

**IMPROVEMENT OF HYDROGEN PRODUCTION WITH ADDED  
FERMENTATION RESIDUE AND USING TWO-STAGE ANAEROBIC  
PROCESS UNDER THERMOPHILIC TEMPERATURE**

Patcharee Intanoo

A Dissertation Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy  
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University  
in Academic Partnership with  
The University of Michigan, The University of Oklahoma,  
Case Western Reserve University, and Institut Français du Pétrole  
2014

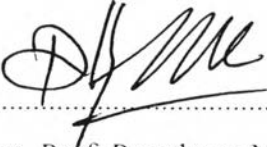
**Thesis Title:** Improvement of Hydrogen Production with Added  
Fermentation Residue and Using Two-stage Anaerobic  
Process under Thermophilic Temperature  
**By:** Patcharee Intanoo  
**Program:** Petrochemical Technology  
**Thesis Advisors:** Prof. Sumaeth Chavadej

---

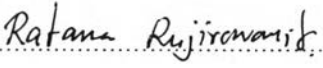
Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn  
University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of  
Philosophy.

  
..... College Dean  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

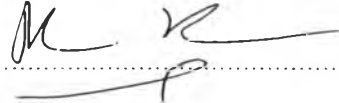
**Thesis Committee:**

  
.....  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

  
.....  
(Prof. Sumaeth Chavadej)

  
.....  
(Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit)

  
.....  
(Asst. Prof. Kitipat Siemanond)

  
.....  
(Prof. Damrong Khummongkol)

## ABSTRACT

5391002063: Petrochemical Technology Program  
Patcharee Intanoo: Improvement of Hydrogen Production with  
Added Fermentation Residue and Using Two-stage Anaerobic  
Process under Thermophilic Temperature  
Thesis Advisors: Prof. Sumaeth Chavadej 138 pp.  
Keywords: Hydrogen/Methane / Anaerobic fermentation/ Thermophilic  
temperature/Nitrogen and phosphorous uptakes

The two main objectives of this study were to maximize hydrogen production from alcohol wastewater with added fermentation residue and to optimize the separate production of hydrogen and methane from cassava wastewater using high rate anaerobic processes under thermophilic temperature. For the first part, hydrogen production from alcohol wastewater was investigated using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) operated at 55 °C and pH 5.5. Under an optimum COD loading rate of 68 kg/m<sup>3</sup>d, the ASBR provided the highest hydrogen production performance in terms of the highest H<sub>2</sub> content of 43 %, the highest hydrogen yield of 30 L/kg COD applied (or 130 l/kg COD removal) and the highest specific hydrogen production rate of (SHPR) of 2.1 L/L d (or 560 L/kg MLSS d). For the second part, the ASBR unit was operated at the optimum COD loading rate of 68 kg/m<sup>3</sup>d of the alcohol wastewater at different concentrations of added fermentation residue under pH 5.5 and 55 °C. At an optimum concentration of added fermentation residue of 1,000 mg/L (as dried weight), the hydrogen production performance increased about 10 % as compared to the system without added fermentation residue. Under the optimum conditions, only cellulose (41.6 %) and hemicellulose (21.8 %) were broken down while lignin was not digested. For the third part, both production of hydrogen and methane from cassava wastewater was investigated using a two-stage upflow anaerobic sludge blanket (UASB) system operated at 55 °C for both UASB units while only the pH in the hydrogen UASB unit was maintained at 5.5. The recycle ratio of the effluent from the methane bioreactor-to-the feed flow rate

was fixed at 1:1. When the system was operated under an optimum COD loading rate of  $90 \text{ kg/m}^3\text{d}$  based on the feed COD and the hydrogen UASB volume or  $15 \text{ kg/m}^3\text{d}$  based on the feed COD and the methane UASB volume, the hydrogen UASB unit provided the a highest hydrogen yield and specific hydrogen production rate of  $90.5 \text{ L H}_2/\text{kg COD removed}$  and  $520 \text{ L H}_2/\text{m}^3\text{d}$ , respectively. At the same optimum COD loading rate, the methane UASB unit provided a maximum methane yield and specific methane production rate of  $540 \text{ L CH}_4/\text{kg COD removed}$  and  $650 \text{ L /m}^3\text{d}$ , respectively.

