

# **Production of Ethanol from Mission Grass**

Darin Khumsupan

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,  
and Case Western Reserve University  
2014

I28370379

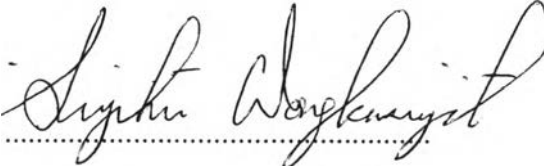
**Thesis Title:** Production of Ethanol from Mission Grass  
**By:** Darin Khumsupan  
**Program:** Polymer Science  
**Thesis Advisors:** Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit  
Asst. Prof. Thanyalak Chaisuwan  
Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai


---

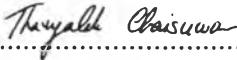
Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

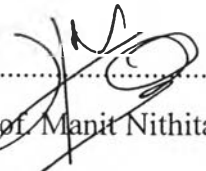
  
..... College Dean  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)


**Thesis Committee:**

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

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

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

  
.....  
(Asst. Prof. Manit Nithitanakul)

  
.....  
(Asst. Prof. Bussarin Ksapabutr)

**ABSTRACT**

5572003063: Polymer Science Program

Darin Khumsupan: Production of Ethanol from Mission Grass

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit, Asst. Prof.

Thanyalak Chaisuwan, Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai, 79 pp.

Keywords: Bioethanol, Mission grass, Lignocellulosic biomass, Overliming, *Saccharomyces cerevisiae*

Mission grass (*Pennisetum polystachion*) is one of the lignocellulosic biomass candidates for the production of bioethanol. After the grass underwent through milling and alkaline pretreatment, it was subjected to acid and enzymatic hydrolysis. Glucose, the source of ethanol fermentation, was obtained after the hydrolysis process. The grass hydrolyzate was overlimed at various pH; and then sodium sulfite was added to remove inhibitory compounds and degradation products such as furfural and hydroxymethylfurfural. Overliming at pH 10 gave the highest ethanol yield. Among various strains of baker's yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 could produce the highest concentration of ethanol at 16 g/l within 24 h. Yeast population count was studied under a microscope. The change of glucose concentration in the hydrolyzate was detected by high performance liquid chromatography (HPLC), and the production of ethanol was determined using gas chromatography (GC).

## บทคัดย่อ

นางสาวคารินทร์ คุ้มสุพรรณ: การผลิตเอทานอลจากหญ้าจรจบดอกเล็ก (The production of Ethanol from Mission Grass)อ. ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธัญญลักษณ์ ฉายสุวรรณและ รองศาสตราจารย์ ดร. อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย 79 หน้า

- หญ้าจรจบดอกเล็กเป็นหนึ่งในชีวมวลที่สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลได้ หลังจากที่หญ้าถูกนำมาผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยการบดและการใช้ค่าเชิงกลูโคสของหญ้าจะถูกนำมาย่อยสลายด้วยกรดและเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถนำไปผลิตเอทานอลจากยีสต์ น้ำหญ้าที่ถูกสกัดออกมาจะนำมาผ่านกระบวนการโอเวอร์ไลม์ในความเป็นกรดค้างที่กำหนดและใส่โซเดียมซัลไฟด์หลังจากนั้น เพื่อเอาสารที่ยับยั้งการผลิตเอทานอลจากยีสต์ เช่นเฟอร์ฟูรอลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัลที่ถูกล้างออกจากรำหญ้า โอเวอร์ไลม์ที่มีความเป็นกรดค้างที่ 10 ได้ค่าเอทานอลที่สูงที่สุด เชื้อยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลได้เยอะที่สุดและเร็วที่สุดคือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้มากถึง 16 กรัมต่อลิตรภายใน 24 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงของประชากรของยีสต์ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและเอทานอลนั้นถูกศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีและก๊าซโครมาโตกราฟี ตามลำดับ

## ACKNOWLEDGEMENTS

I owe my deepest gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit. The enormous thoughtfulness behind terrifying voice and stern face has transcended me to exceed above my expectation. Her never-ending persistence in telling me that hard work is rewarding has proven correct once again. She is a perfect epitome of a teacher.

