

**BIOBUTANOL PRODUCTION BY IMMOBILIZED *CLOSTRIDIUM*
BEIJERINCKII TISTR1461 ONTO CARBON MATERIALS**

Piyawat Chinwatpaiboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
Case Western Reserve University, and Institut Français du Pétrole

2015

I28368927

Thesis Title: Biobutanol Production by Immobilized *Clostridium beijerinckii* TISTR1461 onto Carbon materials

By: Piyawat Chinwatpaiboon

Program: Petrochemical Technology

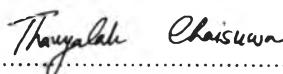
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai
Asst. Prof. Thanyalak Chaisuwan

Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science.


..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:


.....
(Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai)


.....
(Asst. Prof. Thanyalak Chaisuwan)


.....
(Assoc. Prof. Pramoch Rangsuvigit)


.....
(Asst. Prof. Woranart Jonglertjunya)

ABSTRACT

5671026063 Petrochemical Technology Program
Piyawat Chinwatpaiboon: Biobutanol Production by Immobilized
Clostridium beijerinckii TISTR1461 onto Carbon Materials
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai, and Asst.
Prof. Thanyalak Chaisuwan 61 pp.
Keywords: ABE fermentation/ Activated carbon/ *Clostridium beijerinckii*/
Immobilization/ Treatment

Biobutanol is considered as one of the most attractive biofuels because it has an energy density closer to gasoline. It can be produced via Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation using Clostridium species. There are numerous attempts to improve butanol production via cell immobilization to increase cell density and productivity. Furthermore, cell immobilization can protect microbial cells from environmental stresses and operate for a long period with stable operation. Activated carbon, a highly porous material with a large adsorption capacity, was used as an immobilized material for the fermentation process. *Clostridium beijerinckii* TISTR1461 was adsorbed on the activated carbon, which was treated with various chemicals. The DARCO® activated carbon was treated by different chemicals; nitric acid, sodium hydroxide, and 3-aminopropyltriethoxysilane. The results were analyzed and compared to a free cell system. The aminosilane treatment provided the highest butanol concentration of 10.66 g/l.

บทคัดย่อ

ปีบัณฑ์ ชินวัฒน์พูนูลย์ ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอดีเซลโดย *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ตึ่งเชลล์บนวัสดุกรอง (Biobutanol Production by Immobilized *Clostridium beijerinckii* TISTR1461 onto Carbon Materials) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. อาภาณี เหลืองฤทธิ์ชัย และ พศ. ดร. ธัญญลักษณ์ ฉายสวารรณ์ 61 หน้า

ในปัจจุบันการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นพลังงานทดแทนมีบทบาทสำคัญมากขึ้น วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางชีวภาพได้ออกหนึ่งที่นำสู่ในนักวิทยาศาสตร์และนักวิศวกรรมที่สนใจ การศึกษาและพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพนี้ต้องอาศัยกระบวนการชีวภาพ เช่น การหมักดอง หรือการเติบโตของเชื้อรา ที่สามารถเปลี่ยนเศษอาหาร วัสดุอินทรีย์ หรืออินทรีย์ เป็นเชื้อเพลิงที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น แก๊สโซฮอล์ ไบโอดีเซล หรือเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์หัวเทียน กระบวนการนี้ต้องอาศัยการควบคุมหลายประการ เช่น ปริมาณเชื้อเพลิงที่ใช้ ระยะเวลาการหมัก ความเร็วของการหมัก และอุณหภูมิ ที่เหมาะสม รวมถึงการตรวจสอบคุณภาพของเชื้อเพลิงที่ได้มา ทั้งนี้จะต้องคำนึงถึงความปลอดภัย ความยั่งยืน และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนต้นทุนการผลิต ที่ต้องคำนึงถึงในระยะยาว ไม่ว่าจะเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่มาจากพืช หรือเชื้อเพลิงชีวภาพที่มาจากสัตว์ เช่น ไก่ แพะ หรือสัตว์ป่า ที่มีความสามารถในการสร้างเชื้อเพลิง แต่ต้องคำนึงถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การปลูกพืช หรือการเลี้ยงสัตว์ ที่ต้องคำนึงถึงความยั่งยืน ความปลอดภัย และผลกระทบต่อสุขภาพ ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน สามารถทดแทนเชื้อเพลิงฟอสฟอรัส ที่กำลังจะหมดไปในไม่遠ว่าง ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน สามารถทดแทนเชื้อเพลิงฟอสฟอรัส ที่กำลังจะหมดไปในไม่遠ว่าง