For all studied bioreactors, both nitrogen and phosphate uptakes were maximal at the optimum conditions for hydrogen and methane production and no significantly different in both hydrogen and methane production units. Most nitrogen uptake was derived from organic nitrogen. The toxic levels of total volatile organic acids (VFA) to hydrogen-producing bacteria and methane-producing bacteria were  $10,000$  and  $400 \text{ mg/L}$  as acetic acid, respectively.

## บทคัดย่อ

พัชร อินธนู : การปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยการเติมกากจากการหมัก และการใช้ถังปฏิกรณ์ยูเอเอสบีแบบสองขั้นตอนภายใต้การหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนที่อุณหภูมิสูง (Improvement of Hydrogen Production with Added Fermentation Residue and Using Two-stage Anaerobic Process under Thermophilic Temperature) อ. ที่ปรึกษา: ศ.ดร. สุเมธ ชวเดช 138 หน้า

วัตถุประสงค์หลักสองประการของงานวิจัยนี้ คือ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในปริมาณที่มากที่สุดจากน้ำเสียแอลกอฮอล์ที่มีการเติมกากจากการหมักและให้มีการผลิตสูงสุดสำหรับก๊าซไฮโดรเจนและมีเทนจากน้ำเสียแป้งมันสำปะหลัง โดยการใช้กระบวนการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนประสิทธิภาพสูงสุดสองขั้นตอนภายใต้อุณหภูมิสูง โดยในส่วนของงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาของการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากน้ำเสียแอลกอฮอล์โดยการใช้ถังปฏิกรณ์แบบเอเอสบีอาร์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 5.5 ภายใต้อัตราการป้อนสารอินทรีย์ที่เหมาะสมที่ 68 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน พบว่า ระบบให้ประสิทธิภาพในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนสูงที่สุด คือ องค์กรประกอบของก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 43 เปอร์เซ็นต์ ผลได้ของก๊าซไฮโดรเจนเท่ากับ 30 ลิตรต่อกิโลกรัมของสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้า (หรือ 130 ลิตรต่อกิโลกรัมของสารอินทรีย์ที่ถูกกำจัด) และอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจำเพาะ 2.1 ลิตรต่อลิตรถึงปฏิกรณ์ต่อวัน (หรือ 560 ลิตรต่อกิโลกรัมของเชื้อต่อวัน) โดยในส่วนของงานวิจัยนี้ ถังปฏิกรณ์แบบเอเอสบีอาร์อยู่ภายใต้สภาวะของอัตราการป้อนสารอินทรีย์ที่ 68 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน ของน้ำเสียผลิตแอลกอฮอล์ ที่มีการเติมกากจากการหมักที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 5.5 พบว่า ภายใต้ปริมาณกากจากการหมักที่เหมาะสม 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับน้ำเสียที่ไม่ได้เติมกากจากการหมัก ภายใต้สภาวะนี้มีเพียงแค่เซลล์ลูโลส (41.6 เปอร์เซ็นต์) และเฮมิเซลล์ลูโลส (21.8 เปอร์เซ็นต์) ที่ถูกย่อยในระบบได้แต่ไม่สามารถย่อยสลายลิกนิน ในส่วนที่สามของงานวิจัยนี้ ได้มีการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิต

ก๊าซไฮโดรเจนและมีเทนจากน้ำเสียเป้งมันสำปะหลัง โดยการใช้ถังปฏิกรณ์แบบยูเอสบี และควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสทั้งระบบ มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 5.5 ที่ถังผลิตก๊าซไฮโดรเจนเท่านั้น อัตราการป้อนกลับของน้ำเสียจากถังผลิตมีเทนไปยังถังผลิตไฮโดรเจนถูกกำหนดที่ 1:1 พบว่าเมื่ออัตราการป้อนสารอินทรีย์ที่ 90 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวันของถังผลิตไฮโดรเจนหรืออัตราการป้อนสารอินทรีย์ที่ 15 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวันของถังผลิตมีเทน การผลิตไฮโดรเจนในหน่วยผลิตไฮโดรเจนนั้นสามารถผลิตสูงสุดที่สุด คือ ผลได้ของก๊าซไฮโดรเจนที่สูงที่สุด (90.48 ลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อกิโลกรัมของสารอินทรีย์ที่ถูกกำจัด) และอัตราการผลิตแก๊สไฮโดรเจนจำเพาะที่สูงที่สุด (520 ลิตรของก๊าซไฮโดรเจนต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน) สำหรับหน่วยผลิตมีเทนนั้น สามารถผลิตก๊าซมีเทนได้มากที่สุด คือ ผลได้ของแก๊สมีเทนที่สูงที่สุด (540 ลิตรของก๊าซมีเทนต่อกิโลกรัมของสารอินทรีย์ที่ถูกกำจัด) และอัตราการผลิตมีเทนจำเพาะที่สูงที่สุด (650 ลิตรของก๊าซมีเทนต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน) สำหรับงานวิจัยทั้งหมดนี้ เชื้อจุลินทรีย์มีการใช้สารอาหาร (ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส) ในปริมาณที่มากที่สุดที่อัตราการป้อนสารอินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและมีเทน ซึ่งอยู่ในรูปของออกแกนิคไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในปริมาณ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลเสียต่อเชื้อที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนและมีเทน ตามลำดับ รวมไปถึงปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ไม่ส่งผลเสียต่อเชื้อจุลินทรีย์ในระบบอีกด้วย

