

**COMPARISON OF DIFFERENT PRETREATMENTS AND OPTIMIZATION
OF SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION IN
BIOBUTANOL PRODUCTION USING CORNCOBS**

Jirakarn Nantapipat

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
2013


Thesis Title: Comparison of Different Pretreatments and Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation in Biobutanol Production Using Corncoobs

By: Jirakarn Nantapipat


Program: Petrochemical Technology

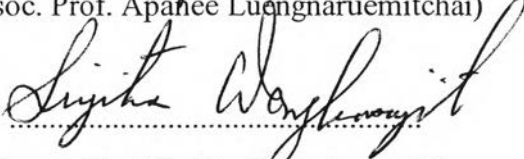
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai
Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit

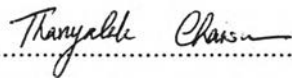
Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science.

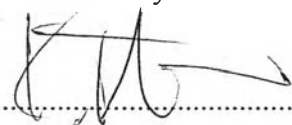

..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:


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


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


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


.....
(Dr. Ruengsak Thitiratsakul)

ABSTRACT

5471005063: Petrochemical Technology Program
Jirakarn Nantapipat: Comparison of Different Pretreatments and Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation in Biobutanol Production Using Corncobs
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai and Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit 67 pp.
Keywords: Corncob/ Dilute Acid pretreatment/ Biobutanol production/ Simultaneous saccharification and fermentation/ SSF

Corncobs are one of the potential Thailand's agricultural biomass feedstocks for renewable energy, like biobutanol. Dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatments have been successfully developed for pretreatment to remove hemicelluloses and improve enzymatic hydrolysis. The optimum conditions of dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatments 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. 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 pretreated corncobs with sulfuric acid in terms of surface area, crystallinity. To remove inhibitors, lime detoxification was carried out and resulted for significant improving Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) production; however, furfural might not be the main inhibitor to *C.berjerinckii*. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) was applied to reduce inhibition of enzymatic hydrolysis. In addition, the condition of enzymatic hydrolysis and fermentation was obtained using Response Surface Methodology (RSM). The highest ABE of 11.82 g/l was obtained under optimum condition of pH 6.30, 35.7 °C, and 61.2 h.

บทคัดย่อ

จिरกานต์ นันทาพิพัฒน์ : การเปรียบเทียบกระบวนการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยกรด
 เจือจางและการหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักบิวทานอลแบบย่อยเป็นน้ำตาลและหมัก
 พร้อมกัน (Comparison of Different Pretreatments and Optimization of Simultaneous
 Saccharification and Fermentation in Biobutanol Production Using Corncobs) อ. ที่ปรึกษา: รศ.
 ดร. อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย และ รศ.ดร. สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ 67 หน้า

ซังข้าวโพดเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นชีวมวลใน
 ประเทศไทยสำหรับผลิตพลังงานยั่งยืน เช่น ไบโอบิวทานอล การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกและ
 กรดฟอสฟอริกเจือจางจึงมีความสำคัญในการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการ
 ผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์ เมื่อปรับสภาพซังข้าวโพด
 ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (120 องศาเซลเซียส, 5 นาที, ความเข้มข้นกรด 2%
 โดยน้ำหนัก และ อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 15: 1) และกรดฟอสฟอริกเจือจางภายใต้ภาวะที่
 เหมาะสม (140 องศาเซลเซียส, 10 นาที, ความเข้มข้นกรด 2% โดยน้ำหนัก และ อัตราส่วน
 ของเหลวต่อของแข็ง 10: 1) ให้ผลผลิตน้ำตาลโดยประมาณ 34-35 กรัมต่อลิตรโดยการปรับสภาพ
 ด้วยกรดฟอสฟอริกจะทำให้เกิดด้วยยับยั้งหรือเฟอูลูรัลมากกว่ากรดซัลฟูริก และการศึกษา
 คุณลักษณะของซังข้าวโพดหลังจากปรับสภาพด้วยกรดทั้งสองชนิดแสดงถึงความสามารถในการ
 เข้าถึงของเอนไซม์ได้ดีขึ้น โดยกรดซัลฟูริกให้ผลที่ดีกว่าในด้านพื้นที่ผิวและความเป็นผลึกที่
 มากกว่า เมื่อใช้เคลเซียมไฮดรอกไซด์กำจัดด้วยยับยั้งพบว่าการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล
 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่เฟอูลูรัลอาจจะไม่มีผลหลักในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิด
C.berjerinckii และในขั้นตอนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกันจะช่วยลดการยับยั้ง
 เอนไซม์ในกระบวนการย่อยน้ำตาล แต่เนื่องจากภาวะที่แตกต่างกันของการย่อยเป็นน้ำตาลและ
 การหมักเพื่อผลิตบิวทานอล การหาภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมัก
 พร้อมกันโดยวิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวหรือ RSM จะช่วยลดจำนวนการ
 ทดลอง หลังจากกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกันภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (สภาพ
 ความเป็นกรดต่าง 6.3 อุณหภูมิ 35.7 และ 61.2 ชั่วโมง) ให้ผลผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล
 11.82 กรัมต่อลิตร