ACKNOWLEDGEMENTS

This research work was partially supported by the Ratchadapisek Sompote Endowment Fund (2013), Chulalongkorn University (CU-56-900-FC) and Thailand Research Fund (IRG5780012). Moreover, this work was financially supported by Nation Research University Project, Office of Higher Education Commission (WCU-037-EN-57), The Petroleum and Petrochemical College and The National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand.

I would like to thank Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai for her internal review of this paper and helpful suggestions. Her suggestion helped me in all the time of research and writing of this thesis. Furthermore, my sincere thanks also goes to Asst. Prof. Thanyalak Chaisawan, and Assoc. Prof. Pramoch Rangsuvigit for their kindness being my co-advisor and committee. Moreover, I have to thank Asst. Prof. Woranart Jonglertjanya for her kindness sharing C18 column HPLC and being my committee.

Finally, I would like to special thank for Dr. Akarin Boonsombuti who is a technical assistance. A special thanks to my parents and my friends for all their support and encouragement throughout the period of this research. Especially, I would like to thanks Mr. Phitsanu Teeraphapkul and Mr. Chayut Yaempho for support me to do my experiment.

o

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	viii
List of Figures	ix

CHAPTER

I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEW	3
2.1 Biobutanol	3
2.2 Treatment	8
2.3 Fermentation	14
III EXPERIMENTAL	25
3.1 Materials and Chemicals	25
3.2 Equipments	25
3.3 Experimental Procedures	26
3.3.1 Preparation of Immobilized Material	26
3.3.2 Medium Preparation	26
3.3.3 Inoculum Development	27
3.3.4 Fermentation	27
3.4 Analytical Methodology	27
3.4.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	27
3.4.2 UV-VIS Technique (UV)	28
3.4.3 Scanning Electron Microscope (SEM)	28

CHAPTER	PAGE
3.4.4 Surface Area Analysis (BET)	28
3.4.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	29
IV RESULTS AND DISCUSSION	30
4.1 Material Characterization	30
4.2 ABE Fermentation by <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR1461	36
4.2.1 ABE Fermentation with Acid-Base Treatment	36
4.2.2 ABE Fermentation with Amine-Base Treatment	40
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	45
5.1 Material Characterization	45
5.2 Fermentation	46
REFERENCES	48
APPENDICES	51
Appendix A The Analysis Calculation	51
Appendix B The Physical Properties of Various Activated Carbon	52
Appendix C The Fermentation Results	56
CURRICULUM VITAE	61

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 • Fermentation of <i>Clostridium sp.</i>	6
2.2 Average pore diameter, mesoporosity and production yield of mesoporous activated carbon	9
2.3 List of carbon in the study	11
2.4 Surface properties of studied carbon	11
2.5 The relative peak area percentage of carbon (C 1s) peaks	14
2.6 ABE production from different sugar sources (60 g/l) with free and immobilized <i>Clostridium acetobutylicum</i> cells at 37 °C	15
2.7 Various solid immobilized by <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824 in batch culture on two different medium	17
4.1 Physical properties of untreated and treated activated carbons	32
4.2 EDX Atomic percentage of various activated carbons	36
5.1 pH broth of every ABE fermentation systems at stationary phase	46
B1 The effect of butanol adsorption on immobilized materials	55
C1 Butanol concentrations as function of time all ABE fermentations	59
C2 Butanol concentrations from previous work	60

