

ความสามารถในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดยระบบยีสต์ผสมของ *Saccharomyces cerevisiae* M30 และ *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042



นาย เอกสิทธิ์ เอียคปุม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ETHANOL PRODUCTIVITY FROM CANE MOLASSES BY MIXED CULTURE
SYSTEM OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* M30 AND *KLUYVEROMYCES*
MARXIANUS DMKU 3-1042

Mr. Akekasit Eiadpum

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 2009
Copyright of Chulalongkorn University

520699

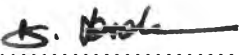
Thesis Title ETHANOL PRODUCTIVITY FROM CANE MOLASSES
BY MIXED CULTURE SYSTEM OF *SACCHAROMYCES*
CESEVISIAE M30 AND *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*
DMKU 3-1042

By Mr. Akekasit Eiadpum

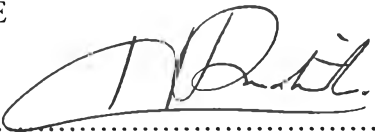
Field of Study Chemical Engineering

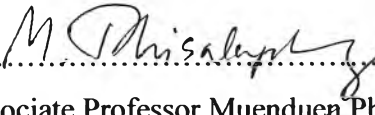
Thesis Advisor Associate Professor Muenduen Phisalaphong, Ph.D.


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

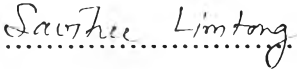

..... Dean of the Faculty of Engineering
(Associate Professor Boonsom Lerdhirunwong, Dr.Ing.)

THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Sarawut Rimdusit, Ph.D.)


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


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


..... External Examiner
(Professor Savitree Limtong, D.Eng.)

เอกสิทธิ์ เอียดปุ่น: ความสามารถในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดยระบบยีสต์ผสมของ *Saccharomyces cerevisiae* M30 และ *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. (ETHANOL PRODUCTIVITY FROM CANE MOLASSES BY MIXED CULTURE SYSTEM OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* M30 AND *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* DMKU 3-1042) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์, 117 หน้า.

พลังงานหมยวนเอทานอลได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์หลายประการ เช่น เป็นพลังงานสะอาดและผลิตได้จากการหมักชีวมวล อุตสาหกรรมการหมักโดยทั่วไปมักจะใช้เซลล์ยีสต์ในการหมัก ส่วนมากแล้วจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีความเหมาะสมในการเจริญเติบโตที่สภาวะอุณหภูมิในช่วง 25 - 35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงมีข้อดีหลายอย่างเช่นสามารถทำงานในช่วงอุณหภูมิที่กว้างขึ้น ลดต้นทุนการหล่อเย็น ลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน ดังนั้นกระบวนการนี้จึงเหมาะสมสำหรับการใช้ในประเทศเขตร้อนที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงตลอดทั้งปี ดังนั้นในงานนี้จึงทำการศึกษการหมักเอทานอลโดยยีสต์ทนอุณหภูมิสูง *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 และ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ในระบบเซลล์เดี่ยวและระบบเซลล์ผสม ทำการตรวจสอบโดยใช้ระบบเซลล์แขวนลอยและระบบเซลล์ตรึงภายในแอลจีเนทเสริมโยบวบ และเซลล์ตรึงบนเส้นใยของรังไหมบางโดยใช้น้ำอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตรพบว่าการหมักเอทานอลโดยระบบเซลล์ผสมที่ถูตรึงโดยใช้รังไหมบางเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะโดยใช้ขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร พบว่าการตรึงเซลล์ของระบบเซลล์ผสม สามารถผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงทั้งจากน้ำอ้อยและกากน้ำตาลซึ่งได้ความเข้มข้นเอทานอลถึง 71.84 - 80.65 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิดำเนินการ 37 - 40 องศาเซลเซียส สำหรับการ ใช้การตรึงเซลล์ระบบเซลล์ผสมบนรังไหมบางในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบคขนาด 1 ลิตร สำหรับการหมักแบบต่อเนื่องภายใต้สภาวะไม่ควบคุมอุณหภูมิ พบว่าได้ผลผลิตสูงสุดที่ 14.18 ± 0.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่อัตราการเจือจาง 0.21 ต่อชั่วโมง โดยได้ความเข้มข้นของเอทานอล 70.88 ± 0.31 กรัมต่อลิตร และได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 86.33 ± 1.34 กรัมต่อลิตร เมื่อดำเนินการที่อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง การตรึงเซลล์โดยระบบผสมที่สามารถรักษาเซลล์ให้มีชีวิตและทำงานได้ปกติในขณะที่วัสดูดึงเซลล์ มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีความเสถียรและมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการใช้งานในระยะยาว สืบเนื่องจากผลการทดลองจึงควรมีการทดสอบการผลิตในขนาดใหญ่ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....

