

DARK FERMENTATIVE BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM BREWERY WASTES

Miss Arunee Supasinsathit

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Environmental Science
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสงจากของเสียโรงงานเป็ียร์



นางอรุณี ศุภสินสาธิต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


510693



อรุณี ศุภสินสาริต: การผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพโดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้แสง จากของเสียโรงงานเบียร์ (DARK FERMENTATIVE BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM BREWERY WASTES)

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์,

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ศรีสุดา ธรรมวิฑูกร, 159 หน้า.

เป็นที่ทราบกันดีว่ายีสต์มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และกากยีสต์ที่มาจากโรงงานเบียร์ มีอยู่ในปริมาณมาก แนวคิดที่จะนำกากยีสต์มาทำการศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพ จึงน่าจะเป็นไปได้ ดังนั้น การทดลองจึงแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยดำเนินการทดลองแบบ Batch ในถังหมักแบบกวนผสมอย่างทั่วถึง หรือ CSTR ที่ควบคุม pH และอุณหภูมิเท่ากับ 5.0 และ 30°C ตามลำดับ โดยชุดการทดลองที่ 1 เป็นการหมักแบบ Batch ที่มีแต่น้ำตาลกลูโคส เป็นสารอาหารเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 2 ที่มีการเติมกากยีสต์ ลงในสารอาหารน้ำตาลกลูโคส โดยออกแบบการทดลองโดยใช้ Full Factorial Central Composite Design (CCD) และ Response Surface Methodology และใช้สมการ Modified Gompertz ในการประเมินผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนสะสมที่เกิดขึ้น ผลการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่มีกากยีสต์อยู่ด้วยให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนชีวภาพที่ดีกว่า โดยสัดส่วนที่เหมาะสมประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส, กากยีสต์ และเชื้อจุลินทรีย์ผสมแอนแอโรบิก ที่ความเข้มข้น 7.0, 11.0, และ 12.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนในเทอมของ H_2 Yield = 1.42 โมล/โมลของน้ำตาลกลูโคส นอกจากนั้นยังพบว่า อัตราการเกิดก๊าซไฮโดรเจนจากถังหมักที่มีกากยีสต์ผสมอยู่ด้วยนั้น เพิ่มขึ้นจาก 2.5 เป็น 3.9 มิลลิลิตรต่อกรัม VSS. ชั่วโมง⁻¹ การออกแบบการทดลองแบบ Batch นี้ ยังได้นำ Integrated Monod equation weighted least-square model มาใช้เพื่อศึกษาหาค่า Kinetic coefficient k , K_s เพื่อนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการออกแบบการทดลองหาผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบต่อเนื่อง ผลการทดลองพบว่า กากยีสต์ยังช่วยทำให้อัตราการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยมีค่า k (maximum specific substrate utilization rate) เพิ่มขึ้นจาก 0.5 เป็น 1.84 วัน⁻¹ จากนั้นจึงดำเนินการศึกษาถึงผลของระยะเวลาพักน้ำ HRT ที่มีต่อผลผลิตก๊าซไฮโดรเจนแบบต่อเนื่อง โดยทำการทดลองในถังหมัก CSTR ที่มีการแปรค่าระยะเวลาพักน้ำ 4 ค่าคือ 24, 12, 8, และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ โดยใช้เวลา 10 วันต่อการทดลองที่แต่ละ HRT สรุปผลการทดลองที่ศึกษา พบว่าที่สภาวะคงตัว (steady-state) ระยะเวลาพักน้ำ 4 ชั่วโมง ให้ผลผลิตก๊าซไฮโดรเจน (H_2 yield) สูงถึง 2.87 โมล/โมลกลูโคส คิดเป็น 71.8% ของก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นตามทฤษฎี และจากการศึกษาโครงสร้างประชากรของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ โดยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุล DGGE (denaturing gradient gel eletrophoresis) พบว่า *Clostridium pasteurianum* sp. และ uncultured bacterium Clone HPR 146 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบที่ระยะเวลาพักน้ำ 4 ชั่วโมง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต..... 