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my greatest gratitude to Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai for her invaluable help and constant encouragement throughout my thesis work. Moreover, I would like to my grateful appreciation 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 Mr. Akarin Boonsombuti who gives a good guidance for experiment. He gave useful suggestions and helping me to solve thesis's problem.

Also, I especially thank for The Petroleum and Petrochemical College and the Center of Excellence on Petrochemical and Materials Technology, Thailand and National Research University Project of ChE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (EN269B-55) that provided all facilities and financial support.

Especially, I would like to give my special thanks to my parents and my friends for all their support and encouragement throughout the period of this research.

CHAPTER	PAGE
III EXPERIMENTAL	23
3.1 Materials and Chemicals	23
3.1.1 Corncob Waste	23
3.1.2 Sulfuric Acid (H ₂ SO ₄)	23
3.1.3 Phosphoric Acid (H ₃ PO ₄)	23
3.1.4 Calcium Hydroxide (CaOH ₂)	23
3.1.5 Critic Acid Monohydrate (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	23
3.1.6 di-Sodium Hydrogen Orthophosphate Anhydrous (Na ₂ HPO ₄)	23
3.1.7 pH Meter	23
3.1.8 Filter Paper	23
3.1.9 <i>Clostridium Beijerinckii</i> TISTR1461	23
3.1.10 Enzyme (ARR2–7 from Siam Victory, Thailand)	23
3.1.11 Standard Glucose, Xylose, Arabinose, Cellobiose, Mannose, Galactose, and Furfural	23
3.2 Equipment	23
3.2.1 High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)	23
3.2.2 Scanning Electron Microscope (SEM)	23
3.2.3 X-Ray Diffraction Analyzer (XRD)	23
3.2.4 UV-VIS Spectrometer (UV)	23
3.2.5 Gas Chromatograph (GC)	23
3.2.6 Incubator Shaker	23
3.2.7 Oven	23
3.2.8 Stainless Steel Reactor	23
3.2.9 Waterbath	23
3.2.10 Glassware	24
3.3 Methodology	24
3.3.1 Dilute Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatment	24
3.3.2 Lime Detoxification	24
3.3.3 Medium preparation	25

CHAPTER	PAGE
3.3.4 Inoculum Development	25
3.3.5 Simultaneous Saccharification and Fermentation	25
3.3.6 Response Surface Methodology (RSM) for Experimental Design	26
3.4 Analysis Method	28
3.4.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	28
3.4.2 UV-VIS Technique (UV)	28
3.4.3 Scanning Electron Microscope (SEM)	28
3.4.4 X-Ray Diffraction (XRD)	29
3.4.5 Surface Area Analysis (BET)	29
3.4.6 Gas Chromatography (GC)	29
3.4.7 Fibertect M6	29
 IV RESULTS AND DISCUSSION	 31
4.1 Biomass Characterizations	31
4.1.1 Chemical Composition of Corncobs	31
4.2 A Comparison between Dilute Sulfuric Acid and Phosphoric Acid at an Optimal Pretreatment Condition	32
4.2.1 Monomeric Sugar and Furfural Yield	32
4.2.2 Surface Area Analysis (BET)	35
4.2.3 X-ray Diffraction Analysis (XRD)	36
4.2.4 Scanning Electron Microscope (SEM)	38
4.3 Effect of Overliming Step in Prehydrolysate	39
4.3.1 Monomeric Sugar and Furfural Yield	39
4.3.2 Acetone-Butanol-Ethanol Production	42
4.4 Optimization of Acetone-Butanol-Ethanol Production Employing Response Surface Methodology (RSM)	43
4.4.1 Development of a Model for ABE Production	43
4.4.2 Effect of Parameters on ABE Production	46

