกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้น 4,866 และ 7,855 mg/l และมีการสะสมเพียงเล็กน้อยของเอทานอล โพรพานอล กรดโพรพิโอนิก และกรดวาเลอริก ที่ความเข้มข้น 200 408 150 และ 146 mg/l ตามลำดับ

DGGE โปรไฟล์จากตะกอนสลัดจ์ที่สภาวะการผลิตไฮโดรเจนคงที่ในถังปฏิกรณ์ ASBR แสดงแบบที่เรียกกลุ่มเด่น *Thermoanaerobacterium* spp. เช่นสปีชีส์ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* และ *Thermoanaerobacterium acidoterolans* (ภาพที่ 4.8a) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *T. thermosaccharolyticum* คือ พีเอชในช่วงระหว่าง 5-6 อุณหภูมิ 60 °C ซึ่งมีรายงานว่า *T. thermosaccharolyticum* พบเป็นประชากรกลุ่มเด่นในถังปฏิกรณ์ผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูงและมีบทบาทสำคัญในการผลิตไฮโดรเจน (O-Thong et al., 2008) *Thermoanaerobacterium* สามารถใช้คาร์โบไฮเดรต อย่างเช่น แป้ง ไซแลน เซลลูโลส และน้ำตาล สำหรับการผลิตไฮโดรเจน *Thermoanaerobacterium* หลายสปีชีส์ที่เป็นที่รู้จักกันว่ามีความสามารถในการผลิตไฮโดรเจน ได้แก่ *T. thermosaccharolyticum* *T. polysaccharolyticum* *T. zeae* *T. lactoethylicum* และ *T. aotearoense* ในการศึกษาปัจจุบันจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ยังคงมีกิจกรรมที่สูง ผลิตไฮโดรเจน และอัตราการเจริญของแบคทีเรียผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิในการหมักที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักที่อุณหภูมิมิโซฟิลิก

4.4.2 การผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์แบบ UASB

ระบบการย่อยสลายไร้อากาศสองขั้นตอนในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วยขั้นตอนการหมักน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิสูงในถังปฏิกรณ์แรก (HRT 2 วัน) สำหรับขั้นตอนที่สองทำการเดินระบบที่อุณหภูมิ 28-35 °C ในถังปฏิกรณ์ UASB โดยใช้น้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในขั้นตอนแรก และมีการแปรผัน HRT 10-20 วัน อัตราการผลิตมีเทนที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.9 HRT 20 วัน ถูกใช้ในการเริ่มต้นเดินระบบการผลิตมีเทนแบบต่อเนื่อง การผลิตมีเทนเริ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างการเริ่มต้นระบบ แสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งหลังการผลิตไฮโดรเจนสามารถถูกใช้ได้อย่างง่ายดายในกระบวนการเมทาโนจีนีซิส การผลิตมีเทนลดลงหลังจากเพิ่ม HRT เป็น 10 วัน ในวันที่ 77 และกักคืนระบบโดยใช้ HRT 15 วัน แสดงให้เห็นว่า HRT 15 วันเป็น HRT สูงสุดสำหรับการผลิตมีเทน ที่สภาวะคงที่ใน HRT 15 วัน การผลิตก๊าซชีวภาพคงที่และการกำจัด COD สูงกว่าร้อยละ 90 อัตราการผลิตมีเทนเฉลี่ยที่สภาวะคงที่ของ HRT 20 15 และ 10 วัน อยู่ที่ 1.8 2.53 และ 1.2 I-CH₄/l/d อัตราการผลิตมีเทนสูงสุด คือ 2.6 I-CH₄/l/d ที่ HRT 15 วัน และภาระบรรทุกทุกสารอินทรีย์ (OLR) เท่ากับ 60 gCOD/l/d ความเข้มข้นของมีเทนในก๊าซชีวภาพอยู่ที่ร้อยละ 70-76

โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 73 ผลได้มีเทนในถังปฏิกรณ์ คือ $315 \text{ mlCH}_4/\text{gCOD}$ การผลิตไฮโดรเจน และมีเทนสองขั้นตอนเพิ่มการย่อยสลายของเสียอินทรีย์และให้ผลได้ก๊าซสูงและมีคุณภาพ ผลได้มีเทน $315 \text{ mlCH}_4/\text{gCOD}$ สูงกว่าการผลิตมีเทนจากการผลิตมีเทน ($220 \text{ ml CH}_4/\text{gCOD}$) สองขั้นตอนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดย Chaisri et al. (2007) พีเอชเสถียรที่ 7.3-7.5 ตลอดการทดลองโดยไม่มีการควบคุม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระบบการย่อยสลายไร้อากาศสองขั้นตอนช่วยเพิ่มอัตราการผลิตมีเทน