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... 
ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... 

4689716120 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORDS : hydrogen yield, HRT, brewery waste yeast, CSTR

ARUNEE SUPASINSATHIT: DARK FERMENTATIVE BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM BREWERY WASTES.

THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, PH.D.,

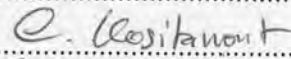
THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. SRISUDA DHAMWICHUKORN, PH.D.,
159 pp.


Since brewery waste yeast is plenty and contains high nutritional value, the possibility in using for enhancing H_2 production is studied. The two sets of batch experimental set-up were carried out in CSTR operating at pH and temperature of 5.0 and 30°C , respectively, by means of brewery waste yeast adding and non-waste yeast adding using glucose as substrate. Factorial design experiments with a central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM) were used for finding optimal point of glucose, brewery waste yeast and microbial sludge concentration that yielded the maximum hydrogen production rate. For explanation process reaction and design, the Monod kinetic coefficient rate of k and K_s were determined using the integrated Monod equation weighted least-square model. The modified Gompertz equation could be used to best fit the accumulative hydrogen production with correlation (R^2) greater than 0.98. It was shown that at 7.0 g/l glucose, 11 g/l brewery waste yeast and 12 g/l of microbial sludge, the highest H_2 yield of 1.42 mol H_2 /mol glucose was obtained. Addition of brewery waste yeast into synthetic wastewater in the reactor was found to shift the specific H_2 production rate from 2.5 to 3.9 ml H_2 /g VSS.h⁻¹. The apparent kinetic value of k (maximum specific substrate utilization rate) was also shift from 0.52 to 1.84 d⁻¹. The effect of hydraulic retention time (HRT) on continuous H_2 production and its mixed anaerobic microbial community were observed in a CSTR operated with 4 HRTs, each lasting 10 days. The major bacterial composition of each HRT was analyzed by 16S rRNA gene-targeted denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). It was found that the H_2 production was increased after transition from 24h, 12h, 8h and 4h HRT. The experimental result clearly showed that H_2 yield as high as 2.87 mol H_2 /mol glucose was achieved at 4h HRT running, corresponding to 71.8% H_2 conversion efficiency compared to the theoretical yield. *Clostridium pasteurianum* sp. and uncultured bacterium Clone HPR 146 existed in the reactor might be the dominant strains that contribute to H_2 production at HRT 4 h.

Field of study: Environmental Science

Academic year: 2008

Student's signature:.....

Principal Advisor's signature:.....

Co-advisor's signature:.....

DEDICATION

This dissertation is dedicated to
The memory of my father and mother
Tharmnong Wajanavijai
Ounruen Indranoi
And my highly respectful professors

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis was accomplished with the contributions of people whom and institutes which, I would like to express my gratitude here.

My appreciation and sincere respects to Assistant Professor Dr. Charnwit Kositanont, my research advisor, for his intellectual initiatives, providing valuable opportunities and constant encouragement throughout my study. I would like also to extend gratitude to Assistant Professor Dr. Srisuda Dhamwichukorn, for her precious suggestions, invaluable guidance and encouragement. My sincerely thanks are given to the members of my examination committee, especially to Associate Professor Dr. Somchai Pengprecha, chairman of thesis committee, Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Dr. Somchai Dararatana and Assistant Professor Dr. Chavalit Ratanatamskul for their invaluable time and suggestions.

The author would like to express special appreciation to Mr. Rojrit Debhakam, the executive vice president director of Boonrawd Brewery Co., Ltd, Mr. Sonthi Somchivita, Mrs. Vimla Tritasavit (the former special lecturer of Chulalongkorn University), and Mrs. Ormsri Chalayont, without their kind supports and assistance with laboratory instrumentations, this study would not get accomplished.

The author would like to grateful Associate Professor Dr. Pornpote Piumsomboon, Associate Professor Dr. Lursuang Mekasut, Associate Professor Dr. Chalermraj Wantawin, Assistant Professor Dr. Art-ong Pradatsundarasar for their valuable discussions and encouragement. I would like to express my gratitude to Jun. Prof. Dr.-Ing. Eckhard Kraft for being my host scientist and hospitality during my stay in Weimar, Germany. I would also like to thanks Dr. Sorawit Powtongsook and Ms. Maliwan Kutako for their kind assistance in microbial community analysis.

