

**Abstract:**

Nowadays, lignocellulosic biomass is a promising alternative feedstock for conversion to value added products (second generation biofuel, commodity and specialty chemicals, biogas, electricity and bio-materials). Especially, utilization of agricultural residues (e.g. palm wastes, rice straw, and sugarcane bagasse), forestry residue, and industrial by-products are considered a great challenge for agricultural-based country like Thailand and for sustainability of the environment in a global scale. Therefore, this project focused on utilization of lignocellulosic biomass for conversion to biofuels and chemicals in concept of biorefinery industry. The researches will be separated into three routes: (i) utilization of palm kernel cake (PKC) in study effect of steam explosion and enzyme digestibility for production of bioethanol by fermentation using engineered thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius* TM242. (ii) study of alkaline pretreatment in acetone-based organic solvent system for sugar production from rice straw. (iii) characteristics of recovered lignin extracted from different lignocellulosic biomasses via organosolv fractionation.

Palm kernel cake (PKC) is a mannan rich by-product from palm oil processing with potential for conversion to fuels and chemicals in biorefineries. In this study, *Geobacillus thermoglucosidasius* TM242, an engineered thermophilic ethanologen capable of utilizing short-chain oligosaccharides was used for production of ethanol from a PKC hydrolysate rich in mannan oligomers without mannosidase supplementation, with high ethanol conversion efficiency. The highest amount of fermentable sugars of  $28.34 \pm 0.06$  g/L was obtained from 5% (w/w) PKC pretreated by steam explosion at 4.5 bar for 15 min followed by enzymatic hydrolysis using 17.9 U/g mannan of SEB mannanase and 10.4 FPU/g glucan of CTec2 cellulase. Fermentation of the PKC hydrolysate by TM242 at 60°C for 48 h gave a maximum ethanol concentration of  $9.9 \pm 0.4$  g/L, equivalent to  $92 \pm 2\%$  of the theoretical yield based on the total convertible sugars in PKC. This was considerably higher than that obtained using *Saccharomyces cerevisiae* (35.4%) using PKC hydrolysed under the same conditions or the autoclave treated PKC ( $P < 0.05$ ). The process developed is attractive for ethanol production from mannan-rich wastes as it requires mild pretreatment conditions and avoids  $\beta$ -mannosidase supplementation in the hydrolysis step with utilisation of all sugar types and oligosaccharides in the substrate.

Organosolv is an effective pretreatment strategy for increasing digestibility of lignocellulosic materials owing to selectivity of solvents on separating biopolymeric constituents of plant biomass.

In the present work, a novel low-temperature alkali-catalyzed organosolv pretreatment of rice straw was studied. The effects of alkaline catalysts (i.e. NaOH, ammonia, and tri-ethylamine) and solvent types (i.e. acetone, ethanol, and water) were carried out. Addition of alkalis led to increasing sugar from enzymatic hydrolysis while acetone was found to be superior to ethanol and water on selectivity towards cellulose preservation. The optimal alkaline-catalyzed pretreatment reaction contained 5% (w/v) NaOH in an aqueous-acetone mixture (1:4) at 80°C for 5 min. A glucose yield of 913 mg/g of pretreated biomass was achieved, equivalent to a maximal glucose recovery of 93.0% from glucan in the native biomass. Scanning electron microscope revealed efficient removal of non-cellulosic components, resulting in exposed cellulose microfibrils with a reduced crystallite size as determined by X-ray diffraction.

