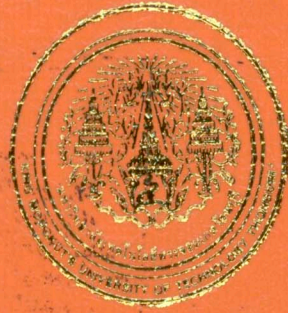


ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E42151



INOCULA SELECTION FOR BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM STARCH
RESIDUES UNDER ACIDIC CONDITION

MISS SUTATVADEE TAMMARAK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING (ENVIRONMENTAL ENGINEERING)
FACULTY OF ENGINEERING
KING MONKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI

2011



E42151

Inocula Selection for Biohydrogen Production from Starch Residues
under Acidic Condition

Miss Sutatvadee Tammarak B.Eng. (Environmental Engineering)

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment
of the Requirement for
the Degree of Master of Engineering (Environmental Engineering)
Faculty of Engineering
King Mongkut's University of Technology Thonburi
2011

Thesis Committee



Wilasinee Yoochatchaval

(Wilasinee Yoochatchaval, Ph.D.)

Chairman of Thesis Committee

Thidarat Bunsri

(Thidarat Bunsri, Ph.D.)

Member and Thesis Advisor

Jarurat Voranisarakul

(Asst. Prof. Jarurat Voranisarakul)

Member and Thesis Co-Advisor

Ekawan Luepromchai

(Asst. Prof. Ekawan Luepromchai, Ph.D.)

Member

Thesis Title	Inocula Selection for Biohydrogen Production from Starch Residues under Acidic Condition
Thesis Credits	12
Candidate	Miss Sutavadee Tammarak
Thesis Advisor	Dr. Thidarat Bunsri Asst. Prof. Jarurat Voranisarakul
Program	Master of Engineering
Field of Study	Environmental Engineering
Department	Environmental Engineering
Faculty	Engineering
B.E.	2554

Abstract

E 42151

The degradation of starch residues to hydrogen gas can benefit the cleanest renewable energy and organic waste reduction. Heat shock treatment coupled with substrate selective technique was introduced to classify hydrogen producing microbes into the groups of glucose and cellulose consuming fermentative inocula. In series 1, the treated Dindaeng (DD) inoculum contains cellulose fermentative microbes, which can generate some amounts of glucose to the biohydrogen system. The produced glucose can be further digested by the hydrogen producing microbes, resulting in the maximum specific H_2 production potential at $53 \text{ mLH}_2/(\text{gCOD/L})$. The treated Nongkheam (NK) inoculum contains only the glucose consuming-hydrogen producing microbes. Under the acidic condition, the natural DD and NK inocula cannot produce H_2 , since the hydrogen producing microbes cannot compete with the acidogen, so only volatile fatty acids (VFAs) were obtained in the bioreactor, even when glucose was fed. Coincidentally, the natural DD and NK inocula can utilise the starch residues and return the glucose to the system. The glucose is further consumed by acidogen, resulting in VFAs production and COD reduction. In series 2, two stages anaerobic sequencing batch experiments were investigated. The natural DD sludge was fed with starch solution in the first stage (pre-fermentation) to biotransform starch to be glucose and VFAs. The heat treated DD sludge was employed in the second stage (dark fermentation), the effluent from the pre-fermentation was fed to this biosystem. The inocula can convert the residues of starch, glucose and VFAs into H_2 . In fact, both stages can produce H_2 and the whole biosystem

E 42151

can bring the highest amount of accumulated H_2 at 4727 mL H_2 . By comparison, the first stage can contribute the maximum specific H_2 production potential at 1020 mL H_2 /(gCOD/L). As plenty of substrate is available, pre-fermentative microbes can earn enough food for their metabolic process. The effluent from the acidic fermentation may contain a low amount of substrates, which is consumed by hydrogen producing microbes at the second stage. The lack of substrate can cause the non competitive product inhibition, while the maximum H_2 yield at this stage is less than the batch test observation. The ground information from this work could be useful for designing and operating a multi stages biohydrogen reactor.