This work would not be possible without helpful hints, caring supports, and constructive criticisms from my co-advisors, Asst. Prof. Thanyalak Chaisuwan and Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai. Your useful advices and recommendations are priceless to this project.

I dedicate this thesis to my parents who have equipped me with confidence, perseverance, compassion, and most importantly, integrity. With those qualities, I have already considered myself successful; anything beyond those is exclusively profits.

I consider it an honor to work with “Grass Group”; lab work has never been so full of laughter and hugs.

Lastly, I am grateful for the scholarship and funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College; and the Center of Excellence for Petrochemical and Materials Technology, Thailand.

## 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	viii
List of Figures	ix
 <b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
 <b>II LITERATURE REVIEW</b>	 <b>3</b>
 <b>III EXPERIMENTAL</b>	 <b>20</b>
3.1 Materials	20
3.2 Equipment	20
3.3 Methodology	21
3.3.1 Mission Grass Preparation	21
3.3.2 Pretreatment of Mission Grass	21
3.3.3 Hydrolysis of Mission Grass	22
3.3.4 Detoxification of Mission Grass Hydrolyzate	22
3.3.5 Fermentation of Mission Grass Hydrolyzate	22
 <b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	 <b>24</b>
4.1 Particle Size Analysis of Mission Grass	24
4.2 Chemical Composition of Mission Grass	24
4.3 Alkaline Pretreatment of Mission Grass	25
4.4 Acid Hydrolysis of Mission Grass	27

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
4.5 Enzymatic hydrolysis of mission grass	27
4.6 Optimization of Detoxification Process on Mission Grass Hydrolyzate	29
4.6.1 Physical Detoxification	29
4.6.2 Chemical Detoxification	30
4.7 Fermentative Microorganism	32
4.8 Optimization of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains for ethanol production	36
<b>V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>42</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>43</b>
<b>APPENDICES</b>	<b>49</b>
<b>Appendix A</b> Detection of glucose by HPLC before and after enzymatic hydrolysis	49
<b>Appendix B</b> Detection of glucose during overliming process	50
<b>Appendix C</b> Yeast population count at various overliming pH	51
<b>Appendix D</b> Detection of glucose when mission grass hydrolyzate was overliming at various pH	56
<b>Appendix E</b> Detection of ethanol when mission grass hydrolyzate was overliming at various pH	61
<b>Appendix F</b> Yeast population count at various yeast strains ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	66
<b>Appendix G</b> Detection of glucose consumption by each strain of <i>S. cerevisiae</i>	70
<b>Appendix H</b> Detection of ethanol produced by various strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>78</b>

**LIST OF TABLES**

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
2.1	Cellulose, hemicelluloses, and lignin contents in some lignocellulosic materials	5
4.1	The chemical compositions of mission grass obtained from Tak and Nakornratchasima Provinces, Thailand	25



## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Ethanol production process from lignocellulosic biomass	3
2.2 Detailed model of plant cell wall	4
2.3 Structural formula of cellulose	6
2.4 A model of cellulases: endoglucanases (endo-1-4- $\beta$ -glucanase), exoglucanase (cellobiohydrolase), and $\beta$ -glucosidase	10
2.5 A model of xylanases and the accessory enzymes in wood xylans	11
2.6 Sugar and lignin can further be degraded to form compounds that may decrease ethanol yield	13
4.1 The SEM images in each treatment stage of mission grass (1000x)	26
4.2 Glucose concentration obtained after acid hydrolysis and after enzymatic hydrolysis	28
4.3 The effect of overliming in comparison to the hydrolyzate before overliming	31
4.4 Yeast ( <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5049) population at various overliming pH per incubation time	33
4.5 Glucose consumption of <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5049 per incubation time	34
4.6 Ethanol production of mission grass hydrolyzate by <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5049 at overliming pH 8-12	35
4.7 Various strains of baker's yeast ( <i>S. cerevisiae</i> ) count per incubation time at pH 10 overliming	37
4.8 Glucose concentration per incubation time for various strains of baker's yeast <i>S. cerevisiae</i> at pH 10 overliming	38

4.9	The production of ethanol from various strains of <i>S. cerevisiae</i> in 96 h	40
-----	--	----