

ตัวพยางค์เสริมโดยวบรวมสำหรับการตั้งชื่อในการหมักเอทานอล

นาย รุสดีอัลโต บุคิราฮาใจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-3413-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LOOFA REINFORCED GEL CARRIERS FOR YEAST IMMOBILIZATION
IN ETHANOL FERMENTATION

Mr. Rusdianto Budiraharjo

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 2006

ISBN 974-14-3413-8

Copyright of Chulalongkorn University

490251

LOOFA REINFORCED GEL CARRIERS FOR YEAST IMMOBILIZATION
IN ETHANOL FERMENTATION

Mr. Rusdianto Budiraharjo

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 2006

ISBN 974-14-3413-8

Copyright of Chulalongkorn University

รุตติอัลโต นูติราฮาโจ : ตัวพวงเจลเสริมโยบวบสำหรับการตรึงยีสต์ในการหมักเอทานอล (LOOFA REINFORCED GEL CARRIERS FOR YEAST IMMOBILIZATION IN ETHANOL FERMENTATION) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์, 106 หน้า. ISBN 974-14-3413-8

เพื่อลดผลกระทบจากวิกฤตการณ์ด้านพลังงาน เอทานอลได้ถูกนำมาใช้อีกครั้งเพื่อเป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันปิโตรเลียม โดยเมื่อพิจารณากระบวนการผลิตแบบต่างๆพบว่าการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงบนตัวพวงในการทำปฏิกิริยาให้ผลดีในหลายๆด้าน เช่น ให้อัตราการผลิตที่สูงและนำกลับมาใช้ใหม่ได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการประยุกต์ใช้เซลล์ที่ถูกตรึงบนตัวพวงยังไม่เหมาะสมเนื่องจากปัญหาหลายๆด้านรวมทั้งการจำกัดอัตราการแพร่ของสารผ่านตัวพวง และความแข็งแรงเชิงกลของตัวพวง ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้มีการพัฒนาตัวพวงแบบใหม่ที่เรียกว่า เจลเสริมโยบวบ ทำการประเมินความเหมาะสม และ เปรียบเทียบผลกับการใช้เซลล์แขวนลอยและการใช้เม็ดอัลจินทเป็นตัวพวง โดยใช้ยีสต์คอกเคกอน *Saccharomyces cerevisiae* M30 เป็นเซลล์สำหรับการผลิตเอทานอล การทดลองหมักทำในระบบขวดเขย่าที่อัตราการหมุนรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) และควบคุมอุณหภูมิหมักที่ 33 องศาเซลเซียส ใช้โยบวบ ไคโตเซน และ อัลจินท เป็นวัสดุในการสร้างตัวพวง โดยใช้น้ำตาลปีป และ กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำการเปรียบเทียบการตรึงเซลล์แบบดูดซับ (adsorption) และแบบ ล้อมไว้ภายใน (entrapment) และทำการหมักแบบครั้งคราวที่ทำซ้ำ (repeated batch) เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการนำกลับมาใช้ใหม่ ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าการใช้โยบวบอย่างเดียวไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์ นอกจากนี้พบว่าวิธีตรึงเซลล์โดยการล้อมไว้ภายในจะมีประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์ยีสต์มากกว่าการดูดซับ พบว่าตัวพวงที่ทำจากไคโตเซน ไม่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์เนื่องจากมีผลยับยั้งกิจกรรมของเซลล์ยีสต์ ในขณะที่พบว่าการใช้ตัวพวงโยบวบ-อัลจินท ทรงลูกบาศก์ (EALC) โดยวิธีตรึงเซลล์โดยล้อมไว้ภายในให้ผลดี แม้ว่าจะมีรูปทรงขนาดใหญ่ (8 x 8 x 1 มิลลิเมตร) แต่ก็ยังคงให้ผลของการหมักในเทอมของผลได้และอัตราการผลิตที่ดีเทียบเท่าการใช้เม็ดอัลจินท ขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร) จากการวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงให้เห็นว่า EALC มีโครงสร้างที่เป็นรูพรุนกว่าเม็ดอัลจินท ซึ่งความแตกต่างของลักษณะโครงสร้างน่าจะเป็นเหตุผลสำคัญในการลดการจำกัดของการถ่ายเทมวลแพร่ผ่าน นอกจากนี้เมื่อใช้ EALC ในการหมักแบบครั้งคราวที่ทำซ้ำโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนก็พบว่าให้ผลการหมักที่ดีเช่นกัน โดยระบบของกระบวนการผลิตเอทานอลที่ใช้ EALC จะมีความเสถียรกว่าระบบแบบเซลล์แขวนลอย และมีความแข็งแรงทางเชิงกลที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากความแข็งแรงของโครงค้ำยันที่เป็นเซลลูโลสภายใน จากผลที่ได้นี้ จึงควรมีการศึกษาในขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อการปรับปรุงศักยภาพของการนำ EALC ไปใช้เป็นตัวพวงในกระบวนการหมักเอทานอลต่อไป