Keywords: Biohydrogen / Heat shock treatment / Hydrogen producing microbes /
Selective substrate / Starch residues

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกเชื้อสำหรับกระบวนการผลิตไบโอดีโอรเจนจากแป้งภายใต้สภาวะความเป็นกรด
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นางสาวสุรัชชวดี ธรรมรักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิดารัตน์ บุญศรี ผศ.จารุรัตน์ วรรณิสรากุล
หลักสูตร	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
ภาควิชา	วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
พ.ศ.	2554

บทคัดย่อ

E 42151

การย่อยสลายแป้งเพื่อให้เกิดก๊าซไฮโดรเจนสามารถทำให้เกิดประโยชน์จากพลังงานหมุนเวียนที่สะอาดและเป็นการลดของเสียอินทรีย์ การบำบัดด้วยความร้อนควบคู่กับการคัดเลือกสารอาหารจะทำให้เกิดการแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตไฮโดรเจนเป็นกลุ่มเชื้อในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงที่บริโกลคกูลโคสและเซลลูโลส เชื้อจากดินแดงที่ถูกบำบัดด้วยความร้อนมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ ซึ่งทำให้เกิดกลูโคสขึ้นบางส่วนในกระบวนการไบโอดีโอรเจน การผลิตกลูโคสสามารถถูกย่อยต่อไปโดยจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตไฮโดรเจน โดยมีการผลิตไฮโดรเจนจำเพาะสูงสุดที่ 53 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดีโอรเจน ส่วนเชื้อจากหนองแวมที่ถูกบำบัดด้วยความร้อนมีจุลินทรีย์กลุ่มที่บริโกลคกูลโคสไปผลิตไฮโดรเจนอย่างเฉียวเท่านั้น ภายใต้สภาวะความเป็นกรดเชื้อจากดินแดงและหนองแวมที่ไม่ได้ถูกบำบัดด้วยความร้อนไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนเพราะเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตไฮโดรเจนไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรดได้ ดังนั้นจึงมีเพียงกรดไขมันระเหยง่ายที่ได้จากปฏิกิริยชีวภาพเท่านั้น ถึงแม้ว่าจะถูกเติมด้วยกลูโคส แต่เชื้อจากดินแดงและหนองแวมที่ไม่ได้ถูกบำบัดด้วยความร้อนนั้นสามารถใช้แป้งและเปลี่ยนเป็นกลูโคสในระบบได้ กลูโคสจึงถูกบริโกลคกูลโคสด้วยจุลินทรีย์กลุ่มสร้างกรดเป็นผลให้มีการสร้างกรดไขมันระเหยง่าย และการลดลงของค่าชีโอดีส่วนในชุดการทดลองที่ 2 เป็นการทดลองโดยใช้ระบบแอนแอโรบิคเอสปีอาร์แบบสองขั้นตอน โดยเชื้อดินแดงจะถูกเติมด้วยน้ำแป้งในขั้นตอนแรก (กระบวนการหมักขั้นต้น) เพื่อที่จะเปลี่ยนรูปแป้งให้เป็นกลูโคสและกรดไขมันระเหยง่าย ส่วนเชื้อจากดินแดงที่ผ่านการบำบัดด้วยความร้อนจะถูกนำมาใช้ในขั้นตอนที่สอง (กระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง) ซึ่งน้ำเสียจากกระบวนการหมักขั้นต้นจะถูกนำมาเติมในระบบชีวภาพนี้ โดยเชื้อจะสามารถเปลี่ยนแป้งที่เหลืออยู่ กลูโคส และกรดไขมันระเหย

E 42151

ง่ายไปเป็นไฮโดรเจน ประเด็นที่น่าสนใจ คือ ปฏิกริยาชีวภาพทั้งสองขั้นตอนสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ ระบบชีวภาพทั้งหมดสามารถให้ไฮโดรเจนสะสมสูงสุดที่ 4727 มิลลิกรัมไฮโดรเจน เมื่อเปรียบเทียบจะพบว่า ขั้นตอนแรกสามารถให้ค่าการผลิตไฮโดรเจนจำเพาะสูงสุดเป็น 1020 มิลลิกรัมไฮโดรเจนต่อกรัมชีโอดีต่อลิตร เนื่องจากมีสารอาหารอยู่มากมายดังนั้นจุลินทรีย์กลุ่มกระบวนการหมักขั้นต้นจึงสามารถได้รับสารอาหารอย่างเพียงพอสำหรับใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม ในขั้นตอนที่สองน้ำเสียจากกระบวนการหมักในสภาวะที่เป็นกรดอาจจะมีปริมาณอาหารน้อยเกินกว่าที่จุลินทรีย์กลุ่มผลิตไฮโดรเจนบริโภาคได้ การขาดสารอาหารก่อให้เกิดการยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์ได้ ส่งผลให้การผลิตไฮโดรเจนสูงสุดในขั้นตอนนี้ต่ำกว่าในการทดลองแบบกะข้อมูลพื้นฐานของงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการออกแบบและการดำเนินงานของถังปฏิกรณ์ไบโอไฮโดรเจนแบบหลายขั้นตอนได้

คำสำคัญ: การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อน / การเลือกสารอาหาร / จุลินทรีย์กลุ่มผลิตไฮโดรเจน / ไบโอไฮโดรเจน / เศษแป้งมัน

