

การปรับปรุงกระบวนการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซมีเทนจากน้ำทิ้งโรงงาน
สกัดน้ำมันปาล์มด้วยระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศสองขั้นตอนภายใต้

สภาวะอุณหภูมิสูง

Enhancement of hydrogen and methane production from palm oil mill
effluent by two-stage anaerobic digestion

ชลธิชา มามิมิน (Chonticha Mamimmin)*

สมพงษ์ โอทอง (Sompong O-Thong)**

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Palm oil mill effluent, POME) มีปริมาณสารอินทรีย์สูง โดยมีค่า COD สูงถึง 85.5 gCOD/l จึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาศักยภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยการหมักแบบไร้แสง (dark fermentation) ทำการทดลองโดยมีการแปรผันปริมาณสารอินทรีย์ที่ 20 40 และ 60 g/l ให้ศึกษาศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนอยู่ในช่วง 130-200 ml H₂/g COD เมื่อสิ้นสุดการหมักกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 3.95 2.13 0.25 1.5 และ 0.99 g/l ตามลำดับ เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นพลังงานอย่างเช่น มีเทน ผ่านกระบวนการเมทาโนจีเนซิส (methanogenesis) โดยจุลินทรีย์กลุ่มเมทาโนเจน (methanogens) ภายใต้สภาวะการย่อยสลายแบบไร้อากาศได้ ผลได้มีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนที่ปริมาณสารอินทรีย์ 11.8 17.7 23.6 และ 29.5 gVS/l (คิดเป็นกรดไขมันระเหยได้ เริ่มต้น 0.9 1.8 3.6 และ 4.7 g/l ตามลำดับ) เท่ากับ 510 467 428 และ 401 ml CH₄/g VS เพื่อศึกษาผลของกรดไขมันระเหยได้ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนต่อการผลิตมีเทนและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง พื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology) ถูกนำมาใช้ในการออกแบบการทดลอง ผลการศึกษาพบว่า กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทน และเกิดการยับยั้งการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) เมื่อมีการเติมกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก สภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตมีเทน คือ 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 ความ

* ดุษฎีบัณฑิต หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยทักษิณ

** อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

เข้มข้นของกรดอินทรีย์ระเหยได้สูงกว่า 10 g/l ส่งผลกระทบต่อประชากรอาร์เคียแต่ไม่ส่งผลกระทบต่อแบคทีเรีย และพบประชากรอาร์เคียกลุ่มเด่น คือ **Methanoculleus thermophiles** จากผลการศึกษาพบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจน และน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีศักยภาพในการผลิตมีเทนสูง งานวิจัยนี้จึงพัฒนากระบวนการหมักแบบสองขั้นตอนสำหรับการผลิตไฮโดรเจนและมีเทนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม การหมักสองขั้นตอนที่อุณหภูมิสูงและกระบวนการเมทาโนจีซิสที่อุณหภูมิเมโซฟิลิก แสดงให้เห็นถึงวิธีการที่มีแนวโน้มในการกู้คืนพลังงานและการกำจัด COD และ SS จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มสูงโดยระบบการย่อยสลายไร้อากาศสำหรับผลิตไฮโดรเจนควบคู่กับการผลิตมีเทน การผลิตไฮโดรเจนในขั้นตอนที่หนึ่งเดินระบบในถังปฏิกรณ์ anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 °C ระยะเวลาที่กักเก็บน้ำ (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 โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์แสดงแบคทีเรีย **Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum** เป็นประชากรเด่นในการผลิตไฮโดรเจน ในขณะที่ **Methanoculleus** sp. เป็นประชากรเด่นในการผลิตมีเทน

คำสำคัญ: น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม การผลิตไฮโดรเจนและมีเทนที่อุณหภูมิสูง กรดไขมันระเหยได้ ฟีนีลิวตอบสอง การผลิตไฮโดรเจนและมีเทนสองขั้นตอน, โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์

Abstract

Palm oil mill effluent (POME) was contained of 85.5 g/l COD. Thus, POME is suitable substrate for hydrogen production. This research aims to study on hydrogen production from POME by dark fermentation. POME was tested at different initial COD loading levels of 20, 40 and 60 gCOD/l. Gas production from POME reached an H₂ yield of 130-200 ml H₂/g COD. At the end of the BHP tests, lactic, acetic, butyric and propionic acids are the main products of POME hydrogenic effluent with a concentration of 3.95, 2.13, 0.25, 1.5 and 0.99 g/l respectively. Consequently, VFA could be converted into a suitable product or energy carrier such as methane via methanogenesis by methanogens under anaerobic digestion. Methane yields from

