COMBINED ACID AND ENZYMATIC HYDROLYSIS PRETREATMENT OF CORN COBS

Kasid Tangmanasakul

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
2011

I 28374538

Thesis Title:	Combined Acid and Enzymatic Hydrolysis Pretreatment of Corn Cobs
By:	Kasid Tangmanasakul
Program:	Petrochemical Technology
Thesis Advisors:	Asst. 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:

.....
(Asst. Prof. Apanee Luengnaruemitchai)

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

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

.....
(Dr. Ruengsak Thitiratsakul)

ABSTRACT

5271013063: Petrochemical Technology Program
Kasid Tangmanasakul: Combined Acid and Enzymatic Pretreatment of Corn Cobs
Thesis Advisors: Asst. Prof. Apanee Luengnaruemitchai and Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit 52 pp.
Keywords: Corn Cobs/ Lignocellulose/ Dilute Acid Pretreatment/ Enzymatic Hydrolysis/ Ethanol

Biofuels produced from lignocellulosic materials, so called second generation biofuel, showed energetic economic and environmental advantages in comparison to biofuels produced from starch or sugar. There are mainly two processes involved in the conversion routes: hydrolysis of cellulose to produce reducing sugar and fermentation of sugars to biofuels. Therefore, pretreatment of lignocellulosic materials to remove hemicellulose and lignin can significantly enhance the hydrolysis of cellulose. The main goal of research is to increase the enzyme accessibility by improving digestibility of cellulose. Accordingly, dilute sulfuric acid was used to pretreat corn cobs prior to enzymatic hydrolysis. After pretreatment of corn cobs by dilute acid under the optimal condition (120 °C, 5 min), the highest yield of total sugars of 24.73 g/l was obtained. After enzymatic hydrolysis, the highest yield of total sugars of 22.37 g/l was obtained and the final total sugar yield reached 47.11 g/l. It can be concluded that dilute sulfuric acid pretreatment can be successfully applied for corn cobs to achieve high yields of monomeric glucose and xylose.

บทคัดย่อ

กษิต ตั้งมานะสกุล : การปรับสภาพซังข้าวโพดโดยกรดเจือจางและย่อยสลายให้ได้น้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Combined Acid and Enzymatic Pretreatment of Corn Cobs) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย และ รศ.ดร. สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ 52 หน้า

เชื้อเพลิงชีวภาพผลิตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นเชื้อเพลิงทางเลือก ที่มีประสิทธิผลต่อเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม เมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตจากแป้งหรือน้ำตาลโดยตรง ขั้นตอนการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การแปรสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นน้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมักและ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการแปรสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ดังนั้นการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อจำกัดปริมาณตัวยับยั้งเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน มีนัยสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จุดประสงค์หลักของงานวิจัยคือการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยกรดเจือจาง ดังนั้นทางงานวิจัยใช้กรดซัลฟูริกเจือจางปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ หลังจากการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้กรดซัลฟูริกเจือจางภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (120 องศาเซลเซียส, 5 นาที) ให้ผลผลิตน้ำตาล 24.73 กรัมต่อลิตร หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ให้ผลผลิตน้ำตาล 22.37 กรัมต่อลิตร สุดท้ายผลผลิตน้ำตาลทั้งหมดรวม 47.11 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยกรดซัลฟูริกเจือจางสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

ACKNOWLEDGEMENTS

This work would have not been successful without the assistance of the following individuals and organizations. First of all, I am grateful for the scholarship and funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College; and the National Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials. In addition, this work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission (EN269B).

I would like to express my grateful appreciation to my thesis advisors, Asst. Prof. Apanee Luengnaruemitchai and Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit, for their support and advice throughout this research work. Special thanks go to my friends, especially Miss Piyathida Ploypradith, always encourage me to do the experiment.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
Title Page		i
Abstract (in English)		ii
Abstract (in Thai)		iii
Acknowledgements		iv
Table of Contents		vi
List of Tables		ix
List of Figures		x
CHAPTER		
I	**INTRODUCTION**	1
II	**LITERATURE REVIEW**	3
III	**EXPERIMENTAL**	18
	3.1 Materials	
	3.1.1 Corn Cobs Obtained from Betagro Company	18
	3.1.2 Sulfuric Acid (H_2SO_4)	18
	3.1.3 pH Meter	18
	3.1.4 Citrate Buffer	18
	3.1.5 Filter Paper	18
	3.1.6 Enzyme (Novozyme, Genencer)	18
	3.1.7 Standard Glucose, Xylose, Arabinose, Galactose and Mannose	18
	3.2 Equipment	
	3.2.1 Autoclave	18
	3.2.2 Incubator Shaker	18
	3.2.3 Oven	18
	3.2.4 Water Bath	18