CHAPTER	PAGE
4.4.3 Optimization of ABE Production and Confirmation Experiment	49
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	54
5.1 Conclusions	54
5.2 Recommendations	54
REFERENCES	55
APPENDICES	62
Appendix A Stainless Steel Reactor	62
Appendix B Retention Time and Calibration Curve of Monomeric Sugar and Furfural by HPLC	63
CHAPTER	PAGE
Appendix C Retention Time and Calibration Curve of Acetone-Butanol-Ethanol by GC	65
Appendix D Citrate-Phosphate Buffer	66
CURRICULUM VITAE	67

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
2.1 Relevant properties of n-butanol compared with other liquid fuels	3
2.2 The content of cellulose, hemicelluloses, and lignin in common agricultural residues and wastes	6
2.3 Comparison of process conditions and performance of three hydrolysis process	15
3.1 Design of experiment for statistical analysis. Coded and experimental values of the factors for RSM	27
3.2 Central composite design (CCD)	27
4.1 Chemical composition of corncobs	31
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	34
4.3 BET surface area, total pore volume and average pore diameter of samples	35
4.4 Crystallinity index (%) of untreated and treated corncobs	37
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	40
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	43
4.7 Three level central composite design (CCD) design and response of dependent variable (ABE production)	44
4.8 Statistics for the regression of the optimization model	45
4.9 ANOVA for the regression	45

4.10	Experiment design and result for RSM	50
4.11	Acetone-Butanol-Ethanol production at the condition of pH 6.30, 35.7 °C and 61.2 h	53
B1	Retention time of monomeric sugar	63
D1	Citrate-Phosphate Buffer	66

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Major components of lignocelluloses	6
2.2 Structure of cellulose chain	7
2.3 Structure of xylan	8
2.4 Structure of arabinoxylan	8
2.5 Structure of monolignols	9
2.6 Schematic of goals of pretreatment on lignocellulosic material	10
2.7 Central composite designs for the optimization of: (a) two variables ($\alpha = 1.41$) and (b) three variables ($\alpha = 1.68$). (●) Points of factorial design, (○) axial points and (□) central point	20
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	34
4.2 X-ray diffraction 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 ₂ SO ₄ at a 15:1 LSR, (c) pretreated corncob at 140 °C, 10 min pretreatment time by using 2% (w/w) H ₃ PO ₄ at a 10:1 LSR, (d) pretreated corncob at 120 °C, 5 min pretreatment time by using 2% (w/w) H ₂ SO ₄ at a 10:1 LSR	37
4.3 Scanning electron microscope images of samples: (a) untreated, (b) after pretreated with 2% (w/w) H ₂ SO ₄ with 15: 1 LSR at 120°C for 5 min, (c) after pretreated with 2% (w/w) H ₂ SO ₄ with 10: 1 LSR at 120°C for 5 min, and (d) after pretreated with 2% (w/w) H ₃ PO ₄ with 15: 1 LSR at 140°C for 10 min	39

4.4	Comparison of monomeric sugar and furfural yield of corncob in prehydrolysate after dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatments by using 2% (w/w) with different pretreatment times, temperatures and LSRs with and without overliming step	41
4.5	Response surface and contour plot for ABE production : effect of temperature and pH	47
4.6	Response surface and contour plot for ABE production : effect of pH and reaction time	48
4.7	Response surface and contour plot for ABE production : effect of temperature and reaction time	48
4.8	Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of corncobs using <i>C. beijerinckii</i> TISTR1461 at the condition of pH 6.30, 35.7 °C, and 61.2 h with 20 g/l glucose as sugar supplementation	50
4.9	Chromatogram for Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS) analysis. (a) control experiment (20 g/l of glucose as a substrate) ;(b)condition of pH 6.30, 35.7 °C, and 61.2 h with 20 g/l glucose as sugar supplementation	52
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 g/l glucose); (c) SSF without sugar supplementation	53
A1	Stainless steel reactor	62
B1	Calibration curve of monomeric sugar and furfural in fermentable sugars. Symbols; (a) calibration curve of glucose, (b) calibration curve of xylose, (c) calibration curve of arabinose, (d) calibration curve of acetic acid, (e) calibration curve of butyric acid, and (f) calibration curve of furfural	64

- C1 Calibration curve of acetone-butanol-ethanol in product.
Symbols; (a) calibration curve of acetone, (b) calibration curve of ethanol, and (c) calibration curve of butanol