

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E41052



BIO-HYDROGEN PRODUCTION FROM SWEET  
SORGHUM SYRUP AND A UTILIZATION  
OF HYDROGENOGENIC EFFLUENT  
FOR PHA<sub>s</sub> PRODUCTION

MS. PIYAWADEE SARAPHIROM

A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
KHON KAEN UNIVERSITY

2011



**BIO-HYDROGEN PRODUCTION FROM SWEET  
SORGHUM SYRUP AND A UTILIZATION  
OF HYDROGENOGENIC EFFLUENT  
FOR PHAs PRODUCTION**

**MS. PIYAWADEE SARAPHIROM**



**A THESIS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY**

**KHON KAEN UNIVERSITY**

**2011**

**BIO-HYDROGEN PRODUCTION FROM SWEET  
SORGHUM SYRUP AND A UTILIZATION  
OF HYDROGENOGENIC EFFLUENT  
FOR PHAs PRODUCTION**

**MS. PIYAWADEE SARAPHIROM**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE  
REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN BIOTECHNOLOGY  
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

**2011**



**THESIS APPROVAL**  
**KHON KAEN UNIVERSITY**  
**FOR**  
**DOCTOR OF PHILOSOPHY**  
**IN BIOTECHNOLOGY**

**Thesis Title:** Bio-Hydrogen Production from Sweet Sorghum Syrup and a Utilization of Hydrogenogenic Effluent for PHAs Production


**Author:** Ms. Piyawadee Saraphirom


**Thesis Examination Committee:**

Professor Dr. Tsuyoshi Imai	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Pattana Laopaiboon	Member
Dr. Khanitta Moosopin	Member
Dr. Sompong O-Thong	Member
Dr. Prawit Kongjan	Member

**Thesis Advisors:**

  
..... Advisor  
(Assoc. Prof. Dr. Alissara Reungsang)

  
.....  
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)  
Dean, Graduate School

  
.....  
(Asst. Prof. Dr. Kasem Nantachai)  
Dean, Faculty of Technology

ปิยะวดี สราภิรมย์. 2555. การผลิตไฮโดรเจนโดยชีววิธีจากน้ำเค็มข้าวฟ่างหวานและการใช้ประโยชน์จาก  
น้ำเหลือทิ้งในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต. วิทยานิพนธ์  
ปริญญาคุษภีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. อติศรา เรืองแสง

### บทคัดย่อ

**E41052**  
งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อผลิตไฮโดรเจนจากน้ำเค็มข้าวฟ่างหวาน โดยกลุ่ม  
จุลินทรีย์ผสมแบบไร้อากาศ และเพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากน้ำเค็มข้าวฟ่างหวานอย่างสูงสุด  
จึงใช้น้ำหมักที่เหลือจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต  
(Polyhydroxyalkanoates; PHAs) การทดลองได้ถูกแบ่งออกเป็น 6 ส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษา  
ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำเค็มข้าวฟ่างหวาน โดยกลุ่ม  
จุลินทรีย์ผสมแบบไร้อากาศ ในกระบวนการหมักแบบกะ โดยใช้เทคนิคพื้นผิวการตอบสนอง  
(Response Surface Methodology; RSM) แบบ Box-Behnken design เพื่อออกแบบการทดลอง ผล  
การศึกษาพบว่า สภาวะเหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนที่ได้คือ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในน้ำ  
เค็มข้าวฟ่างหวาน เท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 4.75 และความ  
เข้มข้นไอออน (II) ซัลเฟต เท่ากับ 1.45 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ผลได้ไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 2.22 โมล  
ไฮโดรเจนต่อโมลเฮกโซส โดยสภาวะที่เหมาะสมนี้ได้ถูกนำไปใช้เป็นตัวตั้งต้นในการศึกษาขั้น  
ต่อไป การทดลองส่วนที่สองเป็นการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบสลับ  
เป็นกะ (Anaerobic Sequencing Batch Reactor; ASBR) ซึ่งออกแบบให้มีการแปรผันระยะเวลาการ  
กักเก็บ (Hydraulic Retention Time; HRT) ที่ 4 ระดับ คือ 96, 48, 24 และ 12 ชั่วโมง โดยในแต่ละ  
รอบของ ASBR ประกอบด้วย ช่วงเติม 20 นาที ช่วงตกตะกอน 20 นาที ช่วงระบายส่วนใส 20 นาที  
และช่วงทำปฏิกิริยาแปรผันตาม HRT ผลการศึกษาพบว่า HRT ที่เหมาะสมคือ 24 ชั่วโมง มีผลได้  
ไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.68 โมลไฮโดรเจนต่อโมลเฮกโซส ซึ่ง HRT ที่เหมาะสมนี้นำไปใช้เป็น  
HRT ตั้งต้นในการทดลองส่วนที่ 3 คือ การศึกษาภาระบรรทุกอินทรีย์สาร (Organic Loading Rate;  
OLR) ที่เหมาะสมในการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่องใน ASBR ซึ่งพบว่า OLR ที่เหมาะสมคือ 30  
กรัมเฮกโซสต่อลิตรต่อวัน เกิดผลได้ไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.53 โมลไฮโดรเจนต่อโมลเฮกโซส  
การทดลองส่วนที่ 4 เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีต่อการผลิตไฮโดรเจน  
อย่างต่อเนื่องภายใต้สภาวะคงที่จาก HRT และ OLR ที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE ผล