ภาพที่ 4.9 อัตราการผลิตมีเทน ประสิทธิภาพการกำจัด COD ประสิทธิภาพการกำจัด SS (a) และความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ (b) จากถังปฏิกรณ์ UASB ที่มีการแปรผัน HRT

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะน้ำทิ้งจากถังปฏิกรณ์ผลิตมีเทน ในน้ำทิ้งหลังการผลิตมีเทนจากระบบการย่อยสลายไร้อากาศสองขั้นตอนมีประสิทธิภาพการกำจัด COD และ SS มากกว่าร้อยละ 90 ที่สภาวะที่เหมาะสม (HRT 15 วัน) ในขณะที่น้ำทิ้งจากการผลิตมีเทนในระบบการย่อยสลายไร้อากาศแบบเดี่ยวมีประสิทธิภาพการกำจัด COD ร้อยละ 84 และประสิทธิภาพการกำจัด SS ร้อยละ 73 ที่ HRT 17 วัน ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเกิดการย่อยสลายไม่สมบูรณ์ในระบบเดี่ยวส่งผลให้ผลผลิตก๊าซต่ำ

โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ UASB แสดงแบคทีเรีย **Clostridium** sp. **Lactobacillus hamster** และ **Lactobacillus** sp. เป็นประชากรเด่นในการผลิตมีเทน และพบ **Methanosarcina** sp. และ **Methanococcus** sp. เป็นประชากรอาศัยเด่นและมีบทบาทสำคัญในการผลิตมีเทน (ภาพที่ 4.8b) โดยมี **Methanosarcina** sp. เป็นประชากรเด่นซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม acetoclastic methanogens สำหรับ **Methanosarcina** ถูกรายงานว่าเป็นประชากรเด่นในสภาวะที่มีความเข้มข้นกรดอะซิติกสูง (>1.2 mM) สอดคล้องกับความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงในน้ำทิ้งหลังการผลิตไฮโดรเจนที่ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตมีเทน (ตารางที่ 4.6) อาศัยเด่นอื่นๆ ที่พบ คือ **Methanococcus** sp. ซึ่งเป็น hydrogenotrophic methanogenesis ประสิทธิภาพกระบวนการเมทาโนเจนิคในกระบวนการย่อยสลายไร้อากาศสองขั้นตอนสูงกว่าระบบการย่อยสลายไร้อากาศขั้นตอนเดี่ยว ชี้ให้เห็นว่าการผลิตไฮโดรเจนสามารถมีประสิทธิภาพควบคู่ไปกับกระบวนการเมทาโนเจนิค

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Palm oil mill effluent, POME) มีปริมาณสารอินทรีย์สูงโดยมีค่า COD สูงถึง 85.5 gCOD/l จึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังมีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบโดยมี ไนโตรเจนทั้งหมด 830 mg/l ฟอสฟอรัสทั้งหมด 130 mg/l และเหล็ก 3 mg/l ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเซลล์จุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสภาพเป็นกรด (พีเอช 4.5) ดังนั้นก่อนนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจึงต้องทำการปรับพีเอชให้เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน สำหรับศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายใต้อุณหภูมิสูงอยู่ในช่วง 130-200 ml H₂/g COD ซึ่งผลผลิตไฮโดรเจนมากกว่าร้อยละ 90 ถูกผลิตขึ้นภายใน 2 วัน และความเข้มข้นของไฮโดรเจนในก๊าซชีวภาพอยู่ในช่วงร้อยละ 45-60 เมื่อสิ้นสุดการหมักกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้น 23,450-3,580 และ 3,250-4,250 mg/l เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน

สำหรับศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ทำการทดลองที่ปริมาณสารอินทรีย์ 11.8 17.7 23.6 และ 29.5 gVS/l (คิดเป็นกรดไขมันระเหยได้เริ่มต้น 0.9 1.8 3.6 และ 4.7 g/l ตามลำดับ) โดยให้ผลได้มีเทนเท่ากับ 510 467 428 และ 401 ml CH₄/g VS ตามลำดับ ผลได้มีเทนต่ำเนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์สูงส่งผลต่อกระบวนการผลิตมีเทน กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดบิวทีริก เต็มๆ ส่งผลกระทบเชิงบวก ในขณะที่กรดโพรพิโอนิกเต้เต็มๆ ส่งผลกระทบเชิงลบต่อกระบวนการ methanogenesis การผสมกันระหว่างกรดแลคติกและกรดอะซิติก กรดอะซิติกและกรดบิวทีริก และกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก ส่งผลกระทบเชิงบวกต่อกระบวนการ methanogenesis อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) ส่วนการผสมกันระหว่างกรดแลคติกและกรดบิวทีริก กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิก ส่งผลกระทบเชิงลบต่อกระบวนการ methanogenesis อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทน และเกิดการยับยั้งการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) เมื่อเติมกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก สภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตมีเทนคือ กรดแลคติก 2.88 g/l กรดอะซิติก 5.01 g/l กรดบิวทีริก 0.44 g/l และกรดโพรพิโอนิก 5.55 g/l โดยให้ผลได้มีเทนสูงสุดที่ 447 ml CH₄/gVS การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (DGGE) พบว่าคุณภาพของ methanogenic bacteria และ methanogenic archaea สอดคล้องกับผลได้มีเทน โดย **Methanoculleus thermophiles** และ **Methanosarcina mazei** เป็นประชากรอาศัยเด่น ซึ่ง **Methanoculleus thermophiles** เป็นประชากรเด่นในสภาวะปกติและไม่ปรากฏในสภาวะที่เกิดการยับยั้งการผลิตมีเทน

การหมักสองขั้นตอนที่อุณหภูมิสูงและกระบวนการเมทาโนจีนีซิสที่อุณหภูมิเมโซฟิลิก แสดงให้เห็นถึงวิธีการที่มีแนวโน้มในการกู้คืนพลังงานและการกำจัด COD และ SS จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มสูงโดยระบบการย่อยสลายไร้อากาศสำหรับผลิตไฮโดรเจนควบคู่กับการผลิตมีเทน การผลิตไฮโดรเจนในขั้นตอนที่หนึ่งเดินระบบในถังปฏิกรณ์ anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 °C ระยะเวลาเก็บน้ำ (Hydraulic retention time, HRT) 2 วัน และภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (Organic loading rate, OLR) 60 gCOD/l/d ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 1.84 l-H₂/l/d คิดเป็นค่าเฉลี่ย 1.8 l-H₂/l/d อัตราการผลิตมีเทนสูงสุดในขั้นตอนที่สองอยู่ที่ 2.6 และ 2.4 l-CH₄/l/d ตามลำดับ ที่ HRT 15 วัน การผลิตไฮโดรเจนควบคู่กับการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มช่วยเพิ่มผลได้พลังงาน โดยให้ผลได้พลังงานสูงกว่าการผลิตมีเทนระบบเดี่ยวร้อยละ 34 และสูงกว่าการผลิตไฮโดรเจนระบบเดี่ยวถึงร้อยละ 90 โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์จากถังปฏิกรณ์ UASB แสดงแบคทีเรีย **Clostridium** sp. **Lactobacillus hamster** และ **Lactobacillus** sp. เป็นประชากรเด่นในการผลิตมีเทน และพบ **Methanosarcina** sp. และ **Methanococcus** sp. เป็นประชากรอาศัยเด่นและมีบทบาทสำคัญในการผลิตมีเทน

บรรณานุกรม

- Ahmad, A.L., Chong, M.F. & Bhatia, S. (2007). Mathematical modeling of multiple solutes system for reverse osmosis process in palm oil mill effluent (POME) treatment. *Journal of Chemical Engineering*. 132, 183-193.
- Alrawi, R.A., Ahmad, A., Ismail, N. & Kadir, M.O.A. (2011). Anaerobic co-digestion of palm oil mill effluent with rumen fluid as a co-substrate. *Desalination*. 269(1-3), 50-57.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P. & van Lier, J.P. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*. 59, 927-934.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A. & Espinosa, R.D. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*. 22(9), 477-485.
- APHA, AWWA. & WEF. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington DC : American Public Health Association.
- Atif, A.A.Y., Fakhru'l-Razi, A., Ngan, M.A., Morimoto, M., Iyuke, S.E. & Veziroglu, N.T. (2005). Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30, 1393-1397.
- Badie, M., Jahim, J.M., Anuar, N. & Abdullah, S.R.S. (2011). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production from palm oil mill effluent in anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36(10), 5912-5919.
- Barredo, M.S. & Evison, L.M. (1991). Effect of propionate toxicity on methanogenic-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii* and *Methanospirillum hungatii* at different pH values. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 1764-1769.
- Bhatia, S., Othman, Z. & Ahmad, A.L. (2007). Pretreatment of palm oil mill effluent (POME) using **Moringa oleifera** seeds as natural coagulant. *Journal of Hazardous Materials*. 145, 120-126.
- Cao, G.L., Ren, N.Q., Wang, A.J., Guo, W.Q., Xu, J.F. & Liu, B.F. (2010). Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by

- Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum** W16. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 13475-13480.
- Cavinato, C., Bolzonella, D., Pavan, P. & Cecchi, F. (2010). Two-phase thermophilic anaerobic digestion of biowaste for bio-hythane production: Yields and feasibility of the process. *Journal of Biotechnology*. 150, 62.
- Chaisri, S., Boonsawang, P., Prasertsan, P. & Chaiprapat, S. (2007). Effect of organic loading rate on methane and volatile fatty acids production from anaerobic treatment of palm oil mill effluent in UASB and UFAF reactors. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2, 311-323.
- Chen, W.M., Tseng, Z.J., Lee, K.S. & Chang, J.S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30(10), 1063-1070.
- Demirel, B. & Yenigun, O. (2002). Two-phase anaerobic digestion processes: A Review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 77, 743-755.
- Department of Commercial Economics. (2010). Thailand oil palm plantation. Retrieved July 21 2010 from <http://www.oae.go.th/pdf/indicator.pdf>.
- Fang, C., O-Thong, S., Boe, K. & Angelidaki, I. (2011). Comparison of UASB and EGSB reactors performance, for treatment of raw and deoiled palm oil mill effluent (POME). *Journal of Hazardous Materials*. 189(1-2), 229-234.
- Fang, H.H.P. & Yu, H.Q. (2001). Acidification of lactose in wastewater. *Journal of Environmental Engineering*. 127(9), 825-831.
- Gobi, K. & Vadivelu, V.M. (2013). By-products of palm oil mill effluent treatment plant-A step towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 28, 788-803.
- Hallenbeck, P.C. & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?. *Trends in Biotechnology*. 27(5), 287-297.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L. & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27, 1339-1347.

- Hawkes, F.R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R. & Hawkes, D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*. 32, 172-184.
- Hoanh, C.T., Szuster, B.W., Pheng, K.S., Ismail, A.M. & Nobel, A.D. (2010). *Tropical Deltas and coastal zones: food production, communities and environment at the land-water interface*. Wallingford : CAB International Publishing.
- Ismail, I., Hassan, M.A., Rahman, N.A.A. & Soon, C.S. (2010). Thermophilic biohydrogen production from palm oil mill effluent (POME) using suspended mixed culture. *Biomass and Bioenergy*. 34(1), 42-47.
- Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P. & Angelidaki, I. (2009). Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 100(9), 2562-2568.
- Kapdan, I.K. & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 569-582.
- Khamtib, S. & Reungsang, A. (2012). Biohydrogen production from xylose by ***Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*** KKU19 isolated from hot spring sediment. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 12219-12228.
- Khanal, S.K. (2008). *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: Principle and application*. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc.
- Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S. (2005). Performance comparison of a continuous-flow stirred tank reactor and an anaerobic sequencing batch reactor for fermentative hydrogen production depending on substrate concentration. *Water Science and Technology*. 52, 23-29.
- Kongjan, P., O-Thong, S. & Angelidaki, I. (2011). Performance and microbial community analysis of two-stage process with extreme thermophilic hydrogen and thermophilic methane production from hydrolysate in UASB reactors. *Bioresource Technology*. 102, 4028-4035.
- Kongjan, P., O-Thong, S., Kotay, M., Min, B. & Angelidaki, I. (2010). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 105, 899-908.

- Kraemer, J.T. & Bagley, D.M. (2006). Supersaturation of dissolved H₂ and CO₂ during fermentative hydrogen production with N₂ sparging. *Biotechnology Letters*. 28, 1485-1491.
- Lay, C.H., Wu, J.H., Hsiao, C.L., Chang, J.J., Chen, C.C. & Lin, C.Y. (2010). Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 13445-13451.
- Lay, J.J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*. 68, 269-278.
- Lee, H.S., Vermaas, W.F.J. & Rittmann, B.E. (2010). Biological hydrogen production: prospects and challenges. *Trends in Biotechnology*. 28(5), 262-271.
- Levin, D.B., Pitt, L. & Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitation to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29, 171-185.
- Li, C. & Fang, H.H.P. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 37, 1-39.
- Liu, Y., Yu, P., Song, X. & Qu, Y. (2008). Hydrogen production from cellulose by co-culture of **Clostridium thermocellum** JN4 and **Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum** GD17. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 2927-2933.
- Liu, Z., Zhang, C., Lu, Y., Wu, X., Wang, L., Wang, L., Han, B. & Xing, X.H. (2013). States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. *Bioresource Technology*. 135, 292-303.
- Luo, G., Talebnia, F., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q. & Angelidaki, I. (2011). Enhanced bioenergy recovery from rapeseed plant in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 102, 1433-1439.
- Mamimin, C., Thongdumyu, P., Hniman, A., Prasertsan, P., Imai, T. & O-Thong, S. (2012). Simultaneous thermophilic hydrogen production and phenol removal from palm oil mill effluent by **Thermoanaerobacterium**-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 15598-15606.