POME hydrogenic effluent at VS loading of 11.8, 17.7, 23.6 and 29.5 gVS/l corresponding to initial volatile fatty acid loading of 0.9, 1.8, 3.6 and 4.7 g/l, respectively, was 510, 467, 428 and 401 mlCH₄/gVS. Response surface methodology was employed to study the effects of mixed VFA concentrations in biohydrogen effluent on methane yield and microbial community. It was found that acetic and butyric acid at high concentrations (8 g/l) were found to significantly inhibit the methane production process, more significantly than lactic and propionic acid (P<0.01). An optimization analysis showed that lactic, acetic, butyric and propionic acid at concentrations of 2.88, 5.01, 0.44 and 5.55 g/l, respectively, led to the methane yield of 447 ml CH₄/gVS. The concentration of volatile fatty acid at higher than 10 g/l were found to inhibit thermophilic methanogenic archaea but it did not happen in thermophilic methanogenic bacteria. **Methanoculleus thermophilus** was the most abundant species identified in normal conditions, but was not present at inhibited conditions. The result was found that POME is suitable substrate for hydrogen production and POME hydrogenic effluent was high methane production. This study also demonstrates the feasibility of the two-stage hydrogen and methane from POME. A two-stage thermophilic fermentation and mesophilic methanogenic process shown very promising method for the combined energy recovery and removal of COD and SS in POME with the sequential anaerobic production of hydrogen and methane production. The hydrogen production in first stage was operated in anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) under a temperature of 55°C hydraulic retention time (HRT) of 2 d and organic loading rate (OLR) of 60 gCOD //d with maximum hydrogen production rate of 1.84 l H₂ //d and an average of 1.8 l H₂ //d. The maximum and average of methane production rate in the second stage were 2.6 and 2.4 l CH₄ //d, respectively at 15 d HRT. The sequential generation of hydrogen and methane from POME markedly increases the energy yield with 34% higher than single stage methane production and 90% higher than single stage hydrogen production. Hydrogen reactor was dominated with hydrogen producing bacteria of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, while *Methanoculleus* sp. was the dominant methanogen in methane reactor.

Keywords: Palm oil mill effluent, Thermophilic hydrogen and methane production, Volatile fatty acids, Response surface methodology, Two-stage hydrogen and methane production, Microbial community analysis

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 m³H₂/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 92 128 57 92 และ 115 ml H₂/gCOD (Van Ginkel et al., 2008; Zhang et al., 2003; O-Thong et al., 2007) น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Palm oil mill effluent; POME) เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรเจนและมีปริมาณมากในประเทศไทย มาเลเซียและอินโดนีเซียในการผลิตน้ำมันปาล์มดิบ (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 m³H₂/m³d ภายในถังปฏิกรณ์แบบ CSTR ที่ระยะเวลากักเก็บ (hydraulic retention time; HRT) 4 วัน Prasertsan et al. (2009) ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (POME) แบบต่อเนื่องโดย **Thermoanaerobacterium-rich sludge** ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูง (60°C) ที่สภาวะที่เหมาะสม คือ HRT 2 วัน และ OLR (organic loading rate) 60 gCOD/l.d ในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนที่ 9.1 l H₂/l.d (16.9 mmol H₂/l.h) ความก้าวหน้าของลักษณะของจุลินทรีย์ชอบร้อน (thermophilic micro-organisms) 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** หลายสายพันธุ์ ที่สามารถคัดแยกได้ 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 ผ่านกระบวนการเมทาโนจีนิซิส (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) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงการเป็นกลูทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอไฮเทน (biohythane) ซึ่งเป็นส่วนผสมของไฮโดรเจนและมีเทน (Kongjan et al., 2011; Luo et al., 2011) ซึ่งนำไปใช้ในทางเคมีหรือใช้เป็นพลังงานในเครื่องยนต์ ไบโอไฮเทนสามารถผลิตได้ผ่านการหมักแบบสองขั้นตอนของจุลินทรีย์ (two-stage microbial fermentation) โดยในขั้นตอนแรกวัตถุดิบจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนและ VFA หลังจากนั้น VFA จะถูกเปลี่ยนไปเป็นมีเทนในขั้นตอนที่สอง (Liu et al., 2013) ผลกระทบจากการผลิตไฮโดรเจนมีความสำคัญมากสำหรับการจัดการระบบไบโอไฮเทน เนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวส่งผลต่อการภาวะบรรทุทุกที่มีประสิทธิภาพและความเสถียรของระบบในระยะเมทาโนจีนิซิส (Wang and Zhao, 2009) อัตราการเปลี่ยนจาก VFA เป็นกรดอะซิติกจะส่งผลต่อคุณภาพของ methanogenic archaea และมีผลต่ออัตราการย่อยสลายของกรดอะซิติกและผลได้มีเทน (methane yield)