Among biomass-derived compounds, lignin is an underused component with potential for conversion to industrial-need products in biorefinery. In this study, organosolv fractionation of four lignocellulosic materials including bagasse (BG), pararubber wood sawdust (PS), palm fiber (PF) and cassava fiber (CF) was studied using a ternary solvent mixture comprising methyl isobutyl ketone (MIBK), ethanol, and water in the presence of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to separate high-purity lignin. The fractionation reaction was performed at 160 °C for 40 min with MIBK/ethanol/water proportion of 0.25/0.42/0.33 and 0.025 M of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, which led to the highest lignin removal efficiency of 88.2%, 70.6%, 67.3%, and 71.7% (w/w) from BG, PS, PF, and CF, respectively. Physicochemical characteristics of the fractionated lignin were determined for Klason lignin and by X-ray fluorescence spectroscopy, Organic elemental analysis, <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy. The lignin samples were thermally depolymerized in MIBK to determine the content of specific lignin-derived chemicals. The main phenolic derivatives from BG-lignin were 4-ethylphenol and 4-vinylguaiacol, whereas those from PS-lignin were syringaldehyde and *cis*-isoeugenol. Phenol and bis(2-ethylhexyl) phthalate were mainly produced from depolymerization of PF-lignin while *trans*-isoeugenol and hexadecanoic acid were the major products from CF-lignin. This work demonstrates the potential of the fractionated lignin for production of valuable chemicals in biorefineries.

**Keywords:** Biomass; Bioethanol; *Geobacillus thermoglucosidasius*; Organosolv fractionation; Steam explosion; Alkaline catalyst; Lignin

## บทคัดย่อ:

ในปัจจุบันชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสจัดเป็นวัตถุดิบทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม เช่น เชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สอง เคมีภัณฑ์ชนิดพิเศษและที่ใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรม ก๊าซชีวภาพ ไฟฟ้า และวัสดุชีวภาพ เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ประโยชน์จากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร อาทิเช่น เศษปาล์ม ฟางข้าว และชานอ้อย หรือเศษชิ้นไม้ และผลพลอยได้จากภาคอุตสาหกรรม ถือเป็นความท้าทายที่ยิ่งใหญ่สำหรับประเทศเกษตรกรรม เช่น ประเทศไทย เพื่อความยั่งยืนของสภาพแวดล้อมในระดับโลก ดังนั้นโครงการนี้จึงมุ่งเน้นการใช้ชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสเพื่อแปลงเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพและสารเคมีตามแนวคิดของอุตสาหกรรมพลังงานและเคมีชีวภาพ (Biorefinery industry) สำหรับงานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 3 เส้นทาง คือ (i) การผลิตเอทานอลจากกากเนื้อในปาล์มโดยการหมักด้วยแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรมทนร้อนชนิด *Geobacillus thermoglucosidasius* TM242 ภายใต้การศึกษาผลของการระเบิดด้วยไอน้ำและการย่อยสลายของเอนไซม์ (ii) ศึกษาการปรับสภาพด้วยต่างในระบบตัวทำละลายอินทรีย์อะซิโตนเพื่อผลิตน้ำตาลจากฟางข้าว (iii) ศึกษาลักษณะของลิกนินที่สกัดได้จากชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ต่างกันด้วยวิธีการแยกด้วยตัวทำละลาย

