รายงานการวิจัย

เรื่อง

ภาษาไทย: “การสังเคราะห์สารบิวทิลแอลกอฮอล์จากกากข้าวโพด (วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร) และการประยุกต์เพื่อผลิตก๊าซโซฮอล์/ดีโซฮอล์”

ภาษาอังกฤษ: “Synthesis of Butanol from Corn and Application for Gasohol/Diesohol Production”

คณะผู้วิจัย

๑. รองศาสตราจารย์ ดร. สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์
๒. รองศาสตราจารย์ ดร. อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย
๓. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธัญญลักษณ์ ฉายสุวรรณ์

หน่วยงาน

วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณรัฐบาลสำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕-๒๕๕๖ และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ด้วยดีตลอดทั้งโครงการ

บทคัดย่อ

ซังข้าวโพดถือเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นชีวมวลในประเทศไทย สำหรับผลิตพลังงานยั่งยืน เช่น ไบโอบิวทานอล การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและกรดฟอสฟอริกเจือจางจึงมีความสำคัญในการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอมไซม์ เมื่อปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (120 องศาเซลเซียส, 5 นาที, ความเข้มข้นกรด 2% โดยน้ำหนัก และ อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 15: 1) และกรดฟอสฟอริกเจือจางภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (140 องศาเซลเซียส, 10 นาที, ความเข้มข้นกรด 2% โดยน้ำหนัก และ อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 10: 1) ให้ผลผลิตน้ำตาลโดยประมาณ 34-35 กรัมต่อลิตรโดยการปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริกจะทำให้เกิดตัวยับยั้งหรือเฟอฟูลรัลมากกว่ากรดซัลฟูริก และการศึกษาคุณลักษณะของซังข้าวโพดหลังจากปรับสภาพด้วยกรดทั้งสองชนิดแสดงถึงความสามารถในการเข้าถึงของเอนไซม์ได้ดีขึ้น โดยกรดซัลฟูริกให้ผลที่ดีกว่าในด้านพื้นที่ผิวและความเป็นผลึกที่มากกว่า เมื่อใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์กำจัดตัวยับยั้งพบว่าการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่เฟอฟูลรัลอาจจะไม่มีมีผลหลักในการยับยั้งจุลลินทรีย์ชนิด *C.berjerinckii* และในขั้นตอนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกันจะช่วยลดการยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการย่อยน้ำตาล แต่เนื่องจากภาวะที่แตกต่างกันของการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล การหาภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกันโดยวิธีวิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวหรือ RSM จะช่วยลดจำนวนการทดลอง ซึ่งมีตัวแปรสำคัญที่ต้องการศึกษา อาทิ สภาพความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ เวลา หลังจากกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกันภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (สภาพความเป็นกรดด่าง 6.3 อุณหภูมิ 35.7 และ 61.2 ชั่วโมง) ให้ผลผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล 11.82 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ ยังใช้การพรีทรีทเมนท์แบบสองขั้นตอนคือ พรีทรีทเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซม์ตามด้วยกรดซัลฟิวริก เพราะการพรีทรีทเมนท์ช่วยสลายส่วนประกอบของชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสิก เช่น ลิกนิน ซึ่งลดประสิทธิภาพของการเข้าถึงของเอนไซม์ในการย่อยสลาย จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ พรีทรีทเมนท์ซังข้าวโพดแบบสองขั้นตอนด้วยไมโครเวฟโดยใช้วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว โดยการพรีทรีทเมนท์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราส่วนซังข้าวโพด 67 กรัม ต่อสารละลาย 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยกรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราส่วนซังข้าวโพด 106 กรัม ต่อสารละลาย 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 156 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 นาที ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด 48.58 กรัมต่อลิตร โดยอัตราส่วนซังข้าวโพดต่อสารละลายและอุณหภูมิเป็นตัวแปรสำคัญในการพรีทรีทเมนท์นี้ การหมักน้ำตาลหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตอะซิโตน, บิวทานอล และเอทานอล โดยมีการกำจัดสารที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียที่ผลิตบิวทานอลด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์และเจือจางสารละลาย 4 เท่าด้วยน้ำ ทำให้ได้ปริมาณอะซิโตน, บิวทานอล และเอทานอลสูงสุดคือ 8.43 กรัมต่อลิตร