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her deepest appreciation to Professor Sumaeth Chavadej, as a major advisor, who gave her opportunity to study Ph.D. and invaluable advices, encouraged, took care, and supported her in everything throughout her work with knowledge, patience, and kindness. The author would also like to thank Professor Erdogen Gulari, as a co-advisor, for the suggestion, support, and help throughout her work.

The author would like to acknowledge all PPC faculty for their academic and technical supports, especially, Professor Suwabun Charachanchai for his kind support on technical apparatus.

The author would like to give special thanks to Assistant Professor Pomthong Malakul, Associate Professor Ratana Rujiravanit, Assistant Professor Kitipat Siemanond, and Professor Damrong Khummongkol for kindly being her dissertation committee members.

The author is grateful for the scholarship and funding of the thesis work provided by The Higher Education Commission, The ministry of Education through the Center of Excellence on Petrochemical and Materials Technology.

The author would like to give special thanks to all PPC research staff and technicians for help and advice for all technical instruments.

The author also appreciated to everyone who was an important part of her successful dissertation, as well as expressing her apology to whom she could not mention personally one by one.

Finally, the author intended the deepest appreciation to her family (father, mother, and elder sister) who are the most important part of her life, for their support, love, help, encouragement, and everything, whenever she fell down or fell happy.

## TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	v
Acknowledgement	vii
Table of Contents	viii
List of Tables	xii
List of Figures	xiv
<b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>II LITERATURE REVIEW</b>	<b>3</b>
2.1 Background of Hydrogen	3
2.1.1 Advantage of Hydrogen	3
2.1.2 Hydrogen Production Process	4
2.2 Ethanol Production in Thailand	8
2.3 Ethanol Wastewater	8
2.4 Wastewater Treatment	9
2.4.1 Fundamental of Wastewater Treatment	10
2.4.2 Industrial Wastewater Treatment	13
2.4.3 Parameters Used in Wastewater Treatment	15
2.5 Review of Anaerobic Fermentation Process	18
2.5.1 Fundamental of Anaerobic Fermentation Process	18
2.5.2 Characteristics of Wastewater	19
2.5.3 Types of Anaerobic Treatment Processes	20
2.6 Bio-ethanol Production	27
2.6.1 Bio-ethanol Feedstock	27
2.6.2 Bio-ethanol Production	28



<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
2.7 Alcohol Distillation Process	31
2.8 Points of Study	32
<b>III EXPERIMENTAL</b>	<b>33</b>
3.1 Materials	33
3.2 Equipment	35
3.3 Methodology	37
3.3.1 Seed Sludge Preparation	37
3.4.2 Substrate Preparation	38
3.4.3 Bioreactor Design and Operation	38
3.4 Analytical Methods	41
3.4.1 Total Suspended Solids (TSS) Analysis	41
3.4.2 Volatile Suspended Solids (VSS) Analysis	42
3.4.3 COD Analysis (Closed Reflux, Colorimetric Method)	43
3.4.4 Total VFA Analysis	44
3.4.5 VFA Composition Analysis	44
3.4.6 Phosphorous Analysis	44
3.4.7 Nitrogen Analysis	44
3.4.8 Gas Composition Analysis	44
3.4.9 Preparation of Residue and Composition Analysis	45
3.4.10 Microbial Concentration (MLVSS)	46
3.4.11 Microbial Washout (Effluent VSS)	46
<b>IV HYDROGEN PRODUCTION FROM ALCOHOL WASTEWATER BY AN ANAEROBIC SEQUENCING BATCH REACTOR UNDER THERMOPHILIC OPERATION: NITROGEN AND PHOSPHOROUS UPTAKES AND TRANSFORMATION</b>	<b>48</b>
4.1 Abstract	48

