

**ALCOHOL FUELS PRODUCTION BY FERMENTATION FROM  
CHEMICAL PRETREATMENT AND ENZYMATIC SACCHARIFICATION  
OF CORNCOB**

Akarin Boonsombuti


A Dissertation Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy  
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University  
in Academic Partnership with  
The University of Michigan, The University of Oklahoma,  
and Case Western Reserve University

2013

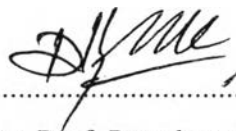
**Thesis Title:** Alcohol Fuels Production by Fermentation from Chemical Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corncob  
**By:** Akarin Boonsombuti  
**Program:** Petrochemical Technology  
**Thesis Advisors:** Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai  
Asst. Prof. Charnwit Kositanont

---

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

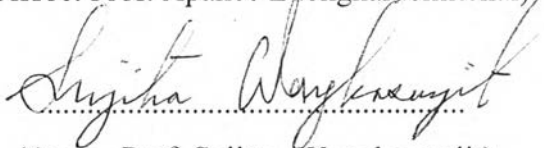
  
..... College Dean  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

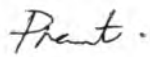
**Thesis Committee:**

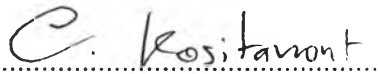
  
.....  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

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

  
.....  
(Dr. Kittinan Komolpis)

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

  
.....  
(Dr. Pramote Chumnanpuen)

  
.....  
(Asst. Prof. Charnwit Kositanont)

## ABSTRACT

5081004063: Petrochemical Technology Program

Akarin Boonsombuti: Alcohol Fuels Production by Fermentation from Chemical Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corncob.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Apanee Luengnaruemitchai, Asst. Prof. Charnwit Kositanont 125 pp.

Keywords: Biobutanol/ *Clostridium acetobutylicum*/ *Clostridium beijerinckii*/ Corncob/ Pretreatment

This study was aiming for produce biobutanol from corncob to substitute fossil fuel, which approach the shortage in the near future. The first work focused in the optimization of biobutanol production using 2 bacterial strains, *Clostridium beijerinckii* TISTR1461 and *Clostridium acetobutylicum* TISTR1462, provided by Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). They were chosen as they have a potential in the excretion of solventogenic products. The fermentation was performed via the ABE (Acetone–Butanol–Ethanol) fermentation or Weizmann process under the anaerobic condition. The comparison between 2 strains were studied in the typical condition and further investigated in the regulation of ammonium acetate and D–xylose consumption which was expected to increase the biobutanol production. The studied condition was applied to corncob hydrolysate obtained from dilute sulfuric acid pretreatment instead of synthetic medium to monitor the possibility of carbon source substitution (mainly glucose and xylose). The positive result of acid pretreated corncob substitution led to the second work of base pretreatment (Sodium hydroxide). The base pretreatment and enzymatic hydrolysis of corncob was studied using microwave irradiation as a heating source which was expected to hydrolyse better than conventional heating source. The characterization of corncob after base pretreatment was evaluated along with the result of total monomeric sugar after enzymatic hydrolysis using Celluclast 1.5L. Obtained sugars were used as a substrate for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* instead of *C. beijerinckii* since it was inhibited by salt

from base pretreatment. Then, acid pretreatment of corncob was promised to be the better route than base pretreatment. The third part of this work then involved with the optimization condition of acid pretreatment by sulfuric acid using Response Surface Methodology (RSM). The characterization of corncob before and after pretreatment under the optimum condition was carried out to observe surface morphology of corncob and its relation to enzymatic hydrolysis. Sugars obtained from sulfuric pretreatment combined with enzymatic hydrolysis were subjected to use as a substrate for ABE fermentation. However, due to the inhibitors from sulfuric pretreatment, sulfuric hydrolysed corncob cannot be applied as a substrate for ABE fermentation without the detoxification process which consume cost and time. The alternate type of acid, nitric and phosphoric acid, were studied in the fourth work. Since it was found that phosphoric pretreated corncob could be used as a substrate for ABE fermentation, the condition of enzymatic saccharification was optimized using RSM and confirmed by non-commercial enzyme from Siam Victory Company. The effect of cellobiase loading was studied to enhance the released sugars of cellulase at the optimum condition. Then the hydrolysate was used as a substrate for ABE fermentation under different conditions to define its limitation for bacterial growth and biobutanol production.