ปีการศึกษา.....2552.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

เอกสิทธิ์ เอียดปุ่น

Wan HS

5170654421 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : IMMOBILIZED CELL/ CANE MOLASSES/ MIXED CULTURE/ ETHANOL/ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*/ *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*/

AKEKASIT EIADPUM: ETHANOL PRODUCTIVITY FROM CANE MOLASSES BY MIXED CULTURE SYSTEM OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* M30 AND *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* DMKU 3-1042. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. MUENDUEN PHISALAPHONG, Ph.D., 117 pp.

A renewable energy, ethanol gains more interest because of its benefits such as clean energy and production from biomass fermentation. Industrial fermentation is typically performed using yeast cells. Most of these organisms grow optimally at a temperature range of 25-35°C. On the other hand, ethanol fermentation at high temperature offers many advantages since it can work in a wide temperature range, reduce cooling cost and reduce risk of contamination. The later process, therefore, is suitable for the use in tropical countries, where the average temperature is high throughout the year. Hence, in the present work, ethanol fermentations using thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 and *Saccharomyces cerevisiae* M30 in monoculture and mixed cultures were studied. The cultures in forms of suspended cells and immobilized cells by entrapment within the alginate-loofa matrix (ALM) and adsorption on the fibrous of thin shell silk cocoon were used for the investigation with sugar cane juice/cane molasses as a carbon source at the initial sugar concentration of 220 g/l. The ethanol fermentation by the mixed culture system using thin shell silk cocoon as a carrier was found to be the most effective system. Under batch fermentation in 500 ml Erlenmeyer shaking-flasks, the immobilized mixed culture was found capable of highly efficient ethanol production from both sugar cane juice and cane molasses with the final ethanol concentration of 71.84-80.65 g/l at operating temperature of 37-40°C. Under uncontrolled temperature condition in 1-L continuous packed-bed reactor using the mixed culture immobilized on thin shell silk cocoon fibers, the optimum of productivity (14.18 ± 0.06 g/l h) was obtained at 0.21 h^{-1} of dilution rate with ethanol concentration of 70.88 ± 0.31 g/l, whereas, the maximum of ethanol concentration (86.33 ± 1.34 g/l) was obtained at 0.10 h^{-1} of dilution rate. The immobilized mixed culture was able to remain viable and functioned normally as well as the carrier had good mechanical strength, stability and high potential for the application for long term use. Based on the results of this work, a large scale study is recommended in order to develop an industrial production process.

Department :.....Chemical Engineering..

Field of Study :...Chemical Engineering..

Academic Year :.2009.....

Student's Signature : Akekasit Eiadpum

Advisor's Signature : Muenduen Phisalaphong

ACKNOWLEDGEMENTS

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 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 and *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 strain.

Thanks to all of my thesis committee, Assoc. Prof. Sarawut Rimdusit, Ph.D., Prof. Savitree Limtong, D.Eng. and Assoc. 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).