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Metabolic pathways of <i>Clostrium acetobutylicum</i> ATCC 824 which enzymes are abbreviated as follows: PTA, phosphotransacetylase; AK, acetate kinase; CoAT, CoA transferase; PTB, phosphotransbutyrylase; BK, butyrate kinase; BADH, butyraldehyde dehydrogenase; BDH, butanol dehydrogenase	4
2.2 Production removal techniques	7
2.3 Adsorption and Entrapment of Cell immobilization.	8
2.4 Scanning electron micrograph images (a) The precarbonized sample (MAC); (b) Activated carbon sample (MAC ₉₀₀); (c) <i>Bacillus</i> sp. immobilized in the mesoporous activated carbon.	10
2.5 SEM images: (a) DI-AC; (b) SH-AC; (c) HA37-AC; and (d) NA69-AC.	12
2.6 Change in glucose concentration, pH and solvent production with time during continuous culture with <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824 attached to coke as a support and using a semidefined medium at a dilution rate of 0.1 h ⁻¹ . Δ—Δ, total solvents; ○—○, pH; •—•, influent glucose; □---□, effluent glucose.	18
2.7 Glucose and ABE solvent results of free cells and immobilized cells (on bricks) with batch fermentation.	19
2.8 Effects of brick size to ABE fermentation at 60 g/l of glucose which used 5 g brick in 25 ml medium.	20
2.9 Results of repeated batch with brick immobilization (containing 60 g/l of initial glucose and 60 h of cultivation of each batch).	21

FIGURE	PAGE
2.10 Solvents and acids in the effluent of continuous fermentation at the dilution rate of 0.054 h^{-1} and 0.108 h^{-1} . The dash line indicated the shift of dilution rate from 0.054 h^{-1} to 0.108 h^{-1} .	22
2.11 Scanning Electron Micrographs of immobilized cells of <i>C. beijerinckii</i> BA101 (a) Clay brick 3000x, (b) Immobilized cells 3000x, (c) Immobilized cells 5669x.	23
4.1 SEM photographs of activated carbon samples (a) DI-AC; (b) NA-AC; (c) NASH-AC; (d) SH-AC; (e) AS-AC(R); and (f) SH-AC(R) at 700x and 1000x magnification.	31
4.2 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) (a) Schematic structure; and (b) Mechanism of APTES at activated carbon surface.	33
4.3 FTIR spectra of various activated carbons (a) Acid-base treatment; and (b) Amine-base treatment.	33
4.4 FTIR intensity at wavenumber 1570 and 3400 cm^{-1} obtained from various type of treated activated carbons.	34
4.5 Adsorption-desorption isotherms of untreated and treated activated carbons (a) DI-AC; (b) NASH-AC; and (c) AS-AC(R).	35
4.6 Glucose profiles of acid-base immobilized activated carbon fermentation.	38
4.7 Cell growth profiles of acid-base immobilized activated carbon fermentation.	38
4.8 pH profiles of acid-base immobilized activated carbon fermentation.	39
4.9 Butanol profiles of acid-base immobilized activated carbon fermentation.	39

FIGURE	PAGE
4.10 Glucose profiles of amine-base immobilized activated carbon fermentation.	40
4.11 Cell growth profiles of amine-base immobilized activated carbon fermentation.	41
4.12 pH profiles of amine-base immobilized activated carbon fermentation.	43
4.13 Butanol profiles of amine-base immobilized activated carbon fermentation.	43
4.14 SEM photographs of <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR1461 immobilized on treated activated carbons (a) NASH-AC; (b) SH-AC; (c) AS-AC(R); and (d) SH-AC(R) at 7500x magnification.	44
4.15 Butanol concentration adsorption of immobilized materials adsorption	44
5.1 Comparison of coefficient butanol productivity factor.	47
B1 Adsorption-desorption isotherms of untreated and treated activated carbons (a) SH-AC; and (b) SH-AC(R).	52
B2 Pore size distribution of various activated carbons (a) DI-AC; (b) NASH-AC; (c) SH-AC; (d) AS-AC(R); and (e) SH-AC(R).	53
C1 Acid profiles of acid-base immobilized activated carbon fermentation (a) Total acid profile; (b) Acetic acid profile; and (c) Butyric acid profile.	56
C2 Acid profiles of amine-base immobilized activated carbon fermentation (a) Total acid profile; (b) Acetic acid profile; and (c) Butyric acid profile.	58