กากเนื้อในปาล์ม (PKC) เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มใต้ที่มีแมนแนนเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีศักยภาพในการแปลงเป็นเชื้อเพลิงและสารเคมีในอุตสาหกรรมพลังงานและเคมีชีวภาพ ในงานนี้มุ่งศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไฮโดรไลเซสของกากเนื้อในปาล์มที่อุดมไปด้วย mannose oligomers และปราศจากการเติมเอนไซม์ mannosidase ในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ ภายใต้การหมักด้วยแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรมทนร้อนชนิด *Geobacillus thermoglucosidasius* TM242 ที่มีความสามารถในการแปลง oligosaccharides แบบโซ่สั้นเป็นผลิตภัณฑ์เอทานอล จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำตาลที่หมักได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ  $28.34 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร ได้จากร้อยละ 5 โดยน้ำหนักของกากเนื้อในปาล์ม ที่เตรียมด้วยการระเบิดไอน้ำที่ 4.5 บาร์เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการไฮโดรไลซิสโดยใช้  $17.9 \text{ U/g mannann}$  ของเอนไซม์ SEB mannanase และ  $10.4 \text{ FPU/g glucan}$  ของเอนไซม์เซลลูเลส CTec2 หลังจากนำน้ำตาลสูงสุดข้างต้นหมักด้วยแบคทีเรียดัดแปลงพันธุกรรมทนร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด  $9.9 \pm 0.4$  กรัม/ลิตร คิดเป็นร้อยละ 92.22 ของผลผลิตทางทฤษฎีปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดในกากเนื้อในปาล์ม และสูงกว่าผลผลิตเอทานอลที่หมักจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (ร้อยละ 35.4) ภายใต้สภาวะเดียวกันหรือ PKC ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ( $P < 0.05$ ) สำหรับกระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับการผลิตเอทานอลจากของเสียที่อุดมไปด้วยแมนแนน ภายใต้เงื่อนไขการปรับสภาพไม่รุนแรงและหลีกเลี่ยงการเติม  $\beta$ -mannosidase ในขั้นตอนการย่อย ซึ่งนำไปสู่การใช้ประโยชน์ของน้ำตาลทุกชนิดและน้ำตาลโอลิโกเมอร์ (oligosaccharides) เพื่อเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการถัดไป

สำหรับการปรับสภาพด้วยตัวทำละลาย (organosolv pretreatment) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ เพื่อเพิ่มการย่อยของวัสดุลิกโนเซลลูโลสในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เนื่องจากความสามารถในการคัดเลือกของตัวทำละลายในการแยกองค์ประกอบของชีวมวลพืช ในงานวิจัยนี้ได้ทำการปรับสภาพฟางข้าวด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาอัลคาไลด์ที่อุณหภูมิต่ำ ภายใต้การศึกษาผลของตัวเร่งปฏิกิริยาอัลคาไลน์ (เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนีย และไตรเอทิลเอไมด์) และตัวทำละลาย (เช่น อะซิโตน เอทานอล และน้ำ) จากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มตัวเร่งชนิดอัลคาไลด์นำไปสู่การเพิ่มผลผลิตน้ำตาลหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ รวมถึงพบว่าตัวทำละลายอะซิโตนมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเซลลูโลสมากกว่า เมื่อเทียบกับสารละลายเอทานอลและน้ำ สำหรับการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์ที่ดีที่สุด ประกอบด้วยร้อยละโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำผสมอะซิโตน (1: 4) ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ให้ผลผลิตกลูโคส 913 มิลลิกรัมต่อกรัม เทียบเท่ากับการกักเก็บกลูโคสสูงสุดที่ 93.0% จากกลูแคนในวัตถุดิบชีวมวล และจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) พบว่าการปรับสภาพข้างต้นมีประสิทธิภาพในการกำจัดส่วนประกอบที่ไม่ใช่เซลลูโลส รวมถึงสามารถลดขนาดของผลึกได้หลังจากวิเคราะห์ด้วยรังสีเอ็กซ์ (XRD)