**E41052**

การศึกษาพบว่า กลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตไฮโดรเจน (Hydrogen Producer) ได้แก่ *Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum* และ *C. proteolyticum* และยังพบกลุ่มจุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria; LAB) ได้แก่ *Sporolactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ได้ผลได้ไฮโดรเจนในระดับที่ต่ำ เนื่องจากกลุ่มจุลินทรีย์ LAB นี้สามารถปลดปล่อย Bacteriocins และกรดแลคติก ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญและกิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตไฮโดรเจน จากสาเหตุดังกล่าวนี้ทำให้ผู้วิจัยได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องใน ASBR โดยเติมสารอาหารสูตรคัดแปลง Endo nutrient และสารละลายวิตามินสูตรคัดแปลงจาก Su และคณะ (2552) ในน้ำเคี้ยวข้าวฟ่างหวาน ผลการศึกษาพบว่า การเติมสารอาหารสูตร Endo และสารละลายวิตามินสูตรคัดแปลงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจน ทำให้ได้ผลได้ไฮโดรเจนสูงสุดเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า (1.60 โมลไฮโดรเจนต่อโมลเฮกโซส) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0.34 โมลไฮโดรเจนต่อโมลเฮกโซส) ซึ่งไม่มีการเติมสารอาหารและวิตามิน ในกระบวนการผลิตไฮโดรเจนอย่างต่อเนื่อง พบว่าก่อให้เกิดน้ำเสียอินทรีย์จำนวนมาก โดยน้ำเสียอินทรีย์ดังกล่าวมีองค์ประกอบหลักคือ น้ำตาลที่เหลือจากการใช้ไปเพื่อผลิตไฮโดรเจนและกรดอินทรีย์ระเหย เช่น กรดอะซิติก และกรดบิวทีริก ที่เป็นสารมัธยันต์ในกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ ซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวสามารถเป็นสับสเตรทเพื่อผลิต PHAs ได้ ดังนั้น การทดลองส่วนสุดท้ายจึงเป็นการใช้ประโยชน์จากน้ำเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจน (Hydrogenogenic Effluent) ในการผลิต PHAs โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cupriavidus* sp. KKU38 ผลการศึกษาพบว่าน้ำเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนมีศักยภาพเพียงพอในการใช้เป็นสับสเตรทเพื่อผลิต PHAs โดยมีผลได้สูงสุดเท่ากับ 0.10 กรัมต่อกรัมชีโอดีที่ใช้ไป PHAs ที่ได้มีองค์ประกอบภายในเซลล์สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 71.42 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้การใช้ประโยชน์จากน้ำเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไฮโดรเจนเพื่อผลิต PHAs ดังกล่าวยังสามารถลดค่าชีโอดีในน้ำเสียได้สูงสุดร้อยละ 82.73 ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำเคี้ยวข้าวฟ่างหวานสามารถนำมาผลิตไฮโดรเจนและ PHAs ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Piyawadee Saraphirom. 2011. *Bio-Hydrogen Production from Sweet Sorghum Syrup and a Utilization of Hydrogenogenic Effluent for PHAs Production.*

Doctor of Philosophy Thesis in Biotechnology, Graduate School, Khon Kaen University.