CHAPTER PAGE

3.2.5 Glassware 18
3.2.6 Perkin Elmer Series 200 LC/S/N291N5060508: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a Refractive Index Detector Using an Aminex–HPX 87H Column 18
3.2.7 Scanning Electron Microscope (SEM) 18
3.2.8 Thermogravimetric Analyzer (TGA) 18
3.2.9 X–Ray Diffraction (XRD) 18
3.2.10 Gas Chromatography (GC) 18
3.3 Methodology 19
3.3.1 Pretreatment of Corn Cobs by Dilute Acid 19
3.3.2 Enzymatic Hydrolysis 19
3.3.3 Activity of Enzyme 19
3.3.4 Ethanol Production 20
3.3.5 Analysis Methods 20

IV RESULTS AND DISSCUSSION
4.1 Abstract 23
4.2 Introduction 23
4.3 Methods 25
4.3.1 Biomass Materials 25
4.3.2 Chemical Analysis of Biomass 25
4.3.3 Pretreatment Process 25
4.3.4 Enzymatic Hydrolysis 26
4.3.5 Overliming with Calcium Hydroxide 27
4.3.6 Ethanol Production 27
4.3.7 Analysis Methods 27

CHAPTER **PAGE**

4.4 Results and Discussion 28
4.4.1 Biomass Characterizations 28
4.4.2 Dilute Acid Pretreatment 31
4.4.3 Enzymatic Hydrolysis 33
4.4.4 Total Sugar 35
4.4.5 Physical Characterization of Pretreated Corn Cobs 36
4.4.6 Ethanol Production 40
4.5 Conclusions 40
4.6 References 41

V **CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS** 43
5.1 Conclusions 43
5.2 Recommendations 43

REFERENCES 44

APPENDICES 46
Appendix A Autoclave 46
Appendix B Activity of Enzyme 48
Appendix C Standard Curve of HPLC 50

CURRICULUM VITAE 52

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Composition of some agricultural lignocellulosic biomass	5
4.1	Chemical composition of corn cobs	28
4.2	Elements of corn cobs	30
4.3	Glucose and arabinose in the prehydrolyzate after the dilute sulfuric acid pretreatment of corn cobs	33
4.4	Summary of total acid pretreatment and enzymatic hydrolysis results for best overall combined yields for each acid/temperature time series	36
4.5	Effect of acid pretreatment on the compositions, physical properties and enzymatic hydrolysis of the pretreated residues	38

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1.1	Corn production and price in Thailand during 2001–2007	1
2.1	Different pathways for the production of biofuel from lignocellulosic biomass	3
2.2	Lignocellulose consists of cellulose, hemicellulose and lignin	6
2.3	Structure of cellulose chain	6
2.4	Structure of arabinoxylan	7
2.5	Structure of glucomannan	7
2.6	Structures of monolignols	8
2.7	Schematic of goals of pretreatment on lignocellulosic material	9
2.8	Schematic of pretreatment process	10
3.1	Pretreatment and hydrolysis procedure flow diagram	22
4.1	Flow diagram of dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis	26
4.2	TGA curve of corn cobs	29
4.3	Monomeric xylose measured in the prehydrolyzate after pretreatment as a function of sulfuric acid concentration (v/v) and temperature for (a) 5 min (b) 15 min (c) 30 min and (d) 60 min residence time	31
4.4	Monomeric glucose measured in the prehydrolyzate after pretreatment as a function of sulfuric acid concentration (v/v) and temperature for (a) 5 min (b) 15 min (c) 30 min and (d) 60 min residence time	32
4.5	Enzymatic releasing of sugars from pretreated corn cobs	32
4.6	SEM micrographs of before corn cobs	39
4.7	SEM micrographs of pretreated corn cobs	39
4.8	Time courses of ethanol production by the *Saccharomyces Cerevisiae* from corn cobs	40