

อคูมึนาในเจลอัลจึเนทล้สำหรับเป็นตัวยงเซลล้ในกระบวนการหมักเอทานอล

นางสาว จึรารรณ มงคลขจึค

วึทยานึพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่ของการศึษาตามหลัคสุตรปริญญาวึศวกรรณศาสตรมหาบัณชึค

สาขาวิชาวึศวกรรณเคมี ภาควิชาวึศวกรรณเคมี

คณะวึศวกรรณศาสตร จุฬาลงกรณมหาวึทยาลั้

ปีการศึษา 2551

ลึขลึทึธิขงจุฬาลงกรณมหาวึทยาลั้

**ALUMINA DOPED ALGINATE GEL AS CELL CARRIER IN ETHANOL
FERMENTATION PROCESS**

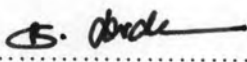
Miss Jirawan Mongkolkajit

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University**


511883

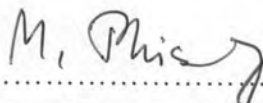
Thesis Title ALUMINA DOPED ALGINATE GEL AS CELL CARRIER
IN ETHANOL FERMENTATION PROCESS.
By Miss Jirawan Mongkolkajit
Field of Study Chemical Engineering
Advisor Associate Professor Muenduen Phisalaphong, Ph.D.

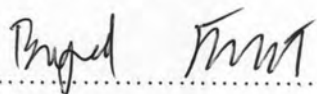
Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

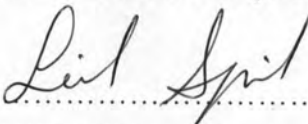

..... Dean of the Faculty of Engineering
(Associate Professor Boonsom Lerthirunwong, Dr.Ing.)

THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Tharathon Mongkhonsi, Ph.D.)


..... Advisor
(Associate Professor Muenduen Phisalaphong, Ph.D.)


..... Examiner
(Assistant Professor Bunjerd Jongsomjit, Ph.D.)


..... External Examiner
(Associate Professor Suwimol Asavapisit, Ph.D.)

จิราวรรณ มงคลขจิต : อลูมินาในเจลอัลจินทสำหรับเป็นตัวพุงเซลล์ในกระบวนการหมักเอทานอล (ALUMINA DOPED ALGINATE GEL AS CELL CARRIER IN ETHANOL FERMENTATION PROCESS) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงษ์, 128 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการพัฒนาตัวพุงเซลล์แบบใหม่โดยการเติมอลูมินาในเจลอัลจินท (AEC) เพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์คอคเคกอน *Saccharomyces cerevisiae* M30 ในกระบวนการหมักเอทานอล โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานแก่เซลล์ จากนั้นทำการประเมินประสิทธิภาพของตัวพุง AEC เปรียบเทียบผลกับการใช้เม็ดอัลจินทแบบทั่วไป (EC) เป็นตัวพุงและการใช้เซลล์แขวนลอย (SC) ในระบบขวดเขย่าที่อัตราหมุนรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า AEC มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์มากกว่า EC เนื่องจากให้ค่าการผลิตเอทานอลสูง มีโครงสร้างความพรุนที่ดีกว่าและมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดีกว่าทั้งในด้านความแข็งแรงและความยืดหยุ่น การเติมอลูมินาในตัวพุงสามารถช่วยสนับสนุนการทำงานของเซลล์และสร้างโครงข่ายของอลูมินากับเซลล์ภายในตัวพุง โครงข่ายนี้สามารถทำให้เกิดโครงสร้างที่มีรูพรุนขนาดเล็กขึ้น ซึ่งจะช่วยให้การแพร่ผ่านของสารดีขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ AEC จึงได้ศึกษาอิทธิพลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเซลล์ตรึง ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินทและความเข้มข้นของอลูมินาต่อการผลิตเอทานอล พบว่า ที่เม็ดเซลล์ตรึงขนาด 2-6 มิลลิเมตร ให้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลค่อนข้างคงที่ในช่วง 88-92 กรัมต่อลิตร โดยจะได้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจินทเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ อลูมินาเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ พบว่า AEC ในรูปแบบท่งกล้วยเป็นท่งกล้วยเหลี่ยมขนาด 20x20x4 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีศักยภาพในการหมักเอทานอล เนื่องจากเอทานอลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับระบบที่ใช้ AEC รูปท่งกลมขนาด 6 มิลลิเมตร สำหรับการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ถังปฏิกรณ์บรรจิวัดคู่ตรึง AEC รูปท่งกล้วยเหลี่ยมไว้ภายใน พบว่า สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีเสถียรภาพนานกว่า 30 วัน เมื่อดำเนินการที่อัตราการเจือจาง 0.28 ต่อชั่วโมง จะได้อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 12.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือประมาณ 9 เท่า ของระบบแบบกะ ดังนั้น AEC จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวพุงเซลล์ในกระบวนการหมักเอทานอล และสามารถประยุกต์ใช้ไปถึงปฏิกรณ์แบบมีการบรรจิวัดคู่ตรึงไว้ภายในได้ดี โดยตัวพุงที่พัฒนาขึ้นนี้มีข้อดีเด่นหลายประการรวมถึงมีอัตราการผลิตเอทานอลสูง มีความแข็งแรงเชิงกลที่ดี มีความเสถียร และอัตราการตรึงเซลล์สูง