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา.....2549.....

4770643821 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: IMMOBILIZED CELL/ LOOFA SPONGE / ALGINATE / CHITOSAN / ETHANOL / FERMENTATION / SACCHAROMYCES CEREVICEAE

RUSDIANTO BUDIRAHARJO : LOOFA REINFORCED GEL CARRIERS FOR YEAST IMMOBILIZATION IN ETHANOL FERMENTATION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MUENDUEN PHISALAPHONG, Ph.D., 106 pp. ISBN 974-14-3413-8.

To comply with energy crisis, ethanol has re-emerged as an alternative to, or extender for petroleum based liquid fuels. As compared to other methods, ethanol production using immobilized cell carriers offer many advantages such as high productivity and reusability. However, application of present cell carriers is often hindered by many problems including mass transfer limitation and low mechanical strength. Therefore, a new type of cell carrier called loofa reinforced gel was developed in this study and its feasibility for ethanol fermentation was evaluated and compared with suspended cell culture and alginate bead. Flocculating yeast strain, *Saccharomyces cereviceae* M30 was used as the ethanol producer. The fermentation was carried out in shake flask culture system at shaking frequency of 150 rpm and temperature of 33°C. Loofa sponge, chitosan, and alginate were used as materials for constructing the carrier. Palm sugar and molasses were used as carbon and energy source. The compared immobilization methods were cell adsorption and entrapment. Reusability of the carrier was evaluated by repeated batch mode. In the preliminary test, loofa sponge alone was found to be inadequate for yeast immobilization. Entrapment method was proven to be more effective than adsorption for yeast immobilization. Chitosan based carriers were unfavorable for yeast immobilization because of their inhibitory effect on cell activity. On the other hand, one type of alginate-loofa carrier namely entrapment alginate-loofa cube (EALC) exhibited promising results. Even though EALC had considerably large dimension (8 x 8 x 1 mm), its fermentation performance in term of ethanol yield and production rate was comparable with compact size alginate bead (\varnothing 2 mm). Under SEM analysis, it was shown that EALC possess a more porous structure than alginate bead. It is proposed that the structure distinction was the main factor responsible for the reduction of mass transfer limitation in EALC. Furthermore, EALC was successfully applied in repeated batch fermentation using molasses as the carbon source. During the repeated batch, ethanol production of EALC culture was more stable than suspended cell culture. With a strong matrix of cellulose inside, potential advantages including altered mechanical strength. Based on the results of this work, subsequent studies especially in larger scale is recommended to ameliorate the full potential of the new EALC carrier in ethanol fermentation.

Department.....Chemical Engineering.....Student's Signature.....

Field of Study.....Chemical Engineering.....Advisor's Signature.....

Academic Year.....2006.....

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my earnest gratitude to my advisor, Asst. 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 Assoc. 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 cereviceae* M30 strain.

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

Many thanks are also given to Mrs. Sunee Pakprapan and Ms. Bung-On Wattanaumpi (Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University) for their kind assistance in commencing Gas Chromatography and Scanning Electron Microscopy.

Financial supports from the Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University for providing the partial scholarship for my master study is highly appreciated.