ลิกนินจัดว่าเป็นส่วนประกอบที่มีศักยภาพในการแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมพลังงานและเคมีชีวภาพ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกลิกนินคุณภาพสูงจากชีวมวล 4 ชนิด ได้แก่ ชานอ้อย (BG), ซีลี้อยไม้ (PS), เส้นใยปาล์ม (PF) และเส้นใยมันสำปะหลัง (CF) โดยใช้ส่วนผสมของตัวทำละลายสามเฟสประกอบด้วย methyl isobutyl ketone (MIBK), เอทานอล และน้ำ ในสภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดซัลฟูริก จากผลการทดลองพบว่าการทำปฏิกิริยาการแยกที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ด้วยตัวทำละลายผสมของ MIBK / เอทานอล / น้ำ ในอัตราส่วน 0.25/ 0.42/ 0.33 และเร่งปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ นำไปสู่การกำจัดลิกนินสูงสุดร้อยละ 88.2, 70.6, 67.3, and 71.7 โดยน้ำหนัก จากวัตถุดิบชีวมวล BG, PS, PF และ CF ตามลำดับ ต่อมาลิกนินที่สกัดได้จะถูกนำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีด้วยหลายวิธี ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของลิกนิน (Klason lignin), X-ray fluorescence spectroscopy (XRF), Organic elemental analysis, <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy, และ Fourier transform infrared spectroscopy เป็นต้น หลังจากนั้นตัวอย่างลิกนินข้างต้นจะถูกนำไปทดสอบการแตกสลายด้วยความร้อนในตัวทำละลาย MIBK เพื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์สารเคมีที่มีความจำเพาะพิเศษ สำหรับอนุพันธ์ฟีนอลของ 4-ethylphenol และ 4-vinylguaiacol พบมากในลิกนินที่มาจาก BG ขณะที่ลิกนินที่มาจาก PS พบสาร syringaldehyde และ cis-isoeugenol เป็นหลัก นอกจากนี้สาร phenol และ bis(2-ethylhexyl) phthalate รวมถึง trans-isoeugenol และ hexadecanoic เป็นผลิตภัณฑ์สารเคมีที่ได้จากลิกนิน PF และ CF ตามลำดับ สำหรับงานนี้แสดงให้เห็นถึง

ศักยภาพของลิกนินที่แยกออกด้วยตัวทำละลาย สามารถเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตสารเคมีที่มีมูลค่าเพิ่มในอุตสาหกรรมพลังงานและเคมีชีวภาพต่อไป

**คำหลัก:** ชีวมวล; ไบโอดีเอทานอล; สายพันธุ์แบคทีเรีย *Geobacillus thermoglucosidasius*; กระบวนการแยกองค์ประกอบชีวมวลด้วยตัวทำละลาย; การระเบิดด้วยความดันไอน้ำ; ตัวเร่งปฏิกิริยาเบส; ลิกนิน

## **Executive summary**

In this project, the work focused on development of alternative processes for conversion of palm residues as palm kernel cake (PKC) and palm fiber (PF) from oil palm processing to bioethanol and valuable chemicals. Besides, several lignocellulosic biomasses e.g. sugarcane bagasse (BG), rice straw (RS), cassava fiber (CF), and pararubber wood sawdust (PS) were also studied in this present work. This report was mainly categorized in three routes: (i) utilization of PKC in study effect of steam explosion and enzyme digestibility for production of bioethanol by fermentation using engineered thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius* TM242. (ii) study of alkaline pretreatment in acetone-based organic solvent system for sugar production from rice straw. (iii) characteristics of recovered lignin extracted from different lignocellulosic biomasses via organosolv fractionation. The first part was found that PKC biomass was a promising feedstock for production of bioethanol due to its high carbohydrate content, facile disruption and susceptibility to enzymatic hydrolysis. Ethanol yields of greater than 90% of the theoretical maximum have been achieved by a process involving mild steam explosion pretreatment, enzymatic hydrolysis by the core mannanase and cellulase, and fermentation of the oligosaccharide-rich hydrolysate by *G. thermoglucosidasius* TM242. This conversion process provides the basis for efficient and economic production of ethanol from PKC as part of an integrated biorefinery. Next, the second part reported that novel low-temperature alkali-catalyzed organosolv pretreatment process of rice straw in an aqueous-acetone mixture provided a highly selective separation of the cellulose fraction with high enzymatic digestibility for conversion to fermentable glucose with minimal cross-contamination of pentoses and potential on obtaining high quality lignin for subsequent utilization for conversion to value added products. The final topic showed isolation of lignin from BG, RS, CF, and PS as representatives of softwood, hardwood, and grass plant by organosolv fractionation using ternary solvent mixture of MIBK, ethanol, and water in the presence of acid promoter. Increase of fractionation temperature from 140 to 180 °C led to rising of lignin and hemicellulose removal, and enhancing of cellulose content in remaining solid. As