

**BIOBUTANOL PRODUCTION BY IMMOBILIZED *CLOSTRIDIUM*  
*BEIJERINCKII* TISTR 1461 ONTO POROUS MATERIALS**

Rapeephat Vichuviwat

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment 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  
2014

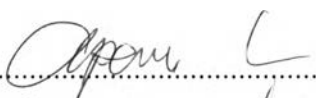
**Thesis Title:** Biobutanol Production by Immobilized *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 onto Porous Materials  
**By:** Rapeephat Vichuviwat  
**Program:** Petrochemical Technology  
**Thesis Advisors:** Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai  
Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit

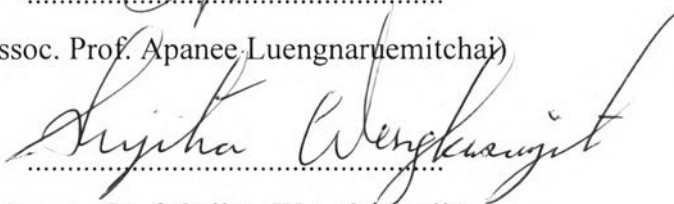
---


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

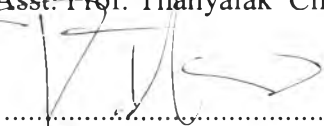
  
..... College Dean  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

**Thesis Committee:**

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

  
.....  
(Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit)

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

  
.....  
(Dr. Ruengsak Thitiratsakul)

## ABSTRACT

5571019063: Petrochemical Technology Program  
Rapeephat Vichuwat: Biobutanol Production by Immobilized  
*Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 onto Porous Materials.  
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai and  
Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit 85 pp.  
Keywords: Butanol/ ABE fermentation / Immobilization / *Clostridium  
beijerinckii*

Butanol is an attractive fuel since it can be used as a fuel additive to reduce petroleum fuel consumption. However, traditional acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation has limitations—low productivity, butanol toxicity on microorganisms, and unstable production. Therefore, to enhance ABE fermentation, the cell immobilization on porous materials has been applied. Immobilized cells have been used to maintain high cell concentrations and stability of cell operation during the fermentation process. Consequently, this research aimed to study ABE fermentation by immobilized *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 onto different porous materials. Brick, activated carbon, and zeolite were used as carriers for immobilization. Fermented product samples were collected at different times on stream to observe the productivity of the immobilized cells fermentation, and compared with the free mobilized cells fermentation process. Butanol production from immobilized cells fermentation on brick and zeolite were 9.5% and 62.0% higher, respectively, than free mobilized cells fermentation. Whereas, butanol production from immobilized cells fermentation on activation carbon was found to be lower than free mobilized cells 45.0%. There observed that the effect of materials to medium pH has play role on solvent production. Repeat batch fermentation with immobilized cell on zeolite for investigate cell efficiency was substantial and maintained after seven sequential reuse cycles. The average butanol production amounted to 6.5 g/l. Scanning electron microscopy (SEM) demonstrated that the *Clostridium beijerinckii* cells were present on the surface and in the pores of the materials.

## บทคัดย่อ

รพีพัฒน์ วิชชุวีรวรรณ : การผลิตบิวทานอลชีวภาพโดยการตรึง *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ลงบนวัสดุรูพรุน (Biobutanol Production by Immobilized *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 onto Porous Materials) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย และ รศ.ดร. สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ 85 หน้า

บิวทานอลเป็นพลังงานเชื้อเพลิงที่กำลังได้รับความสนใจเนื่องด้วยความสามารถที่ใช้เป็นสารตัวเติมในเชื้อเพลิงเพื่อลดการใช้เชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม อย่างไรก็ตามการหมักเพื่อผลิต อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE) แบบดั้งเดิมนั้นมีข้อจำกัดหลายประการ อาทิ ความสามารถในการผลิตที่ต่ำ, ความเป็นพิษของบิวทานอลต่อเชื้อจุลินทรีย์ และ ความไม่เสถียรในการผลิต ด้วยเหตุดังกล่าว เพื่อการปรับปรุงกระบวนการหมัก ABE การตรึงเซลล์ลงบนวัสดุรูพรุนจึงได้นำมาประยุกต์ใช้ การตรึงเซลล์สามารถใช้เพื่อเพิ่มความหนาแน่นและจำนวนเซลล์ อีกทั้งยังสามารถช่วยในเรื่องความเสถียรของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักอีกด้วย ดังนั้นจึงนำมาซึ่งวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ การศึกษาการหมัก ABE ด้วยวิธีการตรึง *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ลงบนวัสดุรูพรุนชนิดต่างๆ โดยอิฐ, ถ่านกัมมันต์ และ ซีโอไลต์ ถูกนำมาใช้เป็นวัสดุที่ใช้การตรึงเซลล์ในการศึกษานี้ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากการหมักจะถูกเก็บในเวลาที่แตกต่างกันเพื่อศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบตรึงเซลล์และกระบวนการหมักแบบเซลล์เคลื่อนที่โดยอิสระ บิวทานอลที่ผลิตได้จากการหมักแบบตรึงเซลล์ลงบนอิฐและซีโอไลต์ได้ความเข้มข้นมากกว่าการหมักแบบเซลล์เคลื่อนที่อิสระเป็น 9.5% และ 62% ตามลำดับ ในขณะที่บิวทานอลที่ผลิตได้จากการตรึงเซลล์ลงบนถ่านกัมมันต์นั้นน้อยกว่าบิวทานอลจากการหมักแบบเซลล์เคลื่อนที่อิสระเป็น 45% จากการศึกษาพบว่าวัสดุที่ใช้มีผลต่อค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายในการหมักซึ่งจะมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ อีกทั้งการหมักด้วยวิธีการตรึงเซลล์ลงบนซีโอไลต์แบบใช้ซ้ำเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเซลล์ที่ยังคงอยู่หลังจากการใช้ซ้ำเจ็ดรอบได้ค่าเฉลี่ยบิวทานอลที่ผลิตได้คือ 6.5 กรัม/ลิตร จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์ *Clostridium beijerinckii* ได้ปรากฏอยู่ที่บนผิวและรูพรุนของวัสดุ