## บทคัดย่อ

อัครินทร์ บุญสมบัติ : การผลิตเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการหมักจากการย่อยซังข้าวโพดด้วยวิธีการทางเคมีและเอนไซม์ (Alcohol Fuels Production by Fermentation from Chemical Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corncob)

อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย, ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โคมิตานนท์ 125 หน้า

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตไบโอเอทานอลจากซังข้าวโพดเพื่อทดแทนการใช้พลังงานจากแหล่งฟอสซิลที่มีแนวโน้มว่าจะหมดไปในอนาคตอันใกล้ ในงานแรกของการศึกษานี้มุ่งเน้นไปที่การหาสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตไบโอเอทานอลจากเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Clostridium beijerinckii* TISTR1461 และ *Clostridium acetobutylicum* TISTR1462 โดยแบคทีเรียดังกล่าวได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตไบโอเอทานอลในงานวิจัยปัจจุบัน การผลิตไบโอเอทานอลผ่านกระบวนการหมักที่เรียกว่า การหมักอะซีโดน-บิวทานอล-เอทานอล หรือกระบวนการของวิซมานน์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน การศึกษาเริ่มต้นด้วยการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไบโอเอทานอลจากเชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ในสภาวะที่ศึกษาและศึกษาต่อในเรื่องของผลการใช้แอมโมเนียมอะซิเตตและน้ำตาลไซโลส ซึ่งการแปรค่าของทั้งสองตัวแปรส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการผลิตไบโอเอทานอล ค่าที่เหมาะสมของทั้งการเพิ่มของทั้งสองตัวแปรในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกนำมาใช้ในของเหลวที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางซึ่งได้น้ำตาลเป็นส่วนประกอบ (โดยมีน้ำตาลไซโลสและกลูโคสเป็นหลัก) แทนการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสรุปได้ว่าของเหลวที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดด้วยกรดสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงนำไปสู่งานที่ 2 ซึ่งใช้เบสในการย่อยซังข้าวโพดแทนการใช้กรด ในการศึกษาที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการย่อยซังข้าวโพดออกปฏิกิริยากับการใช้เอนไซม์ช่วยย่อยเพิ่มอีกหนึ่งขั้นตอน โดยในขั้นตอนของการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะย่อยโดยใช้แหล่งความร้อนจากไมโครเวฟซึ่งคาดว่าจะสามารถย่อยได้ดีกว่าการใช้แหล่งความร้อนปกติ นอกจากนี้ยังมีการประเมินสมบัติทางกายภาพของซังข้าวโพดที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการย่อยด้วยเบส รวมถึงปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ Celluclast 1.5L จากนั้นน้ำตาลในสารละลายดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตไบโอเอทานอล (แทนการใช้ *C. beijerinckii* เนื่องจากเกลือที่เกิดจากการย่อยด้วยเบสมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย) จาก

ผลการศึกษาดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าการย่อยซังข้าวโพดด้วยกรดสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อให้แก่แบคทีเรียได้ในทางปฏิบัติในขณะที่การย่อยด้วยเบสมีเกลือละลายอยู่ในสารละลายน้ำตาลซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในการศึกษาส่วนที่ 3 จึงเน้นไปที่การหาสภาวะที่ดีที่สุดในการย่อยซังข้าวโพดด้วยกรดโดยใช้กระบวนการการตอบสนองต่อพื้นผิวมาช่วยในการออกแบบการทดลองและสรุปผล เช่นเดียวกับการศึกษาการย่อยซังข้าวโพดด้วยเบส, สมบัติทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของซังข้าวโพดก่อนและหลังการย่อยซังข้าวโพดด้วยกรดที่สภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากกระบวนการการตอบสนองต่อพื้นผิวก็มีการประเมินควบคู่ไปกับน้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วย จากนั้นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วยกรดและเอ็นไซม์จะถูกนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแก่กระบวนการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล อย่างไรก็ตามการนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นไม่สามารถนำมาใช้ได้โดยตรงแต่ต้องผ่านกระบวนการ Overliming ในการกำจัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เกิดจากการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก มีผลในการเพิ่มทั้งค่าใช้จ่ายและเวลา รวมถึงค่าใช้จ่ายในการกำจัดตะกอนที่เกิดขึ้นจำนวนมากจากกระบวนการดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษาส่วนที่ 4 จึงเน้นไปที่ชนิดของกรดที่ใช้ในการย่อยเทียบกับกรดซัลฟิวริก ได้แก่ กรดไนตริกและกรดฟอสฟอริก จากการเปรียบเทียบชนิดของกรดที่ใช้ในเบื้องต้นพบว่า การย่อยซังข้าวโพดด้วยกรดฟอสฟอริกสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทันที โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ Overliming ในการศึกษาถัดมาจึงเป็นการหาสภาวะที่ดีที่สุดในการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอ็นไซม์ ซึ่งใช้ซังข้าวโพดที่ได้จากการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก โดยใช้กระบวนการตอบสนองต่อพื้นผิวเช่นเดียวกับในการศึกษาก่อนหน้า จากนั้นจึงทำการทดลองเพื่อยืนยันผลอีกครั้งโดยใช้เอ็นไซม์จากบริษัท Siam Victory เพื่อให้มั่นใจว่าสภาวะที่ได้จากการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้ได้กับเอ็นไซม์ที่ผลิตได้เองในประเทศ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของการเพิ่มเอ็นไซม์เซลโลไบเอสในการทำงานร่วมกับเอ็นไซม์เซลลูเลสด้วย ทำยที่สุด น้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกและเอ็นไซม์จึงถูกนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล โดยมีการแปรสภาวะที่ใช้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพื่อหาข้อจำกัดที่เกิดขึ้นในกระบวนการดังกล่าว

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work is dedicated to the first scientist I've ever known, my father, who has passed away forever and thanks to my family who assisted me along this path.

I would like to express my deepest appreciation to my thesis advisors, Assoc.Prof. Apanee Luengnaruemitchai who keens to help me in any problems pop up during the Ph.D. program and also to my co-advisor Asst. Prof. Charnwit Kositanont. Thanks to the Development and Promotion of Science and Technology talents project (DPST) scholarship that provided the great opportunity in the study since the bachelor degree at Kasetsart University. I would like to give deeply grateful thanks to Dr. Siriluk Teeradakorn who kindly teaches me in any microbiology techniques for a year at the IBGE. I would also like to give thanks to Asst. Prof. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit, Dr. Kittinan Komolpis and Dr. Pramote Chumnanpuen for being as my dissertation committees and their useful suggestions on this work.

I would like to thank Prof. Jens Nielsen and Dr. Verena Siewers for taking care of me during visit to Sweden especially Klaas Buijs, Dr. Kanokarn Kocharin who assisted me in the molecular biology laboratory. I specially thank to Thai students and staffs there who kindly help me during the life at Göteborg.

This work cannot complete successfully without PPC staffs, especially Ms. Waeonet Mansripatanakul and Ms. Barbara Best. Lastly, thanks to friends who share every sensational moment with me.

## TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	v
Acknowledgements	vii
Table of Contents	viii
List of Tables	xi
List of Figures	xiii
<b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW</b>	<b>4</b>
2.1 General Description of Butanol	4
2.2 Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation (ABE Fermentation)	4
2.2.1 History	4
2.2.2 Microorganism	6
2.2.3 Pathway	7
2.2.4 Nutrient Limitation	10
2.2.5 Temperature and Oxygen	11
2.2.6 Limitation of ABE Fermentation	11
2.3 Alternative Fermentation Substrates	13
2.3.1 Pretreatment	14
2.3.1.1 Acid Pretreatment and Detoxification Process	16
2.3.1.2 Base Pretreatment	17
2.3.2 Enzymatic Hydrolysis	18
2.4 Solventogenic Product Enhancement	20



CHAPTER	PAGE
<b>III</b>	
<b>ENHANCEMENT OF ABE FERMENTATION THROUGH REGULATION OF AMMONIUM ACETATE AND D–XYLOSE UPTAKE FROM ACID–PRETREATED CORNCOBS</b>	21
3.1 Abstract	21
3.2 Introduction	22
3.3 Materials and Methods	24
3.3.1 Strain and Inoculum Development	24
3.3.2 Corncob Pretreatment and Overliming	24
3.3.3 Fermentation	25
3.3.4 Analyses	25
3.3.5 Statistical Analysis	26
3.4 Results and Discussion	26
3.4.1 Composition of Corncob	26
3.4.2 Comparative ABE Production of <i>C. acetobutylicum</i> TISTR 1462 and <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1461	27
3.4.3 Effect of Ammonium Acetate on Production	29
3.4.4 Effect of Sugar Composition in Preculture Medium (TGY) on ABE Fermentation	33
3.4.5 ABE Fermentation Using Acid Pretreated Corncobs	34
3.5 Conclusions	38
3.6 Acknowledgements	38
3.7 References	38
<b>IV</b>	
<b>ENHANCEMENT OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CORNCOB BY MICROWAVE–ASSISTED ALKALI PRETREATMENT AND ITS EFFECT IN MORPHOLOGY</b>	42
4.1 Abstract	42
4.2 Introduction	43

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
4.3 Experimental	44
4.3.1 Materials	44
4.3.2 Filter Paper Assay (FPA)	44
4.3.3 Alkali Pretreatment	45
4.3.4 Enzymatic Hydrolysis	45
4.3.5 Fermentation	45
4.3.6 Analytical Methods	46
4.4 Results and Discussion	47
4.4.1 Effects of Sodium Hydroxide Pretreatment with Microwave on Weight Loss and Enzymatic Hydrolysis	47
4.4.2 Composition of Corncob After Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis	52
4.4.3 Corncob Morphology, Surface Area, Crystallinity Index and Thermogravimetric Analysis	53
4.4.4 Comparison of Total Sugars Obtained from Enzymatic Hydrolysis with Different Pretreatment Methods	57
4.4.5 Ethanol Production	57
4.5 Conclusions	59
4.6 Acknowledgements	59
4.7 References	59
<b>V</b>	
<b>OPTIMIZATION OF SULFURIC PRETREATMENT OF CORNCOB USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR FERMENTATION BY <i>CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII</i> TISTR 1461</b>	<b>63</b>
5.1 Abstract	63
5.2 Introduction	64
5.3 Materials and Methods	65
5.3.1 Materials	65



<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
6.3.4 Enzyme Assays	90
6.3.5 Microorganism and Culture Maintenance	90
6.3.6 Fermentation Experiments	91
6.3.7 Experimental Design for RSM	91
6.3.8 Analytical Methods	92
6.4 Results and Discussion	93
6.4.1 Activity Assay of Enzymes	93
6.4.2 Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corncoobs	94
6.4.3 Fermentability of <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1461 to Hydrolysate from Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corncoobs	98
6.4.4 Determination of Enzyme Loading and Hydrolysis Time from RSM	99
6.4.5 Effect of Cellobiase Loading	104
6.4.6 Fermentation of H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> Pretreated and Enzymatic Hydrolysis of Corncoobs with Different Conditions	105
6.5 Conclusions	108
6.6 Acknowledgements	108
6.7 References	108
<b>VII CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>111</b>
7.1 Conclusions	111
7.2 Recommendations	113
<b>REFERENCES</b>	<b>114</b>
<b>APPENDIX</b>	<b>120</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>124</b>