Abstract

Corncobs are one of the potential Thailand's agricultural biomass feedstocks for renewable energy, like biobutanol. Dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatment has been successful developed for pretreatment to remove hemicelluloses and improve enzymatic hydrolysis. The optimum conditions of dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatment were obtained at 120 °C for 5 min with 15:1 liquid-to-solid (LSR) ratio and 140 °C for 10 min with 10:1 LSR, respectively and both of acid pretreatments gave the content of total sugar approximately 34–35 g/l. In case of inhibitor content (furfural), phosphoric acid pretreatment gives higher than sulfuric acid pretreatment. Characterizations of corncobs after pretreatment indicate that both of acid pretreatments can improve enzymatic accessibility and the better results present in corncobs pretreated with sulfuric acid in term of surface area, crystallinity. To remove inhibitors, lime detoxification was carried out and resulted in improving Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) production significantly. However, furfural might not the major inhibit effect to *C.berjerinckii*. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) was performing for enzymatic hydrolysis together with fermentation to reduced inhibition of enzymatic hydrolysis. Though, the different condition of enzymatic hydrolysis and fermentation, optimization using Response Surface Methodology (RSM) was carried out to reduce run of experiment with important variables such as pH, temperature, and time. After precessing, the highest ABE of 11.82 g/l was obtained under optimum condition of pH 6.30, 35.7 °C, and 61.2 h.

Moreover, A two–stage pretreatment of corncobs using NaOH followed by H_2SO_4 combined with microwave radiation prior enzymatic hydrolysis has been examined. The optimum condition of second stage was obtained with response surface methodology (RSM) at a three–variable and five–level central composite design (CCD). A maximum concentration of glucose 48.58 g/l was obtained at the optimal condition of 2 % NaOH at 100 °C, 30 min, and SLR 67 for first stage and 1 % H_2SO_4 at 156 °C, 16 min, and SLR 106 for second stage of two-stage pretreatment. The result showed that SLR and temperature are the most significant factors on the glucose concentration. After that, the hydrolysate was used to produce Acetone–Butanol–Ethanol (ABE) by *Clostridium beijerinckii*. The diluted 4 times hydrolysate combined with overliming (D4O) gave the highest ABE yield, 0.41, and productivity, 17.56. It is suggested that the dilution and overliming process can reduce fermentation inhibitors, increase cell growth and improve ABE yield.

Table Content

	Page
Title page	i
Acknowledgement	ii
Abstract (Thai)	iii
Abstract (English)	iv
Table Content	v
List of Tables	viii
List of Figures	x
List of Abbreviations	xiii
CHAPTER I: INTRODUCTION	1
Objectives	3
CHAPTER II: LITERATURE REVIEW	4
Biobutanol Production	4
Lignocellulosic biomass	4
Cellulose	6
Hemicellulose	7
Lignin	8
Pretreatment of Lignocellulosic Biomass	8
Physical Pretreatment	9
Physico-chemical Pretreatment	9
Chemical Pretreatment	10
Biological Pretreatment	13
Microwave Pretreatment	13
Inhibitors from Biomass Pretreatment	19
Aldehyde inhibitors	20
Ketone inhibitors	21
Phenol-based inhibitors	21
Organic acid inhibitors	22
Butanol Fermentation Inhibitors	23
Detoxification Method	24
Physical Methods	24
Chemical Methods	25

Biological Methods 26
Response Surface Methodology (RSM) 26
CHAPTER III: EXPERIMENTAL 28
Materials and Chemicals 28
Methodology 28
Dilute Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatment 28
Lime Detoxification 29
Medium preparation 29
Inoculum Development 30
Simultaneous Saccharification and Fermentation 30
Response Surface Methodology (RSM) for Experimental Design 31
Analysis Method 33
High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 33
UV-VIS Spectrometer (UV) 33
Scanning Electron Microscope (SEM) 33
X-Ray Diffraction (XRD) 34
Surface Area Analysis 34
Gas Chromatography (GC) 34
Fibertect M6 34
CHAPTER IV: RESULTS AND DISCUSSION 36
Chemical Composition of Corncobs 36
One-stage Pretreatment Using Acid 37
A Comparison between Dilute Sulfuric Acid and Phosphoric Acid at an Optimal Pretreatment Condition 37
Surface Area Analysis 40
X-ray Diffraction (XRD) Analysis 41
Scanning Electron Microscope 43
Effect of Overliming Step in Prehydrolysate 44
Acetone-Butanol-Ethanol Production 47
Optimization of Acetone-Butanol-Ethanol Production Employing Response Surface Methodology (RSM) 48
Two-stage Pretreatment Method 59
Optimization of the Glucose Concentration using Response Surface Methodology (RSM) 59
The Effect of Pretreatment on Chemical Composition of Corncobs 64