This research was supported by The 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadphiseksomphot Endowment Fund) Chulalongkorn University and from the International DAAD-granted Exchange Project of Germany.

I would like to thanks the staff of Boonrawd Brewery Co., Ltd and affiliates, for their help in one way or another.

Friendship from Assistant Professor Dr. Sivawan Phoolphundh, Dr. Tatsanawalai Utarasakul, Mr. Narongsak Chaiyasit, Ms. Sunantha Chatthaiwathana, and all friends at Inter-department of Environmental Science, is deeply appreciated. My very special thanks to my beloved family, for their endless understanding, patience and care.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Background	1
1.2 Objectives.....	3
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS.....	4
2.1 Literature Review	4
2.2 Biological hydrogen production.....	6
2.3 Dark fermentation	10
2.4 Factor affecting H ₂ fermentation	21
2.5 Fundamental of Anaerobic Microbial Kinetics.....	39
2.6 Measurement of kinetic coefficients.....	42
2.7 Molecular Technology for Microbial Diversity and community.....	44
2.8 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).....	46

	Page
CHAPTER III METHODOLOGY.....	48
3.1 Raw Material	48
3.2 Seed sludge	49
3.3 Experimental apparatus and procedure.....	49
3.4 Analytical Methods	57
3.5 Experimental Design and Data Analysis.....	57
3.6 PCR-DGGE Analysis	64
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSIONS.....	66
4.1 Comparison test on heat treatment used in this study.....	66
4.2 Batch experiment.....	66
4.3 Batch hydrogen production.....	72
4.4 Batch soluble metabolite.....	76
4.5 The kinetic parameter.....	78
4.6 Continuous Feeding experiment.....	78
4.7 Effect of HRT on hydrogen production.....	80
4.8 Effect of shock load.....	91
4.9 Variation of VFA concentrations	100
4.10 Microbial diversity at different HRT.....	103
4.11 The reactor performance with actual wastewater.....	107
4.12 Confirmation Test for Continuous Operation.....	109

	Page
4.13 Discussions	112
CHAPTER V CONCLUSIONS	116
REFERENCES.....	119
APPENDICES.....	133
APPENDIX A Research report to the international DAAD-granted exchange project.....	134
APPENDIX B Anaerobic digestion.....	140
APPENDIX C Beer production process.....	144
APPENDIX D Raw Data.....	152
BIOGRAPHY.....	159

LIST OF TABLES

Table		Page
Table 2-1	Fuel cell.....	6
Table 2-2	Overview of biological hydrogen production processes.....	8
Table 2-3	Comparison of H ₂ production rates from various biohydrogen system and size of bioreactor required to power PEM fuel cells.....	9
Table 2-4	H ₂ yields and production rates of bio-hydrogen by the sequential and combined dark-photo fermentations.....	11
Table 2-5	Heat treatment protocol from various researchers.....	22
Table 2-6	Summary of source kinetics of H ₂ producing bacteria.....	28
Table 2-7	OLR bacterial biomass retained, H ₂ production rate and H ₂ yield in various reactor types.....	31
Table 2-8	Different methods of hydrogen removal.....	35
Table 3-1	Heat treatment protocol used in the comparison test.....	50
Table 3-2	Reactor characteristics and operational parameters.....	55
Table 3-3	Experimental range and level of independent variables x ₁ , x ₂ and x ₃ are the coded value of the test values.....	60
Table 4-1	The preliminary test data.....	68
Table 4-2	Full factorial central composite design with variables in coded and natural units along with the observed responses.....	69
Table 4-3	The result of confirmation experiment at optimal point.....	69
Table 4-4	Comparison of important parameters in batch culture.....	75
Table 4-5	Parameters for completely mixed suspended growth reactors treating soluble COD.....	79
Table 4-6	Result of reactor performance during the continuous flow experiment	82
Table 4-7	H ₂ yields and content in biogas from various reactor by dark fermentations.....	93
Table 4-8	The average value of volatile fatty acid (VFA) production at different HRTs.....	103