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my grateful appreciation to Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai for her support and advice throughout this thesis work. I also would like to express my sincere thanks to Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit, Asst. Prof. Thanyalak Chaisuwan, and Dr. Ruengsak Thitiratsakul for their kindness being my co-advisor and committee. In addition, I would like to special thank for Dr. Akarin Boonsombuti who fully supported and gave useful suggestions for experimental problem solving to me.

This thesis work would have not been successful without the assistance from The Petroleum and Petrochemical College, The Center of Excellence on Petrochemical and Materials Technology, and National Research University Project of ChE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (EN269B-56) that provided all facilities and funding support.

Finally, I most gratefully acknowledge my family and my friends for all their support and encouragement throughout the period of this research.

## TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	x
List of Figures	xi
 <b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
 <b>II LITERATURE REVIEW</b>	
2.1 Butanol	3
2.1.1 Properties of Butanol	3
2.1.2 Butanol as fuel	5
2.2 Biobutanol	6
2.2.1 Biological Process	6
2.3 Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation	7
2.3.1 Microbes	8
2.3.2 Culture medium	9
2.3.3 Metabolic Pathway	10
2.3.4 Immobilization	12
2.4 Materials for cells immobilization	23
2.4.1 Brick	23
2.4.2 Activated carbon	24
2.4.3 Zeolite 13X	25
 <b>III EXPERIMENTAL</b>	
3.1 Materials and Chemicals	27

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
3.2 Equipment	27
3.3 Methodology	28
3.3.1 Preparation of Carriers for Cell Immobilization	28
3.3.2 Medium Preparation	28
3.3.3 Inoculum Development	29
3.3.4 Fermentation	29
3.3.5 Repeated Batch Fermentation	29
3.4 Analysis Method	30
3.4.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	30
3.4.2 Gas Chromatography (GC)	30
3.4.3 UV-VIS Technique (UV)	30
3.4.4 Scanning Electron Microscope (SEM)	30
3.4.5 X-Ray Diffraction (XRD)	31
3.4.6 Surface Area Analysis (BET)	31
3.4.7 pH Meter	31
3.4.8 X-ray Fluorescence Spectroscopy (XRF)	31
 <b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	 33
4.1 Materials Characterization	33
4.1.1 Material composition	33
4.1.1.1 Brick (XRF)	33
4.1.1.2 Activated Carbon (SEM/EDS)	34
4.1.1.3 Zeolite 13X (XRF)	35
4.1.2 X-ray Diffraction (XRD)	36
4.1.2.1 Brick	36
4.1.2.2 Activated Carbon	37
4.1.2.3 Zeolite	38
4.1.3 Surface Area Measurement (SAA)	39
4.1.4 Initial pH of Materials Measurement	40

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
4.1.5 Scanning Electron Microscope (SEM)	41
4.1.5.1 Materials without cell immobilization	41
4.1.5.2 Materials with cell immobilization	42
4.2 Fermentation	43
4.2.1 Free Mobilized Cells Fermentation	43
4.2.2 Immobilized Cells Fermentation on Brick	46
4.2.3 Immobilized Cells Fermentation on Activated Carbon	49
4.2.4 Immobilized Cells Fermentation on Zeolite	52
4.2.5 Comparison of ABE Production with Different Ferment Operation	56
4.2.6 Repeated Batch Fermentation with Immobilized <i>Clostridium beijerinckii</i> on Zeolite	57
4.3 Economic discussion	58
<b>V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>60</b>
5.1 Conclusions	60
5.2 Recommendations	60
<b>REFERENCES</b>	<b>61</b>
<b>APPENDICES</b>	<b>73</b>
<b>Appendix A</b> Retention Time and Calibration Curve of Glucose, Acids, and Solvents by HPLC	73
<b>Appendix B</b> Retention Time and Calibration Curve of Acetone-Butanol Ethanol by GC	75
<b>Appendix C</b> Immobilized Cells Fermentation on Untreated Zeolite	76
<b>Appendix D</b> Scanning Electron Microscope (SEM)	78