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
4.2 Introduction	48
4.3 Materials and Methods	50
4.4 Results and Discussion	54
4.5 Conclusions	64
4.6 Acknowledgements	64
4.7 References	64
<b>V</b>	
<b>HYDROGEN PRODUCTION FROM ALCOHOL WASTEWATER WITH ADDED FERMENTATION RESIDUE BY AN ANAEROBIC SEQUENCING BATCH REACTOR(ASBR) UNDER THERMOPHILIC OPERATION</b>	69
5.1 Abstract	69
5.2 Introduction	69
5.3 Materials and Methods	72
5.4 Results and Discussion	76
5.5 Conclusions	88
5.6 Acknowledgements	90
5.7 References	90
<b>VI</b>	
<b>OPTIMIZATION OF HYDROGEN AND METHANE FROM CASSAVA WASTEWATER USING TWO STAGE UPFLOW ANAEROBIC SLUDGE BLANKET REACTOR (UASB) UNDER THERMOPHILIC OPERATION</b>	95
6.1 Abstract	95
6.2 Introduction	96
6.3 Materials and Methods	97
6.4 Results and Discussion	100
6.5 Conclusions	110
6.6 Acknowledgements	115
6.7 References	115

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
<b>VII CONCLUSION AND RECOMMENDATION</b>	119
<b>REFERENCES</b>	121
<b>APPENDICES</b>	124
<b>Appendix A</b> Calibration Curves	121
<b>Appendix B</b> Preparation of 5 wt./vol.% NaOH Solution for pH-controlled System	134
<b>Appendix C</b> Volatile Fatty Acids (VFA) Quantification by Distillation Method	135
<b>CURRICULUM VITAE</b>	137

## LIST OF TABLES

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
<b>CHAPTER II</b>		
2.1	Comparison of aerobic and anaerobic biological wastewater treatments	15
2.2	Typical organic loading rates for anaerobic suspended growth processes at 30 °C	21
<b>CHAPTER III</b>		
3.1	Characteristics of the studied alcohol wastewater	33
3.2	Characteristics of the studied alcohol wastewater	34
3.3	Characteristics of the studied cassava wastewater	34
3.4	Operation conditions for the ASBR system at 6 cycles per day	39
3.5	Operation conditions for the ASBR system at 6 cycles per day	40
<b>CHAPTER IV</b>		
4.1	Characteristics of the alcohol wastewater samples	52
4.2	Operating conditions for the ASBR process at different COD loading rates	53
4.3	Comparison between thermophilic and mesophilic process for hydrogen production performance at optimum conditions	63
<b>CHAPTER V</b>		
5.1	Characteristics of the ethanol wastewater sample	77
<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>

5.2	Elemental and chemical compositions of the studied fermentation residue	78
5.3	Comparison of the digestibility of various lignocellulosic materials under various conditions	89

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
<b>CHAPTER II</b>	
2.1	Flow diagram of ethanol production process at Saphip Lopburi Co., Ltd.
	9
2.2	Wastewater treatment process
	10
2.3	Overall process of anaerobic decomposition of organic matter (Zehnder, 1982)
	18
2.4	Anaerobic suspended growth processes: (a) complete-mix process, (b) anaerobic contact process, and (c) anaerobic sequencing batch reactor process
	22
2.5	Schematic of the UASB process and some modifications: (a) original UASB process, (b) UASB reactor with sedimentation tank and sludge recycle, and (c) UASB reactor with internal packing for fixed-film attached growth, placed above the sludge blanket
	23
2.6	Schematic of alternative sludge blanket processes: (a) anaerobic baffled reactor (ABR) and (b) anaerobic migrating blanket reactor (AMBR)
	24
2.7	Upflow anaerobic attached growth treatment reactors: (a) anaerobic upflow packed-bed reactor, (b) anaerobic expanded-bed reactor, and (c) anaerobic fluidized-bed reactor
	26
2.8	Downflow attached growth anaerobic treatment reactor
	27
2.9	Flow chart for the production of bio-ethanol from lignocellulosic
	29
2.10	Ethanol production from molasses biomass (Balat and Balat, 2009)
	30
2.11	Alcohol distillation process
	32