Surface Morphology by SEM 65
BET Surface Area 66
XRD Analysis 67
Effect of Fermentation Techniques and Fermentation Time on the ABE Concentration 69
CHAPTER IV: CHAPTER V: CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS 73
Conclusions 73
Recommendations 74
REFERENCES 75
APPENDICES 82
International Publications 82
1. Sirikarn Satimanont, Apanee Luengnaruemitchai, and Sujitra Wongkasemjit, "Effect of Temperature and Time on Dilute Acid Pretreatment of Corn Cobs", International Journal of Chemical and Biological Engineering, 6 (2012), 333-337. 83
2. Boonyisa Wanitwattanarumlug, Apanee Luengnaruemitchai, and Sujitra Wongkasemjit, "Characterization of Corn Cobs from Microwave and Potassium Hydroxide Pretreatment", Internaional Journal of Chemical and Biological Engineering, 6 (2012), 354-358.111. 89
3. Akarin Boonsombuti, Apanee Luengnaruemitchai, Sujitra Wongkasemjit, "Enhancement of enzymatic hydrolysis of corncob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology", Cellulose, 20 (2013), 1957-1966. 94
4. Akarin Boonsombuti, Kittinan Komolpis, Apanee Luengnaruemitchai, Sujitra Wongkasemjit, "Enhancement of ABE fermentation through regulation of ammonium acetate and D–xylose uptake from acid-pretreated corncobs", Annual Microbiology, In press. 105

RESEARCHERS' BIBLIOGRAPHIES 115
1. Associate Professor Sujitra Wongkasemjit 115
2. Associate Professor Apanee Luengnaruemitrchai 136
3. Assistant Professor Thanyalak Chaisuwan 145

List of Tables

Table		*Page*
2.1	Composition of representative lignocellulosicfeedstocks	**6**
2.2	Benefits and challenges of microwave processing	16
3.1	Design of experiment for statistical analysis. Coded and experimental values of the factors for RSM	**32**
3.2	Central composite design (CCD)	32
4.1	Chemical composition of corncobs	36
4.2	Total sugar yield of corncobs in prehydrolysate after dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatment using 2% (w/w) with different pretreatment times, temperatures and LSRs	39
4.3	BET surface area, total pore volume and average pore diameter of samples	40
4.4	Crystallinity index (%) of untreated and treated corncobs	42
4.5	Total sugar yield of corncobs in prehydrolysate after dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatment using 2% (w/w) and different pretreatment times, temperatures and LSR with and without overliming step	45
4.6	Acetone-Butanol-Ethanol production between dilute sulfuric acid and phosphoric acid at an optimal pretreatment condition of corncobs followed by with and without overliming step	48
4.7	Three level central composite design (CCD) design and response of dependent variable (ABE production)	49
4.8	Statistics for the regression of the optimization model	51
4.9	ANOVA for the regression	51
4.10	Experiment design and results for RSM	55
4.11	Acetone-Butanol-Ethanol production at the condition of pH 6.30, 35.7 ℃ and 61.2 h	56
4.12	Experimental design and results of the central composite design of second stage of two–stage pretreatment	60
4.13	Statistics for regression of the optimization model	61
4.14	ANOVA for the regression	62

4.15	Composition of corncobs before and after pretreatment	65
4.16	BET surface area, and average pore diameter of corncobs	67
4.17	Crystallinity index, crystalline area, and amorphous area of corncobs	68
4.18	ABE fermentation techniques	69
4.19	The effect of fermentation techniques on ABE yield, and productivity at 48 h	72