A financial support from the National Research Council of Thailand (NRCT) 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 (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
1.1 Objectives	2
1.2 Expected benefits	2
1.3 Working scopes.....	2
 II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	4
2.1 Ethanol fermentation	4
2.1.1 Raw materials.....	4
2.1.2 Microorganisms.....	4
2.2 Cell immobilization.....	8
2.2.1 Cell immobilization carriers and techniques.....	10
2.2.1.1 Surface attachment.....	11
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	21
3.1 Materials	21
3.1.1 Microbial Strains	21
3.1.2 Chemicals.....	21
3.1.3 Equipments	22
3.2 Methods for fermentation	22
3.2.1 Methods for stock cell suspension preparation	22
3.2.2 Methods for immobilization and coimmobilization	23
3.2.2.1 Thin shell silk cocoon	23
3.2.2.1 Aginate-loofa	24
3.2.3 Methods for ethanol fermentation	25
3.2.3.1 Batch Fermentation.....	25
3.2.3.1 Continuous Fermentation	25
3.2.4 Analytical methods.....	26
3.2.3 Calculation of fermentation parameters	27
IV RESULTS AND DISCUSSION	28
4.1 Batch fermentation of suspended cells: monoculture vs. mixed culture	28
4.2 Batch fermentation of immobilized cells: monoculture (<i>K. marxianus</i> DMKU 3-1042) vs. mixed culture (<i>S. cerevisiae</i> M30 and <i>K.</i> <i>marxianus</i> DMKU 3-1042).....	36
4.3 Continuous ethanol fermentation in packed bed reactor	41
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	59
5.1 Conclusions	59
5.2 Recommendations	59

CHAPTER	PAGE
REFERENCES	61
APPENDICES	67
APPENDIX A: Experimental methods.....	68
APPENDIX B: Experimental data.....	79
APPENDIX C: List of publication	106
VITA	117

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
3.1	The chemicals used in this experiment..... 21
4.1	List of samples and labels for this study 29
4.2	Batch fermentation of ethanol production at constant temperature of 33°C..... 34
4.3	Batch fermentation of ethanol production at constant temperature of 37°C..... 34
4.4	Batch fermentation of ethanol production at constant temperature of 40°C..... 35
4.5	Batch fermentation of ethanol production at constant temperature of 45°C..... 35
4.6	Batch fermentation of ethanol production by immobilized cells at constant temperature of 37°C..... 39
4.7	Batch fermentation of ethanol production by immobilized cells at constant temperature of 40°C..... 40
4.8	Continuous fermentation on free cell (effluent) concentration in a PBR..... 45
4.9	Effect of dilution rate on continuous ethanol production and ethanol productivity, average at steady state 46
4.10	Temperature profiles of the system within the column at 1 st - 5 th sensor ports of the PBR..... 53
4.11	Yeast cell concentrations at the end of continuous fermentation 55
A-7.3	Standard sucrose solution preparation..... 76
B-1.1	Data of batch fermentation of ethanol production in sugar cane juice by SS, SK and SM system at 33°C 79
B-1.2	Data of batch fermentation of ethanol production in cane molasses

TABLE	PAGE
by SS, SK and SM system at 33°C	80
B-1.3 Data of batch fermentation of ethanol production in sugar cane juice by SS, SK and SM system at 37°C	80
B-1.4 Data of batch fermentation of ethanol production in cane molasses by SS, SK and SM system at 37°C	81
B-1.5 Data of batch fermentation of ethanol production in sugar cane juice by SS, SK and SM system at 40°C	81
B-1.6 Data of batch fermentation of ethanol production in cane molasses by SS, SK and SM system at 40°C	82
B-1.7 Data of batch fermentation of ethanol production in sugar cane juice by SS, SK and SM system at 45°C	82
B-1.8 Data of batch fermentation of ethanol production in cane molasses by SS, SK and SM system at 45°C	83
B-2.1 Data of ethanol production from sugar cane juice by immobilized cell in batch fermentation of AL and TSSC carrier at 37°C	84
B-2.2 Data of ethanol production from cane molasses by immobilized cell in batch fermentation of AL and TSSC carrier at 37°C	85
B-2.3 Data of ethanol production from sugar cane juice by immobilized cell in batch fermentation of AL and TSSC carrier at 40°C	86
B-2.4 Data of ethanol production from cane molasses by immobilized cell in batch fermentation of AL and TSSC carrier at 40°C	87
B-3.1 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in packed bed reactor of TSSC carrier with dilution rate of 0.10, 0.21, 0.30 and 0.41 h ⁻¹ for cane molasses medium, and with dilution rate 0.10, 0.21 and 0.30 h ⁻¹ for sugar cane juice medium	88
B-3.2 Data of free cells concentration leaving the reactor	90
B-3.3 Experimental data of ethanol productivity average at steady state in	