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
<b>CHAPTER III</b>	
3.1 Time-controlling system	35
3.2 Temperature-controlling system installed at a cover of reactor	36
3.3 pH sensor installed at a cover of reactor	36
3.4 Wet gas meter	37
3.5 Schematic of the studied ASBR process	38
3.6 Schematic of the studied two-stage UASB process	41
3.7 (a) glass-fiber filter disk and (b) filtration apparatus	42
3.8 (a) COD reactor and (b) spectrophotometer	43
3.9 Hydrogen and methane production in various processes used in this study	47
<b>CHAPTER IV</b>	
4.1 Effects of COD loading rate on (a) COD removal and gas production rate, (b) gas composition and hydrogen production rate, (c) specific hydrogen production rates and (d) hydrogen yield at pH 5.5 and 55 °C	56
4.2 Total VFA, VFA composition and ethanol concentration versus COD loading rate at 55°C and pH 5.5	58
4.3 MLVSS and effluent VSS versus COD loading rate at 55°C and pH 5.5	59
4.4 Nitrogen and phosphorous removal (a), and total nitrogen, organic nitrogen and inorganic nitrogen concentration (b) in the system as a function of COD loading rate at 55°C and pH 5.5	61

FIGURE	PAGE
<b>CHAPTER V</b>	
5.1 Effect of fermentation residue concentration on (a) COD removal and gas production rate, (b) gas composition and hydrogen production rate, (c) specific hydrogen production rates and (d) hydrogen yields when the ASBR system was operated with the ethanol wastewater at constant COD loading rate of 50.6 kg/m <sup>3</sup> d, pH 5.5, and 55 °C	80
5.2 Total VFA, VFA composition and ethanol concentration at different fermentation residue concentrations when the ASBR system was operated with the ethanol wastewater at a constant COD loading rate of 50.6 kg/m <sup>3</sup> d, 55 °C, and pH 5.5	82
5.3 Effect of fermentation residue concentration on (a) bacteria concentration in ASBR, fermentation residue in ASBR (mg/l dried weight), MLVSS and MLSS and (b) bacteria concentration washout from ASBR, fermentation residue washout from ASBR (mg/l dried weight), effluent VSS and effluent SS when the ASBR system was operated with the ethanol wastewater at a constant COD loading rate of 50.6 kg/m <sup>3</sup> d, 55 °C, and pH 5.5	84
5.4 Effect of fermentation residue concentration on (a) nitrogen and phosphorous uptakes and (b) total nitrogen, organic nitrogen and inorganic nitrogen concentrations when the ASBR system was operated with the ethanol wastewater at a constant COD loading rate of 50.6 kg/m <sup>3</sup> d, 55 °C, and pH 5.5	86
5.5 Digestibility of fermentation residue and microbial concentration in relation to the fermentation residue concentration when the ASBR system was operated with the ethanol wastewater at a constant COD loading rate of 50.6 kg/m <sup>3</sup> d, 55 °C, and pH 5.5	87



<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
<b>CHAPTER VI</b>	
6.1 The schematic of the two-stage Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor (UASB) unit	99
6.2 Effects of COD loading rate on (a) COD removal and gas production rate, (b) gas composition and hydrogen production rate, (c) specific hydrogen production rates, (d) hydrogen yield of the hydrogen UASB unit and (f) pH and alkalinity	104
6.3 Total VFA, and VFA composition versus COD loading rate of the hydrogen UASB unit.	105
6.4 Effects of COD loading rate on (a) COD removal and gas production rate, (b) gas composition and methane production rate, (c) specific methane production rates, (d) methane yield of the methane UASB unit and (f) and alkalinity	111
6.5 Total VFA, and VFA composition versus COD loading rate of the methane UASB unit	112
6.6 MLVSS and effluent VSS versus COD loading rate (a) for the hydrogen UASB unit, (b) for the methane UASB unit	112
6.7 Effects of COD loading rate on (a) nitrogen and phosphorous removal of the hydrogen UASB unit. (b) total nitrogen, organic nitrogen and inorganic nitrogen concentrations of the hydrogen UASB unit, (c) nitrogen and phosphorous removal of the methane UASB unit and (d) total nitrogen, organic nitrogen and inorganic nitrogen concentrations of the methane UASB unit	113
6.8 Overall performance of two-stage UASB process at 55 °C	114