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิติติจิราวรรณ มงคลขจิต.....
 สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก
 ปีการศึกษา2551.....

4970261921 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : ALUMINA / ALGINATE GEL / CELL IMMOBILIZATION /
PACKED BED REACTOR / ETHANOL FERMENTATION

JIRAWAN MONGKOLKAJIT: ALUMINA DOPED ALGINATE GEL
AS CELL CARRIER IN ETHANOL FERMENTATION PROCESS.

ADVISOR: ASSOC. PROF. MUENDUEN PHISALAPHONG, PhD., 128
pp.

Alumina (Al_2O_3) doped alginate gel (AEC) was developed as a new type of cell carrier in ethanol fermentation using flocculating yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* M30. Sugar cane molasses was used as a carbon and energy source for fermentation medium at the initial sugar concentration of 220 g/l. The performance of AEC carrier in ethanol fermentation was evaluated and compared to the conventional Ca-alginate bead (EC) and suspended cell (SC) in shaking flask at 150 rpm and 33 °C, for 72 hours. The AEC carrier was found to be more effective for yeast immobilization resulting in higher ethanol production, better porous structure and better mechanical properties in terms of tensile strength and percentage of elongation at break than the EC carrier. The addition of Al_2O_3 particle in the carrier could support cell activities and construct the network of cell and Al_2O_3 inside the gel bead. This network was able to create microporous structure that could improve mass transportation. To increase the efficiency of AEC carrier, the effects of bead diameter size, Na-alginate concentration and Al_2O_3 concentration on the ethanol fermentation were investigated. The final ethanol concentration was almost constant at 88 - 92 g/l under the range of 2 - 6 mm bead diameter. The maximum ethanol concentration was obtained when 2.5% (w/v) of Na-alginate and 5.0% (w/v of alginate) of Al_2O_3 were applied. Furthermore, the ethanol fermentation potential of the system applied with the convenient form of square shape AEC carrier ($20 \times 20 \times 4 \text{ mm}^3$) was promising with its ethanol concentration comparable to that of the system of spherical shape ($\text{Ø} 6 \text{ mm}$) AEC carrier. The continuous ethanol fermentation in packed bed reactor using the square shape AEC carrier worked efficiently and was stable over a period of 30 days. The maximum ethanol productivity of 12.34 g/l·h or about 9 times of that of the batch system was achieved at the dilution rate of 0.28 h^{-1} . Therefore, the AEC carrier was suitable for cell immobilization in ethanol fermentation process and successfully applied in packed bed reactor. The developed carrier had many advantages including high ethanol production, good mechanical property, stability and high immobilization yield.

Department :Chemical Engineering ..

Student's Signature

จิรวรรณ มงคลกัจฉ์

Field of Study : .Chemical Engineering ..