**Thesis Advisor:** Assoc.Prof. Dr. Alissara Reungsang

## ABSTRACT

**E**41052

The ultimate goal of this study was to produce hydrogen from sweet sorghum syrup by anaerobic mixed culture. In order to implement the total use of sweet sorghum syrup, the resulting effluent from hydrogen fermentation process was used to produce polyhydroxylalkanoates (PHAs). In order to achieve the goal, we divided the research into 6 parts. First, the environmental parameters for bio-hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures in batch fermentation were optimized using response surface methodology with Box-Behnken design. Results indicated that the optimum condition for bio-hydrogen production from sweet sorghum by mixed cultures were 25 g/L total sugar, 4.75 initial pH and 1.45 g/L FeSO<sub>4</sub> in which the maximum hydrogen yield (HY) of 2.22 mol H<sub>2</sub>/mol hexose was obtained. The optimum condition obtained was used in further experiment, Experiment 2, to continuously produce hydrogen in anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). The ASBR was conducted with different hydraulic retention time (HRT) of 96, 48, 24 and 12 hr and cycle periods consisting of filling (20 min), settling (20 min), and decanting (20 min) phases. Results revealed that HRT of 24 hr was optimal for ASBR operation indicated by the maximum HY of 0.68 mol H<sub>2</sub>/mol hexose. The optimum HRT was used in the next experiment to optimize organic loading rate (OLR) which was found to be 30 g hexose/L-d. At the optimum OLR, the maximum HY of 0.53 mol H<sub>2</sub>/mol hexose was obtained. The microbial community at a steady state of optimum HRT and OLR were analyzed by PCR-DGGE. Dominant hydrogen producers were *Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum* and *C. proteolyticum*. The present of lactic acid bacteria such as *Sporolactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Lactococcus* sp. and *Lactobacillus* sp. might be responsible for a low HY obtained. These microorganisms could excrete the

**E 41052**

bacteriocins and lactic acid causing the adverse effect on hydrogen producers. Since the HY obtained at optimal HRT and OLR were very low, therefore we tried to increase HY by supplement with nutrient and vitamin solutions. It was found that the addition of nutrient and vitamin solutions can increase HY up to approximately 5 times (HY of 1.6 mol H<sub>2</sub>/mol hexose) in comparison to control (without nutrient and vitamin solutions). Throughout the successful process of hydrogen production, large amounts of organic wastewater were generated. It contained residual organic matter such as butyric and acetic acids and residual sugars that can be used as the substrate to produce PHAs. Therefore, the effluent was used to produce PHAs by *Cupriavidus* sp. KKU38. Results revealed that hydrogenogenic effluent was a potential substrate for PHAs production with the maximum PHAs concentration and content of 0.10 g/g COD consumed and 71.42% (w/w), respectively. In addition, COD in the effluent was reduced up to 82.73%. Results from this study demonstrated that sweet sorghum syrup can be used to produce hydrogen and PHAs successfully.

**Goodness of the thesis is dedicated to my beloved grandfather and grandmother**

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Alissara Reungsang for her kindness and to provide an opportunity to be her advisee. I am also grateful for her valuable supervision, valuable suggestions, all kinds of supports, encouragement, guidance and criticism throughout the course of my study.

My greatest appreciation and sincere gratitude are also addressed to my graduate committees, Professor Dr. Tsuyoshi Imai, Associate Professor Dr. Pattana Laopaiboon, Dr. Khanittha Moosophon Dr. Sompong O-Thong and Dr. Prawit Kongjun for their helpful suggestions and criticisms.

I would like to thank the Office of the Higher Education Commission, Thailand, for supporting P.S. by grant funded under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Joint Ph.D. Program Thai Doctoral degree. Research fund was gratefully received from the Research Group for Development of Hydrogen Production Process from Biomass by Microorganisms, and the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Biofuels Research Cluster of Khon Kaen University.

Appreciation is also expressed to all staff and members of the Biotechnology Department for their practical helps, providing the wonderful environment and friendship during the time of this study. My special additional thanks are also to Dr. Pensri Plangklang, Dr. Mullika Teerakun, Dr. Preeya Keawnaree, Mr. Chakkrit Sreela-or, Mr. Sontaya Khamtib, Ms. Nathaporn Poomipuk, Ms. Arunsri Fangkum, Paw, Wai, Fair, Kik, Ploy and AR's team for everything their helps and the good friendship during the time of my study.

