การปรับสภาพหญ้ากินนีพันธุ์ TD 53 *Panicum maximum* Jacq. cv. TD 53 เพื่อเพิ่มการสลายด้วยน้ำของเซลลูเลสสำหรับการหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae*

นางสาวสุวภัทร์ รัศมี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRETREATMENT OF GUINEA GRASS *Panicum maximum* Jacq. cv. 'TD 53' TO ENHANCE CELLULASE HYDROLYSIS FOR ETHANOL FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae*

Miss Suwaphat Ratsamee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn Universit

522248

Thesis Title	PRETREATMENT OF GUINEA GRASS *Panicum maximum* Jacq. cv. 'TD 53' TO ENHANCE CELLULASE HYDROLYSIS FOR ETHANOL FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae*
By	Miss Suwaphat Ratsamee
Field of Study	Industrial Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Ancharida Akaracharanya, D.Eng.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Natchanun Leepipatpiboon, Dr.rer.nat.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairperson
(Associate Professor Suthep Thaniyavarn, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Ancharida Akaracharanya, D.Eng.)

.....Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Natchanun Leepipatpiboon, Dr.rer.nat.)

.....Examiner
(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

.....External Examiner
(Associate Professor Vichien Kitpreechavanich, D.Eng.)

สุวภัทร์ รัศมี : การปรับสภาพหญ้ากินนีพันธุ์ TD 53 *Panicum maximum* Jacq. cv. TD 53 เพื่อเพิ่มการสลายด้วยน้ำของเซลลูเลสสำหรับการหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* (PRETREATMENT OF GUINEA GRASS *Panicum maximum* Jacq. cv. 'TD 53' TO ENHANCE CELLULASE HYDROLYSIS FOR ETHANOL FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae*) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, 85 หน้า.

นำหญ้ากินนีพันธุ์ TD 53 (หญ้ากินนีสีม่วง) ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส 41.7 % (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เฮมิเซลลูโลส 27.1% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และ ลิกนิน 10.4% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ไปอบแห้งและบดให้มีขนาด 20-40 เมช เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพคือ หญ้ากินนีสีม่วง 6% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ 1.5 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่อ 1 กรัมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำหญ้ากินนีสีม่วงมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (45 หน่วยเอนไซม์/กรัมน้ำหนักแห้งของใบหญ้ากินนีสีม่วง หรือ 400 หน่วยเบต้ากลูโคสิเดส/กรัมน้ำหนักแห้งของใบหญ้ากินนีสีม่วง) 53 หน่วยเอนไซม์/กรัมน้ำหนักแห้งของใบหญ้ากินนีสีม่วง (471 หน่วยเบต้ากลูโคสิเดสต่อกรัมน้ำหนักแห้งของใบหญ้ากินนีสีม่วง)ที่ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้สารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นสูงสุด 11.9 กรัมต่อลิตร หรือ 0.25 กรัมน้ำตาลกลูโคส/กรัมของหญ้ากินนีสีม่วงแห้ง

นำสารละลายน้ำตาลกลูโคส (11.9 กรัมต่อลิตร)ที่ได้มาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักเอทานอลแบบแยกกระบวนการผลิตน้ำตาลและกระบวนการหมัก และ นำหญ้ากินนีสีม่วงปรับสภาพแล้วมาหมักเป็นเอานอลโดยกระบวนการหมักเอทานอลแบบย่อยสลายต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* ในทั้ง 2 กระบวนการ พบว่าผลการหมักโดยกระบวนการหมักเอาทนอลแบบแยกกระบวนการผลิตน้ำตาลและกระบวนการหมักเป็นเวลา 2 วัน ได้เอทานอล 5.24 กรัม/ลิตร หรือ 0.44 กรัม/กรัมของน้ำตาลกลูโคส หรือ 0.087 กรัม/กรัมของหญ้ากินนีสีม่วงแห้ง ส่วนผลการหมักเอทานอลแบบย่อยสลายต่อเนื่องพบว่าได้เอทานอล 4.45 กรัม/ลิตร หลังการหมัก 4 วัน หรือ 0.074 กรัม/กรัมของหญ้ากินนีสีม่วงแห้ง นั่นคือกระบวนการหมักเอทานอลแบบแยกกระบวนการผลิตน้ำตาลและกระบวนการหมักให้ผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อกรัมของหญ้ากินนีสีม่วง) สูงกว่ากระบวนการหมักเอทานอลแบบย่อยสลายต่อเนื่อง

