

**CONVERSION OF RICE STRAW TO SUGARS BY MICROBIAL  
HYDROLYSIS**



Paramet Kerdkaew

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  
2012

I 28374216


**Thesis Title:** Conversion of Rice Straw to Sugars by Microbial Hydrolysis  
**By:** Mr. Paramet Kerdkaw  
**Program:** Petrochemical Technology  
**Thesis Advisors:** Prof. Sumaeth Chavadej  
Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit

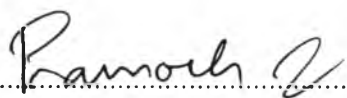
---

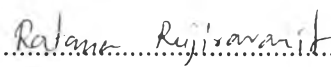
Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

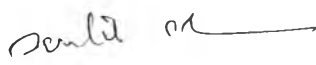
  
..... College Dean  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

**Thesis Committee:**

  
.....  
(Prof. Sumaeth Chavadej)

  
.....  
(Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit)

  
.....  
(Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit)

  
.....  
(Prof. Suntud Sirianuntapaiboon)

## ABSTRACT

5371013063: Petrochemical Technology Program  
Paramet Kerdkaew: Conversion of Rice Straw to Sugars by Microbial Hydrolysis  
Thesis Advisors: Prof. Sumaeth Chavadej and Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit 82 pp.  
Keywords: Microbial hydrolysis/ Rice straw/ Lignocellulose/ *Microcerotermis* sp./ Sugar

Rice straw is one of the most abundant lignocellulosic wastes in the world. It contains 47 % cellulose, 25 % hemicellulose and 5 % lignin. The cellulose and hemicellulose in rice straw can be converted into glucose and other fermentable sugars via microbial hydrolysis. These sugars can then be used as feedstocks for bioethanol production. The purpose of this work was to investigate the possibility of using rice straw as a raw material for microbial hydrolysis to produce sugars using bacteria isolated from Thai higher termites, *Microcerotermis* sp. The effects of particle size (40 mesh, 60 mesh and 80 mesh), hydrolysis temperature (30 °C and 37 °C), amount of malt extract in 65 modified DSMZ broth medium 2 and bacteria strains (A 002 and M 015) were investigated. Qualitative and quantitative analysis of the sugars were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with a refractive index detector. The maximum sugar concentration of 0.97 g/L at 9 h and 37 °C was obtained with 80 mesh rice straw using strain A002 and 10 g/L malt extract in the production medium.

## บทคัดย่อ

ประเมศวร์ เกิดแก้ว : การเปลี่ยนแปลงฟางข้าวไปเป็นน้ำตาลโดยการย่อยด้วยแบคทีเรีย (Conversion of Rice Straw to Sugars by Microbial Hydrolysis) อ. ที่ปรึกษา: ศ. ดร. สุเมธ ชวเดช และ รศ.ดร. ปราโมช รังสรรค์วิจิตร 82 หน้า

ฟางข้าวเป็นผลผลิตพลอยได้ชนิดหนึ่งจากเกษตรกรรม ซึ่งองค์ประกอบฟางข้าวนั้นประกอบไปด้วย เซลลูโลสร้อยละ 47 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 25 และ ลิกนินร้อยละ 5 เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในฟางข้าวสามารถเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆได้ โดยกระบวนการย่อยด้วยแบคทีเรีย ซึ่งน้ำตาลที่ผลิตได้นั้นสามารถใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเอทานอล วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้คือ การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ฟางข้าวเพื่อเป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากปลวกชั้นสูง ตัวแปรที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ประกอบไปด้วย ขนาดอนุภาคของฟางข้าว ( 40, 60 และ 80 เมช) อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการย่อย (30 และ 37 องศาเซลเซียส) ปริมาณของมอลสกัดในตัวอย่างที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (10 กรัมต่อลิตร 5 กรัมต่อลิตร และ 1 กรัมต่อลิตร) และสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (สายพันธุ์ เอ 002 และ เอ็ม 015 ) การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของน้ำตาลที่ได้นั้นถูกวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) ที่ใช้ตัววัดแบบ Refractive Detector จากการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดประมาณ 0.97 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้มาจากการย่อยฟางข้าวขนาด 80 เมช ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ เอ 002 โดยมีปริมาณของมอลสกัด 10 กรัมต่อลิตรในตัวอย่างที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work would not have been successful without the assistance of the following individuals and organizations.

First of all, I gratefully acknowledge Prof. Sumaeth Chavadej, Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit, for several constructive suggestions and discussion throughout the course of this work.

I am grateful for the scholarship and funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College, the Center of Excellence on Petrochemical and Materials Technology, Thailand, and Thai Oil Public Company Limited.

I would like to show my gratitude to Ms. Thitirat Choke-arpornchai and Ms. Pitcha Wongskeo for the very special people they are and for being the best of friends who supported and encouraged me at every moment.

I would like to thank to Ms. Wannaporn Eourarekullart for her suggestion.

I would like to thank to all faculties and staffs at PPC for the knowledge that I have learnt from them as well as their help to facilitate all my work.

Lastly, I would like to offer sincere gratitude to my family for their love, caring, supporting and understanding me all the time.