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my deeply appreciation to my advisor, Dr. Thidarat Bunsri and my co advisor Asst. Prof. Jarurat Voranisarakul, for their kindly suggestions, supports and encouragements throughout my work. Additionally, their precious advices also encourage to my moral for being and doing to the worth society. Meanwhile, I am also grateful to my thesis committees, Dr. Wilasinee Yoochatchaval and Asst. Prof. Dr. Ekawan Luepromchai, for their valuable comments that are very useful to my study. I would like to thank administrative and technical staffs at the Department of Environmental Engineering of King Mongkut's University of Technology Thonburi. Besides, the supporting laboratory facilities were provided by the National Centre of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management. The funding of this research was partially supported by the Ministry of Energy (Thailand Research Fund of Energy Policy and Planning office for financial support through the year 2009). Additionally, I would like to thank all of my friends and colleagues for their warm-heartily friendships.

Finally, I am so proud to owe my sincerely appreciation to my beloved parents, my sibling, and best friend, for their kindly supports, understanding, and encouragement throughout my entire study.

CONTENTS

	PAGE
ENGLISH ABSTRACT	ii
THAI ABSTRACT	iv
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER	
1 INTRODUCTION	1
1.1 Background	1
1.2 Statement of Problems	2
1.3 Objectives	4
1.4 Scopes	4
1.5 Expected Outcomes	4
1.6 Research Development	5
2 LITERATURE REVIEWS	7
2.1 Biohydrogen Process	7
2.1.1 Direct Biophotolysis	8
2.1.2 Indirect Biophotolysis	9
2.1.3 Dark Fermentation	10
2.1.4 Photo Fermentation	11
2.2 Principles of dark fermentation	12
2.2.1 Mechanisms	13
2.2.2 Dark fermentation pathway	14
2.3 Production Rates of Biohydrogen Systems	15
2.4 Microbial Colony	16
2.4.1 Mixed Cultures	16
2.4.2 Pure Cultures of Wild Strains	17

2.4.3 Ambient and mesophilic strains	18
2.5. Major enzymes	18
2.5.1 The reversible or classical hydrogenases	18
2.5.2 The membrane-bound uptake hydrogenases	18
2.5.3 The nitrogenase enzymes	19
2.6 Types of Feedstocks	19
2.6.1 Use of simple sugars	20
2.6.2 Use of starch containing wastes	21
2.7 Heat-shock treatment	21
2.8 Types of Reactors	22
2.9 Optimisation of bioprocess parameters	23
2.10 Exploitation of ByProducts	27
2.11 Biomathematical Model	27
2.12 Summary	28
3 MATERIALS AND METHODS	30
3.1 Overview	30
3.2 Seed Inoculums and Substrate	31
3.3 Experimental Setup	31
3.4 Analytical Methods	34
3.4.1 Hydrogen Gas Collection Procedure and Gas Analysis	35
3.4.2 Volatile Fatty Acid (VFAs) Analysis	35
3.4.3 Analytical Parameters	35
3.5 Data Analysis	36
4 RESULTS AND DISCUSSIONS	37
4.1 Characteristics of Microbial Seeds	37
4.2 Series 1: Microbial Acclimatisation and Hydrogen gas Production Performance	38
4.2.1 Heat treated inocula	38
4.2.2 Natural inoculums	48
4.3 Series 2: Anaerobic Sequencing Batch Reactor	56
4.4 Summary	63

5 CONCLUSIONS AND FUTURE RECOMMENDATIONS	65
5.1 Conclusions	65
5.2 Recommendations	66
REFERENCES	67
APPENDICES	82
A. Performance of batch experiment	82
B. Performance of Anaerobic Sequencing Batch Reactor experiment	107
CURRICULUM VITAE	125