List of Figures

Figure		*Page*
1.1	Biofuels production from lignocellulosic raw materials	1
2.1	ABE fermentation process	4
2.2	Representation of lignocellulose structure showing cellulose, hemicellulose, and lignin fractions	5
2.3	The structure of cellulose	7
2.4	Monomers of hemicelluloses	8
2.5	Phenyl propane units	8
2.6	Schematic of the role of pretreatment	9
2.7	The electromagnetic spectrum with applications at various frequencies	14
2.8	The temperature profile after 60 sec as affected by microwave radiation (left) compared to treatment in oil bath (right)	17
2.9	The degradation product of lignocellulosic biomass during Pretreatment	20
2.10	The structure of aldehyde inhibitors The structure of aldehyde Inhibitors	21
2.11	The structure of ketones inhibitors	21
2,12	The structure of phenols inhibitors	22
2.13	The structure of organic acid inhibitors	23
2.14	The effect of inhibitors generated during 0.5 % H_2SO_4 pretreatment of corn fiber on ABE concentrations	24
4.1	Monomeric sugar and furfural yield of corncob in prehydrolysate after dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatment by using 2% (w/w) with different pretreatment times, temperatures and LSRs	39
4.2	XRD patterns of the corncob. Symbols; (a) fresh corncob, (b) pretreated corncob at 120 °C, 5 min of pretreatment time by using 2% (w/w) H_2SO_4 at a 15:1 LSR, (c) pretreated corncob at 140 °C, 10 min pretreatment time by using 2% (w/w) H_3PO_4 at a 10:1 LSR, (d) pretreated corncob at 120 °C, 5 min pretreatment time by using 2% (w/w) H_2SO_4	

	at a 10:1 LSR	42
4.3	SEM images of samples: (a) untreated, (b) after pretreated with 2% (w/w) H_2SO_4 with 15: 1 LSR at 120°C for 5 min, (c) after pretreated with 2% (w/w) H_2SO_4 with 10: 1 LSR at 120°C for 5 min, and (d) after pretreated with 2% (w/w) H_3PO_4 with 15: 1 LSR at 140°C for 10 min	44
4.4	Comparison of monomeric sugar and furfural yields in prehydrolysate after dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatments using 2% (w/w) with different pretreatment times, temperatures, and LSRs with and without overliming step	46
4.5	Response surface and contour plot for ABE production: effects of temperature and pH Response surface and contour plot for ABE production: effects of temperature and pH	53
4.6	Response surface and contour plot for ABE production: effects of pH and reaction time	54
4.7	Response surface and contour plot for ABE production: effects of temperature and reaction time	54
4.8	Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of corncobs using *C. beijerinckii* TISTR1461 at the condition of pH 6.30, 35.7 °C, and 61.2 h with 20 g/l glucose as sugar supplementation	57
4.9	Chromatogram for GC-MS analysis of (a) control experiment (20 g/l of glucose as a substrate); (b) conditions of pH 6.30, 35.7 °C, and 61.2 h with 20 g/l glucose as sugar supplementation	58
4.10	Productivity and yield of ABE production at the condition of pH 6.30, 35.7 °C, and 61.2 h in (a) control experimental (20 g/l of glucose as a substrate); (b) SSF with sugar supplementation (20 /l glucose); (c) SSF non-sugar supplementation	59
4.11	Response surface for glucose concentration: effects of temperature and time (a), temperature and SLR (b), and time and SLR (c)	63
4.12	Contour plots for glucose concentration: effects of temperature and time (a), temperature and SLR (b), and time and SLR (c)	63
4.13	The glucose, xylose, arabinose and total sugar concentration from optimal two–stage pretreatment conditions	64

4.14 SEM images of untreated corncobs (A), Pretreated corncobs with Microwave/NaOH (B), Microwave/NaOH followed by H_2SO_4 (C), and Microwave/NaOH followed by water (D) 66
4.15 XRD patterns of untreated and pretreated corncobs. Untreated corncobs (A), Microwave/NaOH pretreated (B), Microwave/NaOH followed by water pretreated (C), and Microwave/NaOH followed by H_2SO_4 pretreated (D) 68
4.16 The effect of fermentation time on ABE concentration 70
4.17 The effect of fermentation techniques on ABE yield at 37 °C for 48 h 71

List of Abbreviations

ABE	Acetone–Butanol–Ethanol
ADF	Acid Detergent Fiber
ADL	Acid Detergent Lignin
AFEX	Ammonia Fiber Explosion
ANOVA	Analysis of Variance
CCD	Central Composite Design
CMM	Cooked Meat Medium
^{13}C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
CrI	Crystallinity Index
DP	Degree of Polymerization
EBI	Electron Beam Irradiation
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometer
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrared Spectrometer
LHW	Liquid Hot Water
LSR	Liquid-to-solid Ratios
NDF	Neutral Detergent Fiber
RF	Radio Wave Frequencies
RSM	Response Surface Methodology
SEM	Scanning Electron Microscope
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
UV-Vis	Ultraviolet-visible Spectrometer
XRD	X-Ray Diffraction