## 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	ix
List of Figures	x
 <b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
 <b>II THEORETICAL BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW</b>	
2.1 Lignocellulosic Biomass Materials	3
2.2 Chemical Structure and Basic Components of Lignocellulosic Materials	4
2.2.1 Cellulose	5
2.2.2 Hemicellulose	6
2.2.3 Lignin	7
2.3 Rice Straw	8
2.4 Glucose	9
2.5 Sugar Production from Lignocellulosic Materials	9
2.6 Pretreatment of Lignocellulosic Materials	10
2.6.1 Mechanical Comminution	12
2.6.2 Pyrolysis	12
2.6.3 Steam Explosion	12
2.6.4 Ammonia Fiber Explosion (AFEX)	13
2.6.5 Carbon Dioxide Explosion	13
2.6.6 Liquid Hot-Water Pretreatment	13

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
2.6.7 Ozonolysis	14
2.6.8 Alkaline Pretreatment	14
2.6.9 Acid Pretreatment	15
2.6.10 Ionic Liquid Pretreatment	15
2.6.11 Biological Pretreatment	16
2.7 Hydrolysis of Lignocellulosic Materials	19
2.7.1 Concentrated Acid Hydrolysis	19
2.7.2 Dilute Acid Hydrolysis	20
2.7.3 Enzymatic Hydrolysis	20
2.8 Cellulase Enzymes	22
<b>III EXPERIMENTAL</b>	<b>27</b>
3.1 Materials and Equipment	27
3.1.1 Chemicals	27
3.1.2 Equipments	27
3.2 Experimental Procedures	29
3.2.1 Biomass Preparation	29
3.2.2 Bacteria Cells for Microbial Hydrolysis	29
3.2.3 Microbial Hydrolysis	29
3.2.4 Determination of Sugar and Bacteria Concentrations	30
<b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>31</b>
4.1 Rice Straw Composition	31
4.2 Hydrolysis Capacity Value (HC Value)	32
4.3 Structure of Enzymatically Hydrolyzed Rice Straw Sample	32
4.4 Enzymatic Hydrolysis Results	33
4.4.1 Effects of Rice Straw Particle Size on the Glucose Production	33

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
4.4.2 Effects of Hydrolysis Temperature on the Glucose Production	37
4.4.3 Effects of Bacteria Strain on the Glucose Production	39
4.4.4 Effects of Concentration of Secondary Carbon Source on the Glucose Production	41
4.4.5 Bacteria Concentration and Glucose Production vs. Time	42
4.4.6 Cellulose Conversion and Glucose Production vs. Time	43
<b>V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>44</b>
5.1 Conclusions	44
5.2 Recommendations	44
<b>REFERENCES</b>	<b>45</b>
<b>APPENDICES</b>	
<b>Appendix A</b> Standard Calibration Curve	55
<b>Appendix B</b> Media for Microorganisms	56
<b>Appendix C</b> Reagent Preparations	57
<b>Appendix D</b> Bacteria Concentration	58
<b>Appendix E</b> Experiment Data of Enzymatic Hydrolysis	61
<b>Appendix F</b> SEM images of before and after enzymatic Hydrolysis of rice straw	75
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>82</b>



**LIST OF TABLES**

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
2.1	Contents of cellulose, hemicellulose, and lignin in common lignocellulosic materials	5
2.2	Advantages and disadvantages of various pretreatment processes for lignocellulosic materials	17
2.3	Comparison of process conditions and performance of three hydrolysis processes	21
2.4	Characteristics of isolates A 002, M 015, and F 018 by microbiological methods	25
4.1	Elemental composition of rice straw	31
4.2	Chemical composition of rice straw	31
4.3	Hydrolysis capacity values (HC value) of bacteria strain A 002 and strain M 015	32

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Schematic representation of a cellulose chain	6
2.2 Schematic of the basic structure of hemicellulose	7
2.3 Lignin building blocks	8
2.4 Overall view of sugar and ethanol productions from lignocellulosic materials	10
2.5 Schematic of goals of pretreatment on lignocellulosic material	11
2.6 Mechanistic scheme of enzymatic cellulose hydrolysis by <i>Trichoderma</i> non-complexed cellulase system	23
4.1 Scanning electron microraphs of 60 - 80 mesh size of rice straw surface (a) befor hydrolysis (b) after hydrolysis at 37°C with the strain A 002 and (c) after hydrolysis at 37°C with the strain M 015	33
4.2 Effect of rice straw particle size on the glucose concentration profile at 37 °C using bacteria (a) strain A 002 and (b) strain M015	35
4.3 Effect of rice straw particle size on the glucose concentration profile at 30 °C using bacteria (a) strain A 002 and (b) strain M015	36
4.4 Effect of hydrolysis temperature on the glucose concentration from the hydrolysis of 80 mesh particle size rice straw using bacteria (a) strain A 002 and (b) strain M 015	38
4.5 Effect of bacteria strains on the glucose concentration profile from the hydrolysis of < 80 mesh rice straw at 37 °C (a) and 30 °C (b)	40

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.6 Effect of concentration of secondary carbon source on the glucose concentration profile from the hydrolysis of < 80 mesh particle size rice straw at 37 °C using bacteria strain A 002	41
4.7 Glucose concentration and bacteria concentration profile from the hydrolysis of < 80 mesh rice starw with strain A 002 at 37 °C	42
4.8 Glucose concentration profile and the percentage of cellulose conversion from the hydrolysis of < 80 mesh rice straw with strain A 002 at 37 °C	43