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 Rates of hydrogen synthesis	16
3.1 Batch experiment design	32
3.2 Anaerobic Sequencing Batch experiment design	33
3.3 Analytical methods for routine examination	36
4.1 Characteristics of microbial seed samples	37
4.2 Variables of hydrogen production process	40
4.3 Glucose and VFAs concentrations from the bioreactor with treated sludge	41
4.4 Kinetic parameters from Monod model used in treated sludge	42
4.5 Variables of hydrogen production process	44
4.6 Glucose and VFAs concentrations from the bioreactor with treated sludge	45
4.7 Kinetic parameters from Monod model used in treated sludge	47
4.8 VFAs concentrations yielded from the bioreactor with natural sludge	49
4.9 Glucose and VFAs concentrations from the bioreactor with natural sludge	50
4.10 Substrate conversion and sCOD removal in natural inoculums	51
4.11 VFAs concentrations yielded from the bioreactor with natural sludge	52
4.12 Glucose and VFAs concentrations from the bioreactor with natural sludge	54
4.13 Kinetic parameters from Monod model used in natural sludge	55
4.14 Variables of hydrogen production process in the two stages biohydrogen	61
4.15 Glucose and VFAs concentrations from two stages biohydrogen	62
4.16 Performance of two stages biohydrogen	62
4.17 Kinetic parameters from Monod model of two stages biohydrogen	63
A.1 sCOD removal in each type of treated inoculums in reactor with time	83
A.2 SS of microorganism in each type of inoculums with time	84
A.3 VSS of microorganism in each type of inoculums with time	84
A.4 sCOD removal in each type of treated inoculums in reactor with time	85
A.5 SS of microorganism in each type of inoculums with time	85
A.6 VSS of microorganism in each type of inoculums with time	86
A.7 sCOD removal in each type of natural inoculums in reactor with time	87
A.8 SS of microorganism in each type of inoculums with time	88
A.9 VSS of microorganism in each type of inoculums with time	88

A.10	sCOD removal in each type of natural inoculums in reactor with time	89
A.11	SS of microorganism in each type of inoculums with time	89
A.12	VSS of microorganism in each type of inoculums with time	90
B.1	sCOD removal in each type of inoculums in reactor with time	108
B.2	SS of microorganism in each type of inoculums with time	109
B.3	VSS of microorganism in each type of inoculums with time	110
B.4	Cumulative hydrogen gas of reactor DD1 with time	115
B.5	Cumulative hydrogen gas of reactor DD2 with time	117
B.6	Cumulative hydrogen gas of reactor DD3 with time	119
B.7	Cumulative hydrogen gas of reactor DD4 with time	122

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1.1 Research framework	6
2.1 Transition of dormant spores to active vegetative forms	22
3.1 Overview of experimental setup	30
3.2 Experimental setup of dark fermentation for biohydrogen process	33
3.3 Anaerobic sequencing batch experiment	34
4.1 H ₂ production curves during incubation in the bioreactors fed with (a) glucose and (b) starch solution	39
4.2 H ₂ production curves in the batch bioreactors fed with (a) glucose and (b) starch solution	40
4.3 H ₂ production curves during incubation in the bioreactors fed with (a) 80G+20S and (b) 80S+20G solution	43
4.4 H ₂ production curves in the batch bioreactors fed with (a) 80G+20S and (b) 80S+20G solution	44
4.5 VFAs producing curves in the batch bioreactors fed with (a) glucose and (b) starch solution	49
4.6 VFAs producing curves in the batch bioreactors fed with (a) 80G+20S and (b) 80S+20G solution	52
4.7 H ₂ production curves in the two stages biohydrogen (a) pre-fermentative DD1 and (b) dark fermentative DD2	58
4.8 H ₂ production curves in the two stages biohydrogen (a) pre-fermentative DD3 and (b) dark fermentative DD4	59
4.9 H ₂ production curves in the two stages biohydrogen process (a) DD1 and DD2 (b) DD3 and DD4 bioreactors	60
A.1 Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 1A	91
A.2 Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 2A	92
A.3 Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 3A	93
A.4 Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 4A	94
A.5 Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 1AA	95
A.6 Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 2AA	96
A.7 Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 3AA	97

A.8	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 4AA	98
A.9	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 1B	99
A.10	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 2B	100
A.11	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 3B	101
A.12	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 4B	102
A.13	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 1BB	103
A.14	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 2BB	104
A.15	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 3BB	105
A.16	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor 4BB	106
B.1	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor DD1	111
B.2	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor DD2	112
B.3	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor DD3	113
B.4	Profile of sCOD, SS and VSS of reactor DD4	114

LIST OF ABBREVIATIONS

BioH ₂	=	Biohydrogen
COD	=	Chemical Oxygen Demand
CSTR	=	Continuous Stirred Tank Reactor
DD	=	Dindaeng
Fe-Hydrogenase	=	Iron Hydrogenase
FID	=	Flame Ionisation Detector
GC	=	Gas Chromatography
Hac	=	Acetic acid
HBu	=	Butyric acid
HP	=	Propionic acid
HRT	=	Hydraulic Retention Time
mM	=	millimolar
mmol/L	=	millimol per litre
mol H ₂ /mol glucose	=	mol hydrogen per mol glucose
Ni-Fe Hydrogenase	=	Nickel Iron Hydrogenase
NK	=	Nongkheam
[S]	=	Substrate concentration
sCOD	=	soluble Chemical Oxygen Demand
SS	=	Suspended Solid
TCD	=	Thermal Conductivity Detector
VFAs	=	Volatiles Fatty Acids
VSS	=	Volatile Suspended Solid