Finally, I would like to express my sincere gratitude and appreciation to dear parents, Best, P'Kob and N'Picha for their love, pushing up, cheerfulness, devoting and encouragement throughout my life.

Piyawadee Saraphirom

## TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xiv
LIST OF ABBREVIATIONS	xviii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Rationale and Background	1
1.2 Thesis Objectives	6
1.3 Research Plan	7
1.4 Thesis Structure	8
1.5 Research Sites	8
1.6 Research Funds	9
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	11
2.1 Hydrogen properties and its use	11
2.2 Hydrogen production	13
2.3 Application of molecular techniques on hydrogen production research	37
2.4 Sweet sorghum	50
2.5 Hydrogen production from sweet sorghum	52
2.6 Experimental design methods for biohydrogen production	53
2.7 Anaerobic sequencing batch reactor	62
2.8 Hydrogen production using ASBR	63
2.9 Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater	65

## TABLE OF CONTENTS (Cont.)

		Page
CHAPTER III	OPTIMIZATION OF BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM SWEET SORGHUM SYRUP USING STATISTICAL METHODS	67
3.1	Introduction	67
3.2	Materials and methods	69
3.3	Results and discussion	75
3.4	Conclusions	83
3.5	References	84
CHAPTER IV	OPTIMIZATION OF HYDRAULIC RETENTION TIME AND MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS OF HYDROGEN PRODUCTION FROM SWEET SORGHUM SYRUP IN AN ANAEROBIC SEQUENCING BATCH REACTOR	91
4.1	Introduction	91
4.2	Materials and methods	92
4.3	Results and discussion	96
4.4	Conclusions	104
4.5	References	105
CHAPTER V	BIOLOGICAL HYDROGEN PRODUCTION FROM SWEET SORGHUM SYRUP BY MIXED CULTURES USING AN ANAEROBIC SEQUENCING BATCH REACTOR (ASBR)	100
5.1	Introduction	100
5.2	Materials and methods	110
5.3	Results and discussion	115
5.4	Conclusions	123
5.5	References	123

## TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER VI EFFECT OF ORGANIC LOADING RATE ON BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM SWEET SORGHUM SYRUP BY ANAEROBIC MIXED CULTURES IN ANAEROBIC SEQUENCING BATCH REACTOR	129
6.1 Introduction	129
6.2 Materials and methods	130
6.3 Results and discussion	135
6.4 Conclusions	141
6.5 References	141
CHAPTER VII ENHANCEMENT OF BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM SWEET SORGHUM SYRUP BY ANAEROBIC SEED SLUDGE IN ANAEROBIC SEQUENCING BATCH REACTOR BY NUTRIENT AND VITAMIN SUPPLEMENTATIONS	147
7.1 Introduction	147
7.2 Materials and methods	149
7.3 Results and discussion	154
7.4 Conclusions	163
7.5 References	164
CHAPTER VIII POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCTION FROM HYDROGENOGENIC EFFLUENT BY <i>Cupriavidus</i> sp. KKU38	171
8.1 Introduction	171
8.2 Materials and methods	172
8.3 Results and discussion	176
8.4 Conclusions	184
8.5 References	184

**TABLE OF CONTENTS (Cont.)**

	Page
CHAPTER IX CONCLUSIONS	189
REFERENCES	191
APPENDIX	221
VITAE	227

## LIST OF TABLES

	Page
CHAPTER II	
Table 2.1 The physical properties of hydrogen	11
Table 2.2 Comparison of important biological hydrogen production Processes	18
Table 2.3 The effect of initial pH on batch fermentative hydrogen production	26
Table 2.4 Hydrogen production by hydrogen-producing bacteria with different substrate.	27
Table 2.5 The effect of nitrogen concentration on batch fermentative hydrogen production.	32
Table 2.6 The effect of C/N and C/P on batch fermentative hydrogen production	34
Table 2.7 The pure bacterial cultures for fermentative hydrogen production	34
Table 2.8 The comparison of various pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed culture inoculum	35
Table 2.9 The comparison of sugarcane and sweet sorghum	51
Table 2.10 Nutrient composition in sweet sorghum juice	52
Table 2.11 Advantage and disadvantages in ASBR process	63
Table 2.12 Comparison on hydrogen production using ASBR operation	64
CHAPTER III	
Table 1 Level of variables, estimated effect, regression coefficient and corresponding F and P values for $P_s$ in Plackett-Burman design	73
Table 2 Plackett-Burman experimental design matrix for evaluating factors influencing $P_s$ from sweet sorghum syrup by mixed cultures	73
Table 3 The Box-Behnken experimental design with three independent variables	75