Advisor's Signature

M. Muenduen

Academic Year : 2008.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The work presented in this thesis was meticulously conducted with the help and encouragements from many people who make such work possible. I would like to take this opportunity to thank the following people for their contributions to this work.

Firstly, I would like to express my earnest gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Muenduen Phisalaphong, Ph.D. for her encouragement, support, guidance, and unfailing faith all the way through my thesis work and study.

Special appreciation is addressed to Prof. Savitree Limtong, Dr.Eng. (Department of Microbiology, Kasetsart University, Bangkok) for her kind and most gratified support to this thesis work by providing the *Saccharomyces cerevisiae* M30 strain.

Thanks to all of my thesis committee, Assoc. Prof. Tharathon Mongkhonsi, Ph.D., Assoc. Prof. Suwimol Asavapisit, Ph.D. and Asst. Prof. Bunjerd Jongsomjit, Ph.D. for their kind advices and recommendations which are invaluable for improving my work.

Many thanks are also addressed to Mrs. Sunee Pakprapan and Mrs. Rujiporn Prateepasin (Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University) for their kind assistance in commencing Gas Chromatography (GC) and Scanning Electron Microscopy (SEM).

Sincere thanks are given to all members of the Biochemical Engineering Research Laboratory and all my friends and staffs in the Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University for their assistance, support, and warm collaborations.

Finally, I would like to express my highest gratitude to my parents for their affectionate support, blessings, inspiration, and love which guide me all the way throughout my life and study.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xiii
 CHAPTER	
 I INTRODUCTION	
1.1 Objectives	2
1.2 Expected benefits	2
1.3 Working scopes.....	2
1.3.1 Batch system	3
1.3.2 Packed bed system	3
 II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	
2.1 Ethanol fermentation.....	4
2.1.1 Raw materials.....	4
2.1.2 Microorganisms.....	5
2.2 Cell immobilization.....	8
2.2.1 Cell immobilization carriers and techniques	9
2.2.1.1 Surface attachment.....	10
2.2.1.2 Entrapment within porous matrix	12
2.2.1.3 Yeast flocculation	13
2.2.1.4 Mechanical containment behind a barrier	14
2.3 Bioreactor	14
2.4 Review of ethanol fermentation by immobilization system	17

CHAPTER	Page
III MATERIAL AND METHODS	28
3.1 Microorganism.....	28
3.2 Stock cell suspension and immobilization	28
3.3 Immobilization cell	29
3.4 Fermentation.....	29
3.4.1 Batch Fermentation	29
3.4.2 Continuous Fermentation	31
3.5 Analytical methods	32
3.5.1 Sugar concentration.....	32
3.5.2 Ethanol concentration.....	35
3.5.3 Cell concentration	35
3.5.4 Scanning Electron Microscopy (SEM).....	35
3.5.5 Mechanical properties measurement.....	35
3.5.6 BET surface analysis	36
3.5.7 Calculation of fermentation parameters	36
IV RESULTS AND DISCUSSION	38
4.1 Prestudy for the effect of alumina (Al_2O_3) in alginate bead on immobilization of <i>S. cerevisiae</i> M.30	39
4.2 Effect of bead diameter	47
4.3 Effect of alginate concentration.....	50
4.4 Effect of alumina (Al_2O_3) concentration.....	53
4.5 Modification of AEC carrier shape.....	56
4.6 Mechanical properties testing	59
4.7 Pore characteristics testing	60
4.8 Continuous ethanol fermentation in packed bed reactor.....	62

CHAPTER	Page
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	76
5.1 Conclusions	76
5.2 Recommendation	77
REFERENCES	78
APPENDICES	82
APPENDIX A: Experimental methods.....	83
APPENDIX B: Experimental data	97
APPENDIX C: List of publication	110
VITA	128