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 IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Objectives.....	1
1.2 Expected benefits	2
1.3 Working scopes	2
CHAPTER II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	
2.1 Immobilized cell system.....	5
2.2 Type of immobilized cell carriers.....	7
2.2.1 Organic carriers.....	7
2.2.2 Inorganic carriers.....	8
2.2.3 Charged carriers.....	9
2.2.4 Porous carriers.....	9
2.3 Immobilization techniques.....	10
2.3.1 Attachment/adsorption to carrier.....	10
2.3.2 Covalent bonding/cross-linking.....	13
2.3.3 Microencapsulation.....	14
2.3.4 Membrane reactor.....	14
2.3.5 Entrapment within porous matrices.....	15
2.4 Review of ethanol fermentation by immobilized carriers.....	19
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	
3.1 Stock cell suspension.....	27
3.2 Carrier preparation.....	28

3.2.1 Loofa sponge carrier preparation.....	28
3.2.2 Alginate-loofa carrier preparation.....	29
3.2.3 Chitosan-loofa carrier preparation.....	30
3.3 Ethanol fermentation.....	30
3.4 Sample analysis.....	31

CHAPTER IV RESULT AND DISSCUSSION

4.1 Yeast immobilization by loofa sponge.....	34
4.2 Comparison of alginate and chitosan.....	34
4.3 Fermentation 1.....	35
4.4 Fermentation 2.....	38
4.5 Fermentation 3.....	47
4.6 Fermentation 4.....	55
4.7 Fermentation 5.....	57
4.8 Working scheme.....	70

CHAPTER V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

5.1 Conclusions.....	72
5.2 Recommendations.....	73

REFERENCES.....	74
-----------------	----

APPENDICES.....	78
-----------------	----

APPENDIX A Experimental methods.....	79
--------------------------------------	----

APPENDIX B Experimental data	91
------------------------------------	----

APPENDIX C Certificate of analysis of chitosan.....	100
---	-----

APPENDIX D List of publication.....	102
-------------------------------------	-----

VITA	106
------------	-----

LIST OF TABLES

	Page
Table 2.1: Studies on ethanol production by immobilized cells.....	20
Table 4.1: List of samples and labels for fermentation 1.....	36
Table 4.2: Final immobilized cell concentrations of fermentation 2.....	40
Table 4.3: Parameters of fermentation 3.....	47
Table 4.4: Parameter of fermentation 5 in main batch.....	63
Table 4.5: Parameter of fermentation 5 in repeated batch 1.....	63
Table 4.6: Parameter of fermentation 5 in repeated batch 2.....	64

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1: Diagram of batch, fed batch, and continuous process.....	3
Figure 2.2: Suspended cell fermentation with cell recycle.....	4
Figure 2.3: Flocculated cells fermenter.....	4
Figure 2.4: Immobilized cells bioreactor in fixed bed configuration.....	5
Figure 2.5: Productivity versus dilution rate curve.....	6
Figure 2.6: Concentration profile with variable dilution rate.....	6
Figure 2.7: Examples of organic materials for cell immobilization.....	8
Figure 2.8: Some inorganic materials for cell carriers.....	8
Figure 2.9: Porous carriers for cell immobilization.....	9
Figure 2.10: Description of some immobilization methods.....	10
Figure 2.11: Cells entrapment in gel matrix.....	16
Figure 2.12: Electron micrograph of chitosan bead.....	23
Figure 2.13: Picture of loofa plant.....	24
Figure 2.14: Loofa sponge.....	25
Figure 3.1: General flow diagram of experimental work.....	27
Figure 3.2: Methods of stock cell suspension preparation.....	28
Figure 3.3: Preparation of entrapment based carrier.....	30
Figure 3.4: Preparation of adsorption based carrier.....	30
Figure 4.1: Sugar concentration profile of fermentation 1.....	37
Figure 4.2: Sugar concentration profile of fermentation 2.....	38
Figure 4.3: Free cell concentration profile of fermentation 2.....	39
Figure 4.4: Ethanol concentration profile of fermentation 2.....	40
Figure 4.5: Overall view of AAB.....	41
Figure 4.6: Overall view of EAB.....	41
Figure 4.7: Surface of AAB.....	42
Figure 4.8: Surface of EAB.....	42
Figure 4.9: Yeast cells inside cavity of AAB.....	42
Figure 4.10: Cross section of AAB.....	43
Figure 4.11: Cross section of EAB.....	43