ผลการหมักเอทานอลในระดับขยายส่วน (ปริมาตร 3 ลิตรในถังหมักขนาด 5 ลิตร) โดยกระบวนการหมักแบบแยกกระบวนการผลิตน้ำตาลและกระบวนการหมัก จากสารละลายน้ำตาลกลูโคส 12 กรัม/ลิตร ได้เอทานอล 5.92 กรัม/ลิตร หรือ 0.497 กรัม/กรัมของน้ำตาลกลูโคส หรือ 0.099 กรัม/กรัมของหญ้ากินนีสีม่วงแห้ง ประสิทธิภาพของกระบวนการหมักเอทานอลในระดับขยายส่วนเพิ่มขึ้น 13 % จาก 0.44 กรัม/กรัมของน้ำตาลกลูโคส (ในระดับฟลาสก์) เป็น 0.49 กรัม/กรัมของน้ำตาลกลูโคส (ในระดับถังหมัก)

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....สุวภัทร์ รัศมี.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5172526123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : PRETREATMENT, *Panicum maximum*, ETHANOL

SUWAPHAT RATSAMEE: PRETREATMENT OF GUINEA GRASS *Panicum maximum* Jacq. cv. 'TD 53' TO ENHANCE CELLULASE HYDROLYSIS FOR ETHANOL FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae*. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, D.Eng., THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. NATCHANUN LEEPIPATPIBOON, Dr. rer .nat., 85 pp.

Panicum maximum cv TD 53 (purple guinea grass) consisting of 41.7%(w/w) cellulose, 27.1%(w/w) hemicelluloses, and 10.4 %(w/w) lignin was oven-dried, cut and Hammer milled to 20-40 mesh particle size, and used as substrate for ethanol production by *S. cerevisiae*. Optimal condition for pretreatment process was (6% w/v) substrate loading, 1.5 g substrate/g $Ca(OH)_2$, heating at 121 °C, 15 lb/inc^2 for 5 min. Then the pretreated purple guinea grass was hydrolyzed with Accellerase ™ 1000 (45 FPU/g DS or 400 unit of β-glucosidase /g DS)) using 53 FPU/g (DS) substrate (471 unit of β-glucosidase /g DS) at 50 °C, 120 rpm for 6 hours. Maximum reducing sugars liberated was 11.9 g/l or 0.25 g glucose/g (DS).

The glucose solution (11.9 g/l) obtained after cellulase hydrolysis of the pretreated purple guinea grass was used as substrate for ethanol fermentation by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *S. cerevisiae*. After 48 hours, ethanol (5.24 g/l or 0.087 g/g (DS) purple guinea grass or 0.44 g/g glucose) was produced. Ethanol fermentation of the pretreated purple guinea grass by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) method using *S. cerevisiae,* maximum ethanol (4.45 g/L) (0.074 g/g (DS) purple guinea grass) was produced after 96 hours. The result indicated that the SHF process gave higher ethanol yield than SSF in term of g/g (DS) purple guinea grass. Scaling up of the SHF process to 3L working volume in 5L jar fermenter using glucose solution (12.0 g/l) yielded ethanol 5.92 g/l or 0.497 g/g glucose or 0.099 g/g (DS) purple guinea grass. An ethanol production yield increased about 13% from 0.44 g/g glucose in flask scale to 0.49 g/g glucose in 5 L fermenter scale.

Department: Microbiology Student's Signature Suwaphat Ratsamee

Field of Study: Industrial Microbiology Advisor's Signature

Academic Year: 2009 Co-Advisor's Signature Natchanun Leepipatpiboon

ACKNOWLEDGMENTS

To success of this research would not be realized without the support and assistance of some persons and various institutions to whom I would like to express my grateful appreciation as follow:

Associate Professor Dr. Ancharida Akaracharanya, my advisor, for her guidance, kindly assistance, supervision and valuable advice throughout research work.

Assistant Professor Dr. Natchanan Leepipatpiboon my co-advisor, Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for her guidance and valuable advice for the research.

To thank highly, Associate Professor Dr. Suthep Thaniyavarn for serving as the thesis committee chairperson and Associate Professor Dr. Pairoh Pinphanitchakarn for serving as thesis committee member and their recommendations for the research.

To thank highly, Associate Professor Dr. Vichien Kitpreechavanich, Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University for serving as thesis committee member and his valuable advice and recommendations for the research.

To thank highly, Dr Teerapatr Srinorakutara, Biotechnology Department, Thailand Institute of Scientiic and Technological Research (TISTR), for his guidance and valuable advice for the research.

To thank, all staff members, my friend, and members in laboratory 405 in the Department of Microbiology for their help and friendship during my study.

This study is financed by the Chulalongkorn University Graduate Scholarship to Commemorate the 72nd Anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej and Graduate Thesis Grant.