Table		Page
Table 4-9	Similarity of sequences obtained from excised DGGE bands to sequences in the NCBI database.....	106
Table 4-10	Information of sludge samples for PCR-DGGE.....	106
Table 4-11	Reactor performance with actual wastewater at HRT 4 hours	108
Table 4-12	Reactor performance at steady-state.....	110
Table 4-13	Average results of VFA obtained from reactor operated at HRT of 4h.....	111

LIST OF FIGURES

Figure		Page
Figure 2-1	Passage of electrons from compound A to compound B. When A loses its electrons it is oxidized; when B gains the electrons it is reduced.....	13
Figure 2-2	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH).....	14
Figure 2-3	Illustrates the fermentative pathway of glucose via glycolysis by strictly anaerobic of <i>C. pasteurianum</i> species.....	15
Figure 2-4	Cumulative H ₂ production at different initial pH (a) sucrose and (b) starch.....	23
Figure 2-5	Specific H ₂ production potential at different initial pH (a) sucrose and (b) starch.....	23
Figure 2-6	Effect of temperature on growth.....	25
Figure 3-1	Serum bottle technique.....	51
Figure 3-2	Volume displacement method used in the first batch study....	52
Figure 3-3	The experimental set-up of the 1L CSTR.....	53
Figure 3-4	Gas counter designed by Opaswatchai.....	54
Figure 3-5	Schematic of the continuous stirred tank reactor.....	56
Figure 3-6	Photograph showing the CSTR in continuous feeding experiment.....	56
Figure 3-7	Flow diagram of methodology.....	63
Figure 4-1	Response surface (left) and contour plot (right) illustrating a maximum hydrogen production rate (ml/h)	70
Figure 4-2	Cumulative hydrogen production at optimum point.....	71
Figure 4-3	Cumulative biogas production curve in the CSTR batch without waste yeast adding.....	74
Figure 4-4	Cumulative biogas production curve in the CSTR batch with waste yeast adding.....	74
Figure 4-5	The use of enzymes can lower the activation energy of a reaction.....	75
Figure 4-6	The concentration of VFAs and ethanol in the CSTR batch experiment.....	77
Figure 4-7	The effect of HRT on H ₂ yield.....	83

Figure		Page
Figure 4-8	The effect of HRT on H ₂ production.....	84
Figure 4-9	The effect of HRT on H ₂ content.....	85
Figure 4-10	The effect of HRT on specific hydrogen production rate.....	86
Figure 4-11	The effect of HRT on volumetric H ₂ production rate.....	87
Figure 4-12	The effect of HRT on Effluent suspended solids	88
Figure 4-13	The effect of HRT on Solid retention time.....	89
Figure 4-14	Hydraulic retention time and biomass concentration.....	90
Figure 4-15	The effect of HRT on glucose conversion.....	94
Figure 4-16	Organic loading rate and H ₂ Yield.....	95
Figure 4-17	Organic loading rate and H ₂ content.....	96
Figure 4-18	Organic loading rate and H ₂ Production at STP.....	97
Figure 4-19	Organic loading rate and specific hydrogen production rate (SHPR)	98
Figure 4-20	The effect of HRT on volatile fatty acids (VFAs).....	99
Figure 4-21	The effect of HRT on volatile fatty acids (VFAs).....	102
Figure 4-22	Variation of DGGE profiles with HRTs.....	105
Figure 4-23	Photograph showing actual CSTR+RS.....	114

LIST OF ABBREVIATIONS

CSTR	Continuous Stirred Tank Reactor
AS	Activates Sludge
HRT	Hydraulic Retention Time
SRT	Solids Retention Time
OLR	Organic Loading Rate
VHPR	Volumetric Hydrogen Production Rate
SHPR	Specific Hydrogen Production Rate
Kd	Endogenous Decay Rate
Y	Growth yield coefficient
SRB	Sulfate Reducing Bacteria