Figure 4.12: Close look on EAB cross section.....	43
Figure 4.13: Fiber part of AALB.....	43
Figure 4.14: Core of AALB fiber.....	43
Figure 4.15: Surface of EALB.....	44
Figure 4.16: EALB cross section.....	44
Figure 4.17: Cells in EALB cavity.....	44
Figure 4.18: Center of fiber of EALB.....	45
Figure 4.19: Yeast inside EALB.....	45
Figure 4.20: Exterior of EALC.....	45
Figure 4.21: Cross section of EALC.....	45
Figure 4.22: Exterior of EALC fiber.....	46
Figure 4.23: Cavity in EALC.....	46
Figure 4.24: Cross section of EALC.....	46
Figure 4.25: Cross section of EALC fiber.....	46
Figure 4.26: Free cell concentration of fermentation 3.....	48
Figure 4.27: Sugar concentration profile of fermentation 3.....	49
Figure 4.28: Ethanol concentration profile of fermentation 3.....	49
Figure 4.29: Yeast from SC broth.....	51
Figure 4.30: Whole view of EAB.....	51
Figure 4.31: Surface of EAB.....	51
Figure 4.32: Surface cavity of EAB.....	51
Figure 4.33: EAB surface cross section.....	52
Figure 4.34: EAB central cross section.....	52
Figure 4.35: Yeasts near EAB surface.....	52
Figure 4.36: Yeast in EAB center.....	52
Figure 4.37: Whole view of EALB.....	53
Figure 4.38: Surface of EALB.....	53
Figure 4.39: EALB surface cross section.....	53
Figure 4.40: Yeasts on EALB surface.....	53
Figure 4.41: Cross section of EALB.....	53
Figure 4.42: EALB central cross section.....	53
Figure 4.43: EALC view.....	54
Figure 4.44: Surface of EALC.....	54
Figure 4.45: Exposed fiber of EALC.....	54

Figure 4.46: Yeast on exposed fiber.....	54
Figure 4.47: Surface cavity of EALC.....	54
Figure 4.48: Cross section of EALC.....	55
Figure 4.49: Porous structure of EALC.....	55
Figure 4.50: EALC central cross section.....	55
Figure 4.51: Yeast at EALC center.....	55
Figure 4.52: Initial EAB cross section.....	56
Figure 4.53: Initial EALC cross section.....	56
Figure 4.54: EAB cross section after repeated batch 3.....	56
Figure 4.55: EALC cross section after repeated batch 3.....	56
Figure 4.56: Free cell concentration profile for main batch.....	57
Figure 4.57: Free cell concentration profile for repeated batch 1.....	58
Figure 4.58: Free cell concentration profile for repeated batch 2.....	58
Figure 4.59: Immobilized cell concentration profile for main batch.....	59
Figure 4.60: Immobilized cell concentration profile for repeated batch 1.....	59
Figure 4.61: Immobilized cell concentration profile for repeated batch 2.....	59
Figure 4.62: Sugar concentration profile for main batch.....	60
Figure 4.63: Sugar concentration profile for repeated batch 1.....	61
Figure 4.64: Sugar concentration profile for repeated batch 1.....	61
Figure 4.65: Ethanol concentration profile for main batch.....	62
Figure 4.66: Ethanol concentration profile for repeated batch 1.....	62
Figure 4.67: Ethanol concentration profile for repeated batch 2.....	63
Figure 4.68: Initial EAB surface.....	66
Figure 4.69: Initial EALC surface.....	66
Figure 4.70: Initial EAB surface cross section.....	66
Figure 4.71: Initial EALC surface cross section.....	66
Figure 4.72: Initial EAB central cross section.....	66
Figure 4.73: Initial EALC central cross section.....	66
Figure 4.74: EAB surface after main batch.....	67
Figure 4.75: EALC surface after main batch.....	67
Figure 4.76: EAB surface cross section after main batch.....	67
Figure 4.77: EALC surface cross section after main batch.....	67
Figure 4.78: EAB central cross section after main batch.....	68
Figure 4.79: EALC central cross section after main batch.....	68

Figure 4.80: EAB surface after repeated batch 1.....	68
Figure 4.81: EALC surface after repeated batch 1.....	68
Figure 4.82: EAB surface cross section after repeated batch 1.....	69
Figure 4.83: EALC surface cross section after repeated batch 1.....	69
Figure 4.84: EAB central cross section after repeated batch 1.....	69
Figure 4.85: EALC central cross section after repeated batch 1.....	69
Figure 4.86: EAB surface after repeated batch 2.....	70
Figure 4.87: EALC surface after repeated batch 2.....	70
Figure 4.88: EAB surface cross section after repeated batch 2.....	70
Figure 4.89: EALC surface cross section after repeated batch 2.....	70
Figure 4.90: EAB central cross section after repeated batch 2.....	70
Figure 4.91: EALC central cross section after repeated batch 2.....	70
Figure 4.92: Working scheme of experimental works.....	71