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ พัฒนาการหมักแบบสองขั้นตอน สำหรับการผลิตไบโอไฮเทนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ปัจจัยที่ส่งผลต่อความเสถียรของระบบ

ผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบต่อเนื่อง ผลของกรดไขมันระเหยได้ (VFA) ในน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนต่อการผลิตมีเทนและโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูง และสุดท้ายการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในถังปฏิกรณ์แบบ UASB นอกจากนี้แนวคิด bio-refinery ใหม่ ในอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันยังช่วยพัฒนาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (ไฮโดรเจนและมีเทน) เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการทั้งหมด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมกล้าเชื้อผลิตไฮโดรเจนและมีเทน

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

2. ศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อผลิตไฮโดรเจนและการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตรัง น้ำมันปาล์ม ในจังหวัดตรัง วิเคราะห์ห้องค์ประกอบน้ำทิ้ง ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ปริมาณของแข็งสารอินทรีย์ระเหยได้ (VS) ไขมัน ค่าความเป็นด่าง พีเอช ซีโอดี (Chemical oxygen demand: COD) บีโอดี (Biochemical oxygen demand) คาร์โบไฮเดรต ฟอสฟอรัส ของแข็งแขวนลอย (SS) และแก้ว (APHA et al., 1998)

2.2 การทดสอบแนวโน้มในการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เนื่องจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมี pH ต่ำซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนในการทดลองทำการปรับ pH น้ำทิ้งด้วย 6M NaHCO₃ หรือ 4M acetic acid ให้มี pH เท่ากับ 5.5 หลังจากนั้นทำการทดลองในขวดน้ำแกลีสขนาด 500 mL โดยใช้ น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มร้อยละ 80 ของปริมาตรทดลอง ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารอินทรีย์เริ่มต้นที่ 20 40 และ 60 gCOD/l และกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 20 ของปริมาตรทดลอง ทำการหมักที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 7 วัน วัดปริมาตรการผลิตไฮโดรเจนโดยการแทนที่น้ำทุก 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของไฮโดรเจนด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีทุกวัน

3. ศักยภาพการผลิตมีเทนจากน้ำทิ้งหลังการผลิตไฮโดรเจนโดยกลุ่มจุลินทรีย์แบบไร้อากาศที่อุณหภูมิสูง

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) และแอสทานอล ได้ทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง gas chromatography (HP6850, Hewlett Packard)

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) เติมเซลลูโลส 20 g/l เติมกรดอะซิติก และกรดบิวทีริก 5 g/l วัดปริมาตรการผลิตก๊าซชีวภาพโดยการแทนที่น้ำทุกวัน และวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ทุกสองวัน

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 จากขั้นตอนนี้จะได้สถานะที่เหมาะสมในการผลิตมีเทนโดยจุลินทรีย์แต่ละชนิด ศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

5. การผลิตก๊าซไฮโดรเจน (ในถังปฏิกรณ์แบบ ASBR) และมีเทน (ในถังปฏิกรณ์แบบ UASB) จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยระบบการย่อยสลายแบบไร้อากาศสองขั้นตอน

ระบบการผลิตไฮโดรเจนที่อุณหภูมิสูงและการผลิตมีเทนที่อุณหภูมิมะเขาสองขั้นตอน กระบวนการผลิตประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ถังผสม ถังปฏิกรณ์แบบ ASBR สำหรับการผลิตก๊าซไฮโดรเจน และถังปฏิกรณ์แบบ UASB สำหรับการผลิตมีเทน แสดงดังภาพที่ 3.1 น้ำทิ้งจากถังผสม จะถูกนำเข้าสู่ถังปฏิกรณ์แบบ 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 เติมน้ำเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 50 ของปริมาตรทำงาน ระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) เมื่อปริมาณไฮโดรเจน องค์ประกอบไฮโดรเจน 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 การเริ่มต้นเดินระบบจะใช้เมล็ดตะกอนจุลินทรีย์จากระบบผลิตก๊าซชีวภาพร้อยละ 80 ของปริมาตรการทดลอง จากนั้นเติมน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนร้อยละ 20 ของปริมาตรการทดลอง ทำให้ภายในถังหมักอยู่ในสภาวะไร้อากาศโดยพ่นก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที ทำการแปรผันระยะเวลาพักเก็บน้ำ (HRT) ที่ 20 วัน เดินระบบในแต่ละ HRT จนกระทั่งระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) เมื่อปริมาณมีเทน องค์ประกอบมีเทน 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 วัดปริมาณการผลิตก๊าซชีวภาพโดยการแทนที่น้ำทุกวัน และวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซชีวภาพด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ทุกสองวัน วิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์โดยเทคนิค PCR-DGGE เปรียบเทียบกับชุดการทดลองการหมักมีเทนแบบเดี่ยวที่มีการเดินระบบที่อุณหภูมิ 35 °C pH 7.3-7.5 ระยะเวลาพักเก็บน้ำ 17 วัน

6. การศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

สกัด total genomic DNA จากตัวอย่างตะกอนจุลินทรีย์ในชุดการผลิตมีเทน หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR สำหรับการทำให้ PCR ครั้งแรก total genomic DNA ถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบร่วมกับไพรเมอร์ Arch21f (5' TTCCGG TTGATCCYGC-CGGA 3') และ Arch958r (5' YCCGGCGTTGAMTCCAATT 3') (สำหรับศึกษาประชากรอาเคียร์) 1492r (5' GAAAGGAGGTGATCCAGCC 3') และ 27f (5' GAGTTTGATCCTTGCTCAG 3') (สำหรับศึกษาประชากรแบคทีเรีย) นำ PCR Product ครั้งแรกใช้ในการทำ PCR ครั้งที่สองสำหรับอาเคียร์ใช้ไพรเมอร์ Arch519r (5' TTACCGCGCGKGTG 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 ครั้งที่สองวิเคราะห์บน 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 ผลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์อ้างอิง ในฐานข้อมูล NCBI web interface (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kongjan et al., 2010)

สรุปผลและอภิปรายผล

น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Palm oil mill effluent, POME) มีปริมาณสารอินทรีย์สูง โดยมีค่า COD สูงถึง 85.5 gCOD/l จึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตไฮโดรเจน นอกจากนี้ น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังมีแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบโดยมี ไนโตรเจนทั้งหมด 830 mg/l ฟอสฟอรัสทั้งหมด 130 mg/l และเหล็ก 3 mg/l ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเซลล์จุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตาม น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสภาพเป็นกรด (พีเอช 4.5) ดังนั้นก่อนนำไปใช้ในการผลิตไฮโดรเจนจึงต้องทำการปรับพีเอชให้เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจน สำหรับศักยภาพการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มภายใต้อุณหภูมิสูงอยู่ในช่วง 130-200 ml H₂/g COD ซึ่งผลผลิตไฮโดรเจนมากกว่าร้อยละ 90 ถูกผลิตขึ้นภายใน 2 วัน และความเข้มข้นของไฮโดรเจนในก๊าซชีวภาพอยู่ในช่วงร้อยละ 45-60 เมื่อสิ้นสุดการหมัก กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้น 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 ในขณะที่กรดโพรพิโอนิกเต็ยๆ ส่งผลกระทบเชิงลบต่อกระบวนการ methanogenesis การผสมกันระหว่างกรดแลคติกและกรดอะซิติก กรดอะซิติกและกรดบิวทีริก และกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก ส่งผลกระทบเชิงบวกต่อกระบวนการ methanogenesis อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) ส่วนการผสมกันระหว่างกรดแลคติกและกรดบิวทีริก กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริกและกรดโพรพิโอนิก ส่งผลกระทบเชิงลบต่อกระบวนการ methanogenesis อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกที่ความเข้มข้นสูง (8 g/l) ยับยั้งกระบวนการผลิตมีเทนและเกิดการยับยั้งการผลิตมีเทนอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) เมื่อเติมกรดแลคติกและกรดโพรพิโอนิก สภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตมีเทน คือ 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

การหมักสองขั้นตอนที่อุณหภูมิสูงและกระบวนการเมทาโนจีนีซิสที่อุณหภูมิเมโซฟิลิกแสดงให้เห็นถึงวิธีการที่มีแนวโน้มในการกู้คืนพลังงานและการกำจัด COD และ SS จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มสูงโดยระบบการย่อยสลายไร้อากาศสำหรับผลิตไฮโดรเจนควบคู่กับการผลิตมีเทน การผลิตไฮโดรเจนในขั้นตอนที่หนึ่งเดินระบบในถังปฏิกรณ์ anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 55 °C ระยะเวลาที่เก็บน้ำ (Hydraulic retention time, HRT) 2 วัน และภาระบรรทุกสารอินทรีย์ (Organic loading rate, OLR) 60 gCOD//d ให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุดที่ 1.84 l-H₂//d คิดเป็นค่าเฉลี่ย 1.8 l-H₂//d อัตราการผลิตมีเทนสูงสุดในขั้นตอนที่สองอยู่ที่ 2.6 และ 2.4 l-CH₄//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 **Methanoculleus 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.
- Badiei, 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-hydrogen production: Yields and feasibility of the process. Journal of Biotechnology. 150, 62.
- Chaisri, S., Boonsawang, P., Prasertsan, P. & Chairapat, 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.