## LIST OF TABLES

	Page
Table 4	76
Table 5	81
Table 6	82
Table 7	82
 CHAPTER IV	
Table 1	95
Table 2	102
Table 3	103
 CHAPTER V	
Table 1	112
Table 2	114
Table 3	118
Table 4	119
Table 5	122

## LIST OF TABLES (Cont.)

		Page
CHAPTER VI		
Table 1	Summary of hydrogen production at steady state of different OLRs	137
Table 2	Affiliation of DGGE analysis for microbial community and soluble metabolite products from different OLRs	140
CHAPTER VII		
Table 1	Sweet sorghum syrup compositions	150
Table 2	Experimental set up	152
Table 3	Summary of continuous biohydrogen production performance using different improvement methods	156
Table 4	Comparison of continuous biohydrogen production using different improvement methods	158
Table 5	Soluble metabolite production under different nutrient and vitamin supplementations	159
CHAPTER VIII		
Table 1	The compositions of modified Endo nutrient and vitamin solution stocks	174
Table 2	Compositions of hydrogenogenic effluent	177
Table 3	Performance of PHAs production in treatment with <i>Cupriavidus</i> sp. KKU38 and control	183
Table 4	Performance of PHAs production from hydrogenogenic effluent by <i>Cupriavidus</i> sp. KKU38 in comparison to the other published researches	183

## LIST OF FIGURES

	Page
CHAPTER I	
Figure 1.1 Flow diagram of research planning for biohydrogen production from sweet sorghum syrup by anaerobic mixed culture	7
CHAPTER II	
Figure 2.1 The working of hydrogen fuel cell	13
Figure 2.2 Hydrogen-producing speed response curve vs temperature rise and temperature drop (sugar as substrate). Rotating speed: 220 r/min; organic volume load: 41.2 kgCOD/m <sup>3</sup> -d	23
Figure 2.3 Effect of temperature on hydrogen-producing speed	24
Figure 2.4 Sweet sorghum morphology (a) sweet sorghum stalk, (b) sweet sorghum seeds	50
Figure 2.5 Sweet sorghum extract (a) sweet sorghum syrup, (b) sweet sorghum juice	50
Figure 2.6 Contour plot of a response and the path of steepest ascent	58
Figure 2.7 Surface plot (a) and contour plot, (b) for a response	60
Figure 2.8 ASBR operational steps	62
Figure 2.9 The general chemical structure of polyhydroxyalkanoates (PHAs)	65
CHAPTER III	
Figure 1 Three-dimensional response plots and two-dimensional contour plots showing the effects of total sugar, initial pH and their mutual interaction on $P_s$ with optimum level of FeSO <sub>4</sub> (1.45 g/L)	79
Figure 2 Three-dimensional response plots and two-dimensional contour plots showing the effects of total sugar, FeSO <sub>4</sub> and their mutual interaction on $P_s$ with optimum level of initial pH (4.75)	80

## LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 3	Three-dimensional response plots and two-dimensional contour plots showing the effects of $\text{FeSO}_4$ , initial pH and their mutual interaction on $P_s$ with optimum level of total sugar (25 g/L)	80
Figure 4	Overall performance of hydrogen production at optimum conditions; cumulative hydrogen, volatile suspended solid (VSS) and residual sugar concentration; (b) metabolites production	84
<b>CHAPTER IV</b>		
Figure 1	Anaerobic sequencing batch reactor configuration	94
Figure 2	Profiles of a) HRT, b) pH and ORP, c) biogas content, d) $\text{H}_2$ yield and production rate during ASBR operation. A, B, C, D, E and F indicate the sampling times of anaerobic sludge for DGGE analysis	97
Figure 3	Hydrogen production performance at different sampling time.	98
Figure 4	DGGE profiles of 16s rRNA gene fragments from sludge Sampled under various ASBR performances. Lanes: A, sludge taken from unsteady state of 48 hr HRT; B, sludge taken from steady state of 48 hr HRT; C, sludge taken from unsteady state of 24 hr HRT; D: sludge taken from steady state of 24 hr HRT; E: sludge taken from unsteady state of 12 hr HRT; F, sludge taken from steady state of 12 hr HRT.	99