## LIST OF TABLES

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
<b>CHAPTER II</b>		
2.1	Properties of common fuels	4
2.2	Regulation of <i>C. acetobutylicum</i> genes required for solventogenesis	10
2.3	Production of butanol from wood or agricultural residue hydrolysates	16
<b>CHAPTER III</b>		
3.1	Effects of different glucose/xylose (G/X) ratios in preculture medium (TGY) on production medium (P2)	34
3.2	Sugar, acetic acid, and furfural concentrations before and after lime treatment of corncob hydrolysate	35
3.3	Butanol production from various types of acid/alkaline pretreated biomass	36
3.4	Carbon recovery from ABE fermentation by <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1461 using acid pretreated corncobs and 30 g/L of glucose as substrates	37
<b>CHAPTER IV</b>		
4.1	Effect of pretreatment of corncob on weight loss	48
4.2	Content of cellulose, hemicellulose, and lignin in corncob	53
4.3	Crystallinity index (%) of untreated and treated corncob	55
4.4	Comparison of reducing sugar concentration obtained from enzymatic hydrolysis with different pretreatment methods	57
<b>CHAPTER V</b>		
5.1	Optimization of total sugars from acid pretreatment and enzymatic hydrolysis using RSM	71

<b>TABLE</b>	<b>PAGE</b>
5.2 Statistics for the regression of the optimization model	73
5.3 ANOVA for the regression	73
5.4 Effect of sulfuric pretreatment of corncob at the optimum conditions on the composition, physical properties and enzymatic hydrolysis of the pretreated residues compared with hot water pretreatment (Each value is the average of triplicate experiments and calculated on the basis of dry weight)	78
5.5 Butanol production from dilute acid and enzymatic hydrolysis of corncob by <i>C. beijerinckii</i> TISTR1461	82
<b>CHAPTER VI</b>	
6.1 Activity level of enzymes used in pretreated corncob enzymatic hydrolysis	94
6.2 Sugars and degradation products from acid pretreatment and enzymatic hydrolysis	95
6.3 Corncob recovery and crystallinity index after acid pretreatment	98
6.4 Central composite design (CCD) and response results of the reducing sugar from enzymatic hydrolysis	101
6.5 ANOVA for the models of reducing sugar yield	102
6.6 Statistics for the regression of the optimization model	102

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
<b>CHAPTER II</b>	
2.1	Metabolic pathways of <i>C. acetobutylicum</i> . 8
2.2	Lignocellulose consists of cellulose, lignin, and hemicellulose. 14
2.3	Acid-catalyzed pathway for the hydrolysis of hemicellulose to xylose and the degradation of xylose to furfural. 17
2.4	Three consequently reaction of cellulase enzyme. 19
2.5	Xylanase hydrolyse Polymer of $\beta$ -(1,4)-D-xylopyranosyl units. 19
<b>CHAPTER III</b>	
3.1	Production of ABE, acid concentration, ABE productivity, yield, and percentage of utilized glucose where (I) <i>C. acetobutylicum</i> TISTR 1462, 2% initial glucose, (II) <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1461, 2% initial glucose, (III) <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1461, 4% initial glucose, and (IV) <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1461, 6% initial glucose collected at 48 h of fermentation. 28
3.2	The effect of the addition of ammonium acetate on broth acidity. 30
3.3	The effect of the addition of ammonium acetate on (a) ABE concentration, ABE productivity, and yield (for each ammonium acetate addition); and (b) utilized glucose and percentage of product increase. 32
3.4	The results of ABE fermentation using corncobs as the substrate, including (a) solventogenic and acid products from acid pretreatment plus 30 g/L glucose and (b) acidity level and sugar consumption. 36