Finally, I wish to express my sincere and infinite gratitude to my family for their love, understanding, consultative and mortal support throughout my study

CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai)....iv

ABSTRACT (English)....v

ACKNOWLEDGEMENTS....vi

CONTENTS....vii

LIST OF TABLES....xi

LIST OF FIGURES....xii

LIST OF ABBREVIATIONS xiv

CHAPTER

I. INTRODUCTION....1

II. LITERATURE REVIEWS....3

2.1 Guinea grass....3

2.2 Ethanol....4

2.2.1 Ethanol production....5

2.2.1.2 Hydration of ethylene....5

2.2.1.2 Alcoholic fermentation....5

2.2.2 Raw material for ethanol production....6

2.3 Lignocellulose....7

2.4 Lignocellulosic ethanol production....9

2.4.1 Pretreatment....10

2.4.2 Enzymatic hydrolysis....14

2.4.3 Fermentation....16

III. MATERIALS AND METHODS....22

MATERIALS....22

3.1 Purple guinea grass....22

3.2 Equipments....22

3.3 Chemicals....23

3.4 Microorganisms....24

CHAPTER **Page**

METHODS.....24

3.5 Experiments.....24

3.6 Microorganisms.....25

3.6.1 Maintainance of microorganisms.....25

3.6.2 Cultivation of microorganism.....25

3.7 Raw material preparation.....25

3.8 Pretreatment of purple guinea grass.....25

3.8.1 Effect of sulfuric acid concentration on cellulase susceptibility 25

3.8.2 Effect of calcium hydroxide or lime concentration on cellulase susceptibility.....26

3.8.3 Effect of substrate loading on cellulase susceptibility.....26

3.8.4 Effect of autoclaving period on cellulase susceptibility.....26

3.9 Analysis of sugars and byproducts in pretreatment hydrolysate.....26

3.10 Cellulase hydrolysis.....27

3.11 Ethanol production.....27

3.11.1 Ethanol production by Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) method.....27

3.11.1.1 Effect of incubation period on ethanol production.....27

3.11.1.2 Effect of $(NH_4)_2SO_4$ supplementation on ethanol Production.....28

3.11.1.3 Effect of nutrient supplementation on ethanol Production.....28

3.11.1.4 Effect of inoculum medium on ethanol production.....28

3.11.2 Ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) method.....28

3.11.2.1 Effect of temperature on ethanol production.....29

3.11.2.2 Effect of reaction pH on ethanol production.....29

3.11.2.3 Effect of incubation period on ethanol production.....29

3.11.2.4 Effect of nutrient supplementation on ethanol production.....29

CHAPTER **Page**

3.11.2.5 Effect of inoculum medium on ethanol production.....29

3.12 Scale up for ethanol fermentation.....30

3.13 Analytical procedure.....31

3.13.1 Analysis of ethanol by gas chromatography.....31

3.13.2 Analysis of sugar and pretreatment byproduct by High Performance Liquid Chromatography.....31

3.13.3 Analysis of reducing sugar.....32

3.13.4 Analysis of glucose by glucose analyzer.....32

IV. RESULTS.....33

4.1 Purple guinea grass.....33

4.2 Pretreatment optimization.....33

4.2.1 Effect of sulfuric acid concentration on pretreatment.....33

4.2.2 Effect of calcium hydroxide (lime) concentration on pretreatment ...34

4.2.3 Effect of substrate loading on pretreatment.....34

4.2.4 Effect of autoclaving period on pretreatment.....34

4.3 Sugars and byproducts in pretreatment hydrolysate.....38

4.4 Cellulase hydrolysis.....38

4.5 Ethanol production.....40

4.5.1 Ethanol production by Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) method.....40

4.5.1.1 Effect of incubation period on ethanol production by SHF method.....40

4.5.1.2 Effect of $(NH_4)_2SO_4$ supplementation on ethanol production by SHF method.....40

4.5.1.3 Effect of nutrient supplementation on ethanol production by SHF method.....41

4.5.1.4 Effect of inoculum medium on ethanol production by SHF method.....41

CHAPTER **Page**

4.5.2 Ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) method.....43

4.5.2.1 Effect of temperature on ethanol production by SSF method.....43

4.5.2.2 Effect of pH on ethanol production by SSF method.....43

4.5.2.3 Effect of incubation time on ethanol production by SSF method.....44

4.5.2.4 Effect of nutrient supplementation on ethanol production by SSF method.....44

4.5.2.5 Effect of inoculum medium on ethanol production by SSF method.....44

4.6 Scale up for ethanol fermentation.....47

V. CONCLUSIONS AND DISCUSSIONS.....49

REFERENCES.....53

APPENDICES.....60

Appencix A : Culture media.....61

Appendix B : Reagents and buffers.....62

Appendix C : Standard curve 64

Appendix D : Sugar and byproducts in hydrolysate.....75

BIOGRAPHY.....85

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Chemical composition of purple guinea grass	33
2	Byproducts and sugars in an optimized pretreatment hydrolysate	38
3	Glucose liberated in cellulase hydrolysate of $Ca(OH)_2$ pretreated purple guinea grass (A) Glucose liberated in cellulase hydrolysate of H_2SO_4 pretreated purple guinea grass (B)	39