## LIST OF FIGURES (Cont.)

	Page
Figure 5 Phylogenetic tree showing the relationship between DGGE bands detected in this study and references sequences based on a comparison of 16S rRNA sequences. <i>Escherichia coli</i> was used as the out group. The bar corresponds to a 10% difference in nucleotide sequence. The numbers shown next to the nodes indicate percent bootstrap values from 1000 iterations.	101
 CHAPTER V	
Figure 1 Schematic diagram of anaerobic sequencing batch reactor design	113
Figure 2 Effect of HRTs on a) hydrogen yield, b) hydrogen volume, c) hydrogen content and d) hydrogen production rate	117
Figure 3 Single cyclic study (12 hr) for hydrogen production	120
Figure 4 DGGE profiles of 16s rRNA gene fragments from sludge of ASBR operation in a single cycle at optimum HRT (24 hr)	121
 CHAPTER VI	
Figure 1 ASBR configuration	132
Figure 2 Performance of ASBR (a) pH and ORP, (b) biogas and content, (c) hydrogen production rate and hexose consumed (d) hydrogen yield	136
Figure 3 DGGE profiles of 16s rRNA gene fragments from sludge sampled at steady state under various OLRs. Lenex: A: 40 g/L-d; B: 35 g/L-d; C:30 g/L-d, D: 25 g/L	138
Figure 4 Phylogenetic tree showing the relationship between DGGE bands detected in this study and references sequences based on a comparison of 16S rRNA (V3-V4) sequences. <i>Escherichia coli</i> was used as the out group. The bar corresponds to a 10% difference in nucleotide sequence. The numbers shown next to the nodes indicate percent bootstrap values from 1000 iterations.	139

**LIST OF FIGURES (Cont.)**

	Page
CHAPTER VII	
Figure 1 Anaerobic sequencing batch reactor configuration	151
Figure 2 Profiles of hydrogen production performance a) pH and ORP, b) Bio gas production rate, HPR and hydrogen content c) HY and SHPR, d) MLVSS and substrate removal efficiency	155
CHAPTER VIII	
Figure 1 Substrate utilization profile	180
Figure 2 Total volatile fatty acids and pH profile	181
Figure 3 Dry cell weight of <i>Cupriavidus</i> sp. KKU38, PHAs concentration and PHAs content profiles.	181
Figure 4 COD profile	182

## LIST OF ABBREVIATIONS

ADP	adenosine diphosphate
ANOVA	analysis of variance
ASBR	anaerobic sequencing batch reactor
ATP	adenosine triphosphate
B/A ratio	butyric acid to acetic acid ratio
BESA	bromoethanesulfonate
C/N ratio	carbon to nitrogen ratio
C/P ratio	carbon to phosphorus ratio
CCD	central composite design
CSTR	continuous stirred tank reactor
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
Fd(ox)	ferredoxin (oxidized form)
Fd(red)	ferredoxin (reduced form)
FID	flame ionization detector
FISH	fluorescence in situ hybridization
GC	gas chromatography
HPB	hydrogen-producing bacteria
HPLC	high performance liquid chromatography
HPR	hydrogen production rate
HRT	hydraulic retention time
HY	hydrogen yield
LAB	lactic acid bacteria
mg/L	milligram per liter
MLVSS	mixed liquor volatile suspended solid
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
OLR	organic loading rate
ORP	oxidation reduction potential

**LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)**

PCR	polymerase chain reaction
PEM	photon exchange membrane
PHAs	polyhydroxyalkanoates
POME	palm oil mill effluent
PSI	photosystem I
PSII	photosystem II
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RSM	response surface methodology
SHPR	specific hydrogen production rate
TCD	thermal conductivity detector
T-RFLP	terminal-restriction fragment length polymorphism
TS	total solid
TVFAs	total volatile fatty acids
UASB	up-flow anaerobic sludge blanket
VFAs	volatile fatty acids
VSS	volatile suspended solids
µg/L	microgram per liter
µL	micro liter