FIGURE		PAGE
<b>CHAPTER IV</b>		
4.1	Glucose concentrations obtained from enzymatic hydrolysis of pretreated corncob at different times, temperatures, (a) 60 °C, (b) 80 °C, (c) 100°C and (d) 120 °C and NaOH concentrations, (* ) 0%, (● ) 0.75%, (▲) 1%, (◆) 2%, (■) 3%.	50
4.2	Total sugar concentrations obtained from enzymatic hydrolysis of pretreated corncob at different times, temperatures, (a) 60 °C, (b) 80 °C, (c) 100°C and (d) 120 °C and NaOH concentrations, (* ) 0%, (● ) 0.75%, (▲) 1%, (◆) 2%, (■) 3%.	51
4.3	Glucose (◆), xylose (■), arabinose (▲) and total sugar (* ) concentration from enzymatic hydrolysis of pretreated corncob with 2% NaOH 30 min at 100°C (optimum condition).	52
4.4	Scanning electron microscope images of (a) raw corncob without pretreatment; (b) corncob after pretreatment with 0.75% NaOH at 60 °C for 20 min; (c) after pretreatment with 0.75% NaOH at 100 °C for 20 min and (d) after pretreatment with 2% NaOH at 100 °C for 30 min.	54
4.5	TG–DTG curves of corncob before and after the pretreatment.	56
4.6	Ethanol profile of YPD (◆) and corncob hydrolysate (■) using <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
<b>CHAPTER V</b>		
5.1	Contour plots (a–c) and response surface (d–f) for total sugars from hydrolysed corncob under the effects of temperature and time (sulfuric concentration was fixed at 2%), temperature and sulfuric concentration (time was fixed	75



<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
at 15 min), and sulfuric concentration and time (temperature was fixed at 120 °C) respectively.	
5.2 Time courses of enzymatic saccharification (45 °C, pH 4.8) of the optimum conditions of sulfuric acid pretreated corncob (2.89% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 118.36 °C, and 5.36 min) using a Novozymes 50013 cellulase enzyme.	76
5.3 SEM micrographs of (a) untreated (1000) and (b) pretreated corncobs at the optimum conditions and magnification of 1000, (c) 4000, and (d) 8000.	79
<b>CHAPTER VI</b>	
6.1 XRD patterns for untreated and pretreated corncob with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HNO <sub>3</sub> and H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .	96
6.2 SEM images of (A) untreated corncob, (B) pretreated corncob with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (C) HNO <sub>3</sub> , and (D) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .	97
6.3 Concentration of utilized reducing sugars, ABE, and pH in fermentation broths at 48 h using hydrolysate of corncob from H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HNO <sub>3</sub> , and H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pretreatment and enzymatic hydrolysis as a substrate. The P2 medium were added with glucose as a substrate for control experiments.	99
6.4 Sugar yield from acid pretreatment and enzymatic hydrolysis under the effect of enzyme loading and hydrolysis time shown in (A) response surface, and (B,C) contour plots.	103
6.5 Concentrations of the sugars at different loading ratios of Celluclast 1.5L:Novozymes 188.	105
6.6 Concentration of solventogenic products and acids (A), utilized sugars (B) and ABE yield and productivity in the various conditions of fermentation broths at 48h (C).	107

<b>FIGURE</b>		<b>PAGE</b>
<b>APPENDIX</b>		
A1	Standard curve of glucose assay	120
A2	Standard curve of acetone, butanol, and ethanol from INNOWAX GC column	121
A3	Standard curve of acetone, butanol, ethanol, acetic acid, furfural, and HMF from HPX87H HPLC column	122
A4	Standard curve of glucose, xylose, arabinose, and cellobiose from HPX87H HPLC column	123