- Miyake, J., Wakayama, T., Schnackenberg, J.S., Arai, T. & Asada, Y. (1999). Simulation of daily sunlight illumination pattern for bacteria photo-hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88, 659-663.
- O-Thong, S., Mamimin, C. & Prasertsan, P. (2011). Effect of temperature and initial pH on biohydrogen production from palm oil mill effluent : long-term evaluation and microbial community analysis. *Electronic Journal of Biotechnology*. 14(5), 1-12.
- O-Thong, S., Prasertsan, P., Intrasungkha, N., Dhamwichukorn, S. & Birkeland, N.K. (2007). Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, 583-590.
- O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D. & Angelidaki, I. (2008). Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated ***Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*** PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 1204-1214.
- Pan, J., Zhang, R., El-Mashad, H.M., Sun, H. & Ying, Y. (2008). Effect of food to microorganism ratio on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 6968-6975.
- Prasertsan, P., O-Thong, S. & Birkeland, N.K. (2009). Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 7448-7459.
- Reith, J.H., Wijffels, R.H. & Barten, H. (2003). *Bio-methane & Bio-hydrogen*. Netherland : Smiet offset.
- Ren, N.Q., Li, J.Z., Li, B.K., Wang, Y. & Liu, S.R. (2006). Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*. 31, 2147-2157.
- Reungsang, A., Pattra, S. & Sittijunda S. (2012). Optimization of Key Factors Affecting Methane Production from Acidic Effluent Coming from the Sugarcane Juice Hydrogen Fermentation Process. *Energies*. 5, 4746-4757.

- Roy, S., Vishnuvardhan, M. & Das, D. (2014). Improvement of hydrogen production by newly isolated ***Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*** IIT BT-ST1. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39(14), 7541-7552.
- Siegert, I. & Banks, C. (2005). The effect of volatile fatty acid addition on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochemistry*. 40, 3412-3418.
- Van Ginkel, S.W., Oh, S.E. & Logan, B.E. (2005). Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30, 1535-1542.
- Vijayaraghavan, K., Ahmad, D. & Abdul Aziz, M.E.B. (2007). Aerobic treatment of palm oil mill effluent. *Journal of Environmental Management*. 82, 24-31.
- Wagner, A.O., Malin C. & Illmer, P. (2011). Effect of various fatty acid amendment on a microbial digester community in batch culture. *Waste Management*. 31, 431-437.
- Wang, X. & Zhao, Y.C. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34, 245-254.
- Willquist, K., Nkemka, V.N., Svensson, H., Pawar, S., Ljunggren, M., Karlsson, H., Murto, M., Hulteberg, C., van Niel, Ed.W.J. & Liden, G. (2012). Design of a novel biohythane process with high H₂ and CH₄ production rates. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 17749-17762.
- Wu, T.Y., Mohammad, A.W., Jahim, J.Md. & Anuar, N. (2009). A holistic approach to managing palm oil mill effluent (POME): biotechnological advances in the sustainable reuse of POME. *Biotechnology Advances*. 27, 40-52.
- Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J. & Hayashi, S. (2002). Microbial hydrogen production starch-manufacturing wastes. *Biomass and Bioenergy*. 22, 389-395.
- Yusof, B., Jalani, B.S. & Chan, K.W. (2000). *Advances in Oil Palm Reserch Volume II*. Kuala Selangor : Malaysian Palm Oil Board.
- Zhang, T., Liu, H. & Fang, H.H.P. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management*. 69, 149-156.

- Zhang, Z.P., Show, K.Y., Tay, J.H., Liang, D.T. & Lee, D.J. (2008). Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors-A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33, 1559-1564.
- Zheng, X.J. & Yu, H.Q. (2005). Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *Journal of Environmental Management*. 74(1), 65-70.
- Zinatizadeh, A.A. L., Mohamed, A.R., Abdullah, A.Z., Mashitaha, M.D., Hasnain Isa, M. & Najafpour, G.D. (2006). Process modeling and analysis of palm oil mill effluent treatment in an up-flow anaerobic sludge fixed film bioreactor using response surface methodology (RSM). *Water Research*. 40, 3193-3208.