TABLE	PAGE
packed bed reactor of TSSC carrier with dilution rate of 0.10, 0.21, 0.30 and 0.41 h ⁻¹	93
B-3.4 Experimental data of temperature profiles	95
B-4.1 Experimental data of ethanol and residual sugar concentration in packed bed reactor of TSSC carrier with dilution rate of 0.11, 0.18, 0.20, 0.30 and 0.40 h ⁻¹ for cane molasses medium	100
B-4.2 Data of free cells concentration leaving the reactor	102
B-4.3 Experimental data of ethanol productivity in packed bed reactor of TSSC carrier with dilution rate of 0.11, 0.18, 0.20, 0.30 and 0.40 h ⁻¹ , at temperature of 37°C	104

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.....	15
2.5 Concentration profile with variable dilution rate.....	15
2.6 Packed bed reactor	16
3.1 Diagram for methods of stock cell suspension preparation	23
3.2 Preparation of thin shell silk carrier	24
3.3 Preparation of Alginate-Loofa carrier	24
4.1 Ethanol and residual sugar concentration profiles in Sugar cane juice and Cane molasses medium at constant temperature of 33°C.....	30
4.2 Ethanol and residual sugar concentration profiles in Sugar cane juice and Cane molasses medium at constant temperature of 37°C.....	31
4.3 Ethanol and residual sugar concentration profiles in Sugar cane juice and Cane molasses medium at constant temperature of 40°C.....	32
4.4 Ethanol and residual sugar concentration profiles in Sugar cane juice and Cane molasses medium at constant temperature of 45°C.....	33
4.5 Ethanol and residual sugar concentration profiles in Sugar cane juice and Cane molasses medium at constant temperature of 37°C	37
4.6 Ethanol and residual sugar concentration profiles in Sugar cane juice and Cane molasses medium at constant temperature of 40°C	38
4.7 Picture of PBR	42

FIGURE	PAGE
4.8 Continuous fermentation in a PBR at the dilution rate of 0.10, 0.21, 0.30 and 0.41 h ⁻¹	44
4.9 Effect of dilution rate on ethanol productivity	47
4.10 The ethanol productivities of ethanol fermentation at steady state for the cane molasses medium	47
4.11 The ethanol productivities of ethanol fermentation at steady state for the sugar cane juice medium	48
4.12 Temperature profiles of the system at the positions within the column of 5 positions for cane molasses	50
4.13 Temperature profiles of the system at the positions within the column of 5 positions for sugar cane juice.....	52
4.14 Effect of dilution rate on temperature profile of the system and productivity at the 2 nd sensor port for feedstock as cane molasses medium	54
4.15 Effect of dilution rate on temperature profile of the system and productivity at the 2 nd sensor port for feedstock as sugar cane juice medium	54
4.16 TSSC outer surface before fermentation	56
4.17 TSSC outer surface at the end of continuous fermentation	56
4.18 TSSC inner surface before fermentation	57
4.19 TSSC inner surface at the end of continuous fermentation	57
4.20 TSSC cross section before fermentation	57
4.21 TSSC cross section at the end of continuous fermentation	57

FIGURE	PAGE
4.22 Free cell in reactor (x 750)	58
4.23 Free cell in reactor (x 2,000)	58
4.24 Free cell in the effluent (x 750)	58
4.25 Free cell in the effluent (x 2,000).....	58
B-3.1 Experimental data of standard curve for temperature; 1 st sensor port	93
B-3.2 Experimental data of standard curve for temperature; 2 nd sensor port.....	94
B-3.3 Experimental data of standard curve for temperature; 3 rd sensor port	94
B-3.4 Experimental data of standard curve for temperature; 4 th sensor port	95
B-3.5 Temperature profile at the 2 nd sensor port as compared to productivity... 99	
B-4.1 Continuous fermentation in a PBR at dilution rate of 0.11, 0.18, 0.20, 0.30 and 0.40 h ⁻¹	105