LIST OF TABLES

TABLE	Page
2.1	Study on ethanol production by immobilized cells 21
4.1	List of samples and labels for this study 39
4.2	Yield and end products of batch ethanol fermentation for 72 hours using the cultures of SC, EC and AEC 40
4.3	Yield and end products of batch ethanol fermentation for 72 hours using the cultures of AEC carrier with bead diameter of 2 mm, 4 mm and 6 mm 49
4.4	Yield and end products of batch ethanol fermentation for 72 hours using the cultures of AEC carrier with Na-alginate concentration of 1.5%, 2%, 2.5% and 3% 51
4.5	Yield and end products of batch ethanol fermentation for 72 hours using the cultures of AEC carrier with Al ₂ O ₃ concentration of 3.3%, 5.0%, 6.7% and 8.3% (w/v of alginate) 54
4.6	Yield and end products of batch ethanol fermentation for 72 hours using the cultures of AEC carrier with 2.5% of Na-alginate and 5% of Al ₂ O ₃ in square and sphere shape in shaking flask 57
4.7	Pore characteristics of EC carrier, AEC carrier and Al ₂ O ₃ powder 61
4.8	Effect of dilution rate on continuous ethanol production and ethanol productivity, average at steady state 64
4.9	Yeast cell concentrations in the PBR 68
4.10	The steady state ethanol and residual sugar concentration at 1 st - 5 th ports of the PBR, average from 3 replications at steady state 70
A-3.1	The quantity of Al ₂ O ₃ was added into the palm sugar medium 85
A-5.1	The concentration of Na-alginate was prepared for each experiment 88
A-7.3	Standard sucrose solution preparation 92

TABLE	Page
B-1.1 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in batch fermentation of SC, EC and ACE with 4mm bead diameter.....	97
B-1.2 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in batch fermentation of SC, EC and ACE with 6mm bead diameter.....	98
B-1.3 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in batch fermentation of ACE carrier with 2 mm, 4 mm and 6 mm bead diameter.....	98
B-1.4 Experimental data of immobilized cell and free cell concentration in batch fermentation of ACE carrier with 2 mm, 4 mm and 6 mm bead diameter	99
B-1.5 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in batch fermentation of ACE carrier with 1.5%, 2%, 2.5% and 3% (w/v) of Na-alginate	99
B-1.6 Experimental data of immobilized cell and free cell concentration in batch fermentation of ACE carrier with 1.5%, 2%, 2.5% and 3% (w/v) of Na-alginate	100
B-1.7 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in batch fermentation of ACE carrier with 3.3%, 5.0%, 6.7% and 8.3% (w/v of alginate) of Al ₂ O ₃	100
B-1.8 Experimental data of immobilized cell and free cell concentration in batch fermentation of ACE carrier with 3.3%, 5.0%, 6.7% and 8.3% (w/v of alginate) of Al ₂ O ₃	101
B-1.9 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in batch fermentation of ACE carrier with square and sphere shape.....	101
B-1.10 Experimental data of immobilized cell and free cell concentration in batch fermentation of ACE carrier with square and sphere shape.....	102
B-1.11 Experimental data of tensile strength and elongation at break of the square shape with EC and ACE carrier	102

TABLE	Page
B-1.12 Experimental data of BJH desorption pore distribution of EC carrier, AEC carrier and Al ₂ O ₃ powder.....	103
B-2.1 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in packed bed reactor of ACE carrier with dilution rate of 0.09, 0.16, 0.22 and 0.28 h ⁻¹ , stability test.....	105
B-2.2 Experimental data of free cell (effluent) concentration in packed bed reactor of ACE carrier with dilution rate of 0.09, 0.16, 0.22 and 0.28 h ⁻¹ , stability test.....	107
B-2.3 Experimental data of ethanol productivity in packed bed reactor of ACE carrier with dilution rate of 0.09, 0.16, 0.22 and 0.28 h ⁻¹	109