**CHAPTER**

**PAGE**

**CURRICULUM VITAE**

**85**

**LIST OF TABLES**

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
2.1	Structures, properties and main applications of n-butanol, 2-Butanol, iso-Butanol and tert-Butanol	3
2.2	Properties of butanol and other fuels	5
2.3	Comparison of continuous reactor performance with different cell immobilization techniques	14
2.4	Chemical composition of brick	24
2.5	Chemical composition of zeolite 13X	26
4.1	XRF analysis for composition of brick	33
4.2	EDS analysis for composition of activated carbon	34
4.3	XRF analysis for composition of treated and untreated zeolite 13X	35
4.4	BET surface area, total pore volume, and average pore diameter of materials	39
4.5	Initial pH of materials	40
4.6	ABE production from different fermentation operations	56
A1	Retention time of substances	73

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1	Butanol production process from lignocellulosic feedstocks. 7
2.2	Separation outline for gram-negative rods and cocci. 8
2.3	SEM of <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052. 9
2.4	Metabolic pathway of <i>C. acetobutylicum</i> . The following enzymes are shown: hydrogenase (1), NAD-linked Fd oxidoreductase (2). CoA, Coenzyme A. 11
2.5	Basic methods of cells immobilization: (a) Entrapment with a matrix, (b) Attachment or adsorption to a preformed carrier, (c) self-aggregation of cells and (d) cells contained behind a barrier. 12
2.6	Comparison of glucose consumption and butanol production between the batch with free cells and cells immobilized on bricks. 16
2.7	Scanning electron micrographs of immobilized cells on bricks: (a) before the immobilization and (b) after the immobilization. 17
2.8	(a) Structures of graphite (g), carbon nanotube (nt) and fullerene (f). (b) Graphitizing carbon (gc) and non-graphitizing carbon (ngc). 25
4.1	X-Ray diffraction pattern of brick. 36
4.2	X-Ray diffraction pattern of activated carbon. 37
4.3	X-Ray diffraction pattern of treated and untreated zeolite 13X. 38
4.4	Scanning electron microscope images of materials before the immobilization; (a) brick, (b) activated carbon, (c) untreated zeolite, (d) treated zeolite. 41

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.5 Scanning electron microscope images of materials after the immobilization; (a) brick, (b) activated carbon, and (c) zeolite.	42
4.6 pH profile of free mobilized cells fermentation.	43
4.7 Glucose profile of free mobilized cells fermentation.	44
4.8 Acids production of free mobilized cells fermentation.	45
4.9 Solvents production of free mobilized cells fermentation.	45
4.10 Growth curve of <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1461.	46
4.11 pH profile of immobilized cells fermentation on brick.	47
4.12 Glucose profiles of immobilized cells fermentation on brick compared with free cell system.	47
4.13 Acids production of immobilized cells fermentation on brick.	48
4.14 Solvents production of immobilized cells fermentation on brick.	49
4.15 pH profile of immobilized cells fermentation on activated carbon.	49
4.16 Glucose profile of immobilized cells fermentation on activated carbon compared with free cell system.	50
4.17 Acids production of immobilized cells fermentation on activated carbon.	52
4.18 Solvents production of immobilized cells fermentation on activated carbon.	52
4.19 pH profile of immobilized cells fermentation on zeolite.	53
4.20 Glucose profile of immobilized cells fermentation on zeolite compared with free cell system.	54

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.21 Acids production of immobilized cells fermentation on zeolite.	55
4.22 Solvents production of immobilized cells fermentation on zeolite.	56
4.23 The repeated batch fermentation with immobilized cells on zeolite.	58
A1 Calibration curve of glucose, acids, and solvents. Symbols; (a) calibration curve of glucose, (b) calibration curve of acetic acid, (c) calibration curve of butyric acid, (d) calibration curve of acetone, (e) calibration curve of butanol, and (f) calibration curve of ethanol.	74
B1 Calibration curve of acetone-butanol-ethanol. Symbols; (a) calibration curve of acetone, (b) calibration curve of butanol, and (c) calibration curve of ethanol.	75
C1 pH profile of immobilized cells fermentation on untreated zeolite.	76
C2 Glucose profile of immobilized cells fermentation on untreated zeolite.	77
C3 Solvents production of immobilized cells fermentation on untreated zeolite.	77
D1 Scanning electron microscope images of brick before the immobilization; (a) magnification x1000, (b) magnification x3000, (c) magnification x5000.	78
D2 Scanning electron microscope images of activated carbon before the immobilization; (a) magnification x1000, (b) magnification x3000, (c) magnification x5000.	79

<b>FIGURE</b>		<b>PAGE</b>
D3	Scanning electron microscope images of untreated zeolite before the immobilization; (a) magnification x1000, (b) magnification x3000, (c) magnification x5000.	80
D4	Scanning electron microscope images of treated zeolite before the immobilization; (a) magnification x1000, (b) magnification x3000, (c) magnification x5000.	81
D5	Scanning electron microscope images of brick after the immobilization at different magnification.	82
D6	Scanning electron microscope images of activated carbon after the immobilization at different magnification.	83
D7	Scanning electron microscope images of zeolite after the immobilization at different magnification.	84