LIST OF FIGURES

FIGURE		Page
1	Guinea grass (A).....	3
	Flowering stock (B).....	4
2	Chemical structure of ethanol.....	4
3	Hydration of ethylene pathway.....	5
4	Alcpholic fermentation pathway.....	5
5	Corn (A), Cassava (B) and Potato (C)	6
6	Molasses (A), Sugarcane (B) and Beetroot (C).....	6
7	Bagasses (A) Rice straw (B) Corncob (C).....	6
8	Lignocellulose in plant cell wall.....	7
9	Cellulose structure.....	8
10	Homopolymeric backbone chain in xylan structure.....	8
11	Three monomeric precursors of lignin.....	9
12	Schematic diagram showing hydrolysis cellulose by cellulolytic enzyme.....	15
13	Process flow diagrams of separate enzymatic hydrolysis and fermentation (SHF) process.....	19
14	Process flow diagrams of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process.....	20
15	Purple guinea grass.....	22
16	Flow diagrams of experiments.....	24
17	Fermenter (B.E. Marubishi, model 10L, Japan).....	30
18	Effect of sulfuric acid concentration on cellulase susceptibility.....	35
19	Effect of calcium hydroxide (lime) concentration on cellulase susceptibility.....	35
20	Effect of substrate loading on sulfuric acid pretreatment on cellulase susceptibility (A) and calcium hydroxide or lime pretreatment on cellulase susceptibility (B).....	36
21	Effect of sulfuric acid pretreatment period on cellulase susceptibility of purple guinea grass (A) and calcium hydroxide or lime pretreatment	

FIGURE **Page**

period on cellulase susceptibility of purple guinea grass(B).....37

22 Effect of incubation period on ethanol production by SHF method.....41

23 Effect of $(NH_4)_2SO_4$ supplementation on ethanol production by SHF method.....42

24 Effect of nutrient supplementation on ethanol production by SHF method.....42

25 Effect of inoculum medium on ethanol production by SHF method.....43

26 Effect of temperature on ethanol production by SSF method.....45

27 Effect of pH on ethanol production by SSF method.....45

28 Effect of incubation time on ethanol production by SSF method.....46

29 Effect of nutrient supplementation on ethanol production by SSF method.....46

30 Effect of inoculum medium on ethanol production by SSF method.....47

31 Separate hydrolysis and ethanol fermentation of purple guinea grass in 5L fermentor scale.....48

32 Ethanol yield of each step in the experiments.....51

LIST OF ABBREVIATIONS

w/v	=	weight per volume
w/w	=	weight per weight
v/v	=	volumn per volumn
mg/ml	=	milligram per milliliter
mg/g	=	milligram per gram
g/g	=	gram per gram
mM	=	millimolar
ml	=	milliliter
g/l	=	gram per liter
ml/g	=	milliliter per gram
ml/mim	=	milliliter per minute
L	=	Liter
N	=	Normality
min	=	minute
m	=	metre
cm	=	centimeter
mm	=	millimeter
nm	=	nanometre
FPU/ml	=	filter paper unit per milliliter
DS	=	dry substrate
lb/inc^2	=	pounds per square inch
°C	=	degree celsius
rpm	=	round per minute
atm	=	atmosphere
h	=	hour
NaOH	=	Sodium hydroxide
H_2SO_4	=	Sulfuric acid
HCl	=	Hydrochloric acid

$Ca(0H)_2$	=	Calcium hydroxide
SSF	=	Simultaneous saccharification and fermentation
SHF	=	Separate hydrolysis and fermentation
$(NH_4)_2SO_4$	=	Ammonium sulfate
$(NH_4)_2HPO_4$	=	Ammonium phostphate, dibasic
MeOH	=	methanol
ATP	=	adenosine triphosphate
CO_2	=	carbondioxide
TISTR	=	Thailand Institute of Scientific Technological Research
pNPG	=	para-nitrophenyl-B-D-glucopyranoside