LIST OF FIGURES

FIGURE	Page
2.1 Embden-Meyerhof pathway	6
2.2 Entner–Doudoroff pathway	7
2.3 Basic methods of cell immobilization.....	11
2.4 Productivity versus dilution rate curve	14
2.5 Concentration profile with variable dilution rate	15
2.6 Packed bed reactor	16
2.7 Electrokinetic charge versus pH for γ - Al_2O_3 pellets and cells of <i>S. cerevisiae</i>	19
3.1 Auto pipette tip 1 ml, 5 ml and 10 ml	30
3.2 Schematic diagram of immobilized cell packed bed reactor.....	33
3.3 Schematic diagram of recycle process	34
4.1 Residual sugar concentration and ethanol concentration profile in fermentation of 4 mm bead diameter size	41
4.2 Residual sugar concentration and ethanol concentration profile in fermentation of 6 mm bead diameter size	42
4.3 Adsorbed cells on Al_2O_3 (x1500)	44
4.4 The overall view of $\text{AEC}_{6\text{ mm}}$ (x15)	45
4.5 The overall view of $\text{EC}_{2\text{ mm}}$ (x50)	45
4.6 Surface of $\text{AEC}_{6\text{ mm}}$ (x750).....	45
4.7 Surface of $\text{EC}_{2\text{ mm}}$ (x750).....	45
4.8 Cross section of $\text{AEC}_{6\text{ mm}}$ (x750).....	46
4.9 Cross section of $\text{EC}_{2\text{ mm}}$ (x750).....	46
4.10 Close look on $\text{AEC}_{6\text{ mm}}$ cross section (x7500)	46
4.11 Close look on $\text{EC}_{2\text{ mm}}$ cross section (x7500)	46
4.12 AEC carriers with bead diameter of 2 mm, 4 mm and 6 mm	48

FIGURE	Page
4.13 Effect of bead diameter on residual sugar concentration and ethanol concentration of AEC carrier	48
4.14 Effect of bead diameter on immobilized cell concentration and free cell concentration of AEC carrier	50
4.15 Effect of Na-alginate concentration on residual sugar concentration and ethanol concentration of AEC carrier	51
4.16 Effect of Na-alginate concentration on immobilized cell concentration and free cell concentration of AEC carrier.....	52
4.17 Effect of Al ₂ O ₃ concentration on residual sugar concentration and ethanol concentration of AEC carrier	54
4.18 Effect of Al ₂ O ₃ concentration on immobilized cell concentration and free cell concentration of AEC carrier.....	55
4.19 Effect of AEC carrier expansions on residual sugar concentration and ethanol concentration of AEC carrier.....	58
4.20 Effect of AEC carrier expansions on residual sugar concentration and ethanol concentration of AEC carrier.....	59
4.21 Tensile strength of AEC and EC carriers.....	60
4.22 Elongation at break of AEC and EC carriers	60
4.23 Pore volume versus average diameter of the carriers	61
4.24 Picture of PBR.....	63
4.25 The porous plastic material (PVA).....	63
4.26 Continuous fermentation in a PBR at the dilution rate of 0.09, 0.16, 0.22 and 0.28 h ⁻¹	65
4.27 Continuous fermentation on free cell (effluent) concentration in a PBR	65
4.28 Effect of dilution rate on ethanol productivity	67
4.29 Effect of dilution rate on the ethanol and residual sugar concentration	67

FIGURE	Page
4.30 The steady state ethanol concentration at 5 ports of the PBR, average from 3 replications at steady state.....	69
4.31 The steady state residual sugar concentration at 5 ports of the PBR, average from 3 replications at steady state.....	69
4.32 Square shape of AEC carrier at the completed gelation (width and length).....	72
4.33 Square shape of AEC carrier at the completed gelation (height)	72
4.34 Square shape of AEC carrier at the end of fermentation	72
4.35 The over view of AEC at the completed gelation (x35).....	73
4.36 The over view of AEC at the beginning of fermentation (x35)	73
4.37 Surface of AEC at the beginning of fermentation (x750).....	73
4.38 The over view of AEC at the end of fermentation (x35)	74
4.39 Surface of AEC at the end of fermentation (x750).....	74
4.40 Cross section of AEC at the completed gelation (x750).....	74
4.41 Cross section of AEC at the beginning of fermentation (x750).....	74
4.42 Cross section of AEC at the end of fermentation (x750).....	74
4.43 Cross section of AEC at the beginning of fermentation (x1500)	75
4.44 Cross section of AEC at the end of fermentation (x1500).....	75
4.45 Free cell in the effluent (x1500).....	75
4.46 Free cell in the reactor (x1500).....	75
B-1 Pore volume versus average diameter curve of Al ₂ O ₃ powder	104