

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46246



Bioethanol and Furfural Production from Palm Pressed Fiber

Wiboon Niansa-ngawong

*A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biotechnology*

Prince of Songkla University

2011

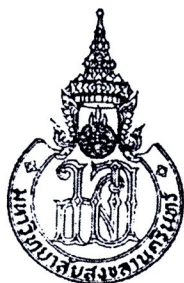
Copyright of Prince of Songkla University

600256764

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46246



Bioethanol and Furfural Production from Palm Pressed Fiber



Wiboon Riansa-ngawong

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biotechnology**


Prince of Songkla University

2011


Copyright of Prince of Songkla University


Thesis Title Bioethanol and Furfural Production from Palm Pressed Fiber
Author Mr. Wiboon Riansa-ngawong
Major Program Biotechnology


Major Advisor :



.....
(Assoc. Prof. Dr. Poonsuk Prasertsan)

Examining Committee :



.....Chairperson
(Assoc. Prof. Dr. Aran H-Kittikun)


.....
(Assoc. Prof. Dr. Poonsuk Prasertsan)


.....
(Asst. Prof. Dr. Benjamas Cheirsilp)


.....
(Asst. Prof. Dr. Pilanee Vaithanomsat)

The Graduate School, Prince of Songkla University, has approved this thesis as partial fulfillment of the requirements for the Doctor of Philosophy Degree in Biotechnology


.....
(Prof. Dr. Amornrat Phongdara)
Dean of Graduate School

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอเอทานอลและเฟอร์ฟูรอลจากเส้นใยปาล์ม
ผู้เขียน นายวิญญูห์ เจริญดวงวงศ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

46246

เส้นใยปาล์มเป็นแหล่งของเฮมิเซลลูโลสที่สำคัญและสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นเพื่อการผลิตเฟอร์ฟูรอลได้ การศึกษานี้ทำการกำจัดลิกนินออกจากเส้นใยปาล์มโดยการแช่ส่วนผสมของเส้นใยปาล์มกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์อัตราส่วน 10:1 (โดยน้ำหนัก) ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.01% ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการสกัดซ้ำอีก 3-4 ครั้ง จนกระทั่งได้เส้นใยปาล์มที่มีสีขาว จากนั้นนำเส้นใยปาล์มที่ผ่านการกำจัดลิกนินแล้วมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของพารามิเตอร์ 3 ประการ ในการสกัดเฮมิเซลลูโลสด้วยวิธีการหาพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ด้วย 20 การทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเฮมิเซลลูโลสคือ การใช้สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 28.8% อัตราส่วนระหว่างเส้นใยปาล์มที่ผ่านการกำจัดลิกนินต่อสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์คือ 1:20 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเวลาที่ใช้ในการสกัดคือ 20 นาที ($R^2 = 98\%$) จากสภาวะดังกล่าวสามารถผลิตเฮมิเซลลูโลสได้ $38.67 \pm 1.21\%$ (คำนวณจากเส้นใยปาล์มที่ผ่านการกำจัดลิกนิน) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสกัดได้ถึง 99.25% และมีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณ 80.8% เมื่อนำเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้มาผลิตเฟอร์ฟูรอลแบบขั้นตอนเดียว โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเฟอร์ฟูรอล ได้แก่ อุณหภูมิ (120-150 องศาเซลเซียส) อัตราส่วนระหว่างสารละลายกรดซัลฟูริกต่อเฮมิเซลลูโลส (8-10 มิลลิลิตรต่อกรัมเฮมิเซลลูโลส) ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (5-10% ปริมาตรต่อปริมาตร) และเวลาทำปฏิกิริยา (0-120 นาที) พบว่า อัตราส่วนระหว่างสารละลายกรดซัลฟูริกต่อเฮมิเซลลูโลสเป็น 8 มิลลิลิตรต่อกรัมเฮมิเซลลูโลส กรดซัลฟูริกเข้มข้น 5% อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 150 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา คือ 90 นาที สามารถผลิตเฟอร์ฟูรอลได้ 0.86 กรัมต่อลิตร หรือ 3.44% โดยน้ำหนัก (กรัมเฟอร์ฟูรอลต่อ 100 กรัม เฮมิเซลลูโลส)

การผลิตเฟอร์ฟูรอลแบบสองขั้นตอนประกอบด้วยขั้นตอนแรก คือ การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสด้วยกรดเพื่อผลิตน้ำตาล ขั้นตอนต่อมาคือการคั่งน้ำออกเพื่อให้โมเลกุลของไซโลสเปลี่ยนเป็นเฟอร์ฟูรอล เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิคการหาพื้นที่ตอบสนอง (RSM) ตัวแปรที่สำคัญในขั้นตอนของการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสเพื่อผลิตน้ำตาล ได้แก่ อุณหภูมิที่เกิดปฏิกิริยา (100-150 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (1-10%) อัตราส่วนระหว่างสารละลายกรดซัลฟิวริกต่อเฮมิเซลลูโลส (8-10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก) และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตน้ำตาล (30-120 นาที) พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลไซโลสได้สูงสุด (12.32 ± 2.42 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 5.7% อัตราส่วนระหว่างสารละลายกรดซัลฟิวริกต่อเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 8.5 มิลลิลิตรต่อกรัมเฮมิเซลลูโลส ระยะเวลาทำปฏิกิริยา 31 นาที โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของพื้นที่ตอบสนองเท่ากับ 0.90 สำหรับตัวแปรที่มีผลในขั้นตอนที่สองในการคั่งน้ำออก คือ อุณหภูมิที่เกิดปฏิกิริยา (120-160 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (30-150 นาที) พบว่าการผลิตเฟอร์ฟูรอลสูงสุด (8.67 ± 0.62 กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 135.24 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 90.34 นาที โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์ของพื้นที่ตอบสนองเท่ากับ 0.93 เฟอร์ฟูรอลที่ผลิตได้สูงกว่าการผลิตแบบขั้นตอนเดียวถึง 10 เท่า

เซลลูโลสที่ได้หลังจากการสกัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวสามารถใช้เป็นแหล่งในการผลิตกลูโคส โดยการใช้น้ำเอนไซม์และการย่อยด้วยกรด เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (เอนไซม์จากเชื้อ *Trichoderma reesei*) คือ พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและปริมาณเอนไซม์ รวมทั้งระยะเวลาในการบ่ม พบว่า ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ซึ่งรายงานในรูปน้ำตาลรีดิวิซ์) สูงสุด (7.9 กรัมต่อลิตร) (60% saccharification) เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลลูโลส 12 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ 80 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ภายใต้สภาวะเหมาะสมที่พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 ชั่วโมง สำหรับการผลิตกลูโคสด้วยกรดโดยกระบวนการผลิตแบบสองขั้นตอน คือ เริ่มต้นย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 72% เป็นเวลานาน 90 นาที จากนั้นทำการย่อยต่อด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเจือจาง 4% โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเซลลูโลสต่อสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ 1 ต่อ 16 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 86 นาที สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้เพียง 0.54 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการผลิตน้ำตาลกลูโคสโดยการใช้น้ำเอนไซม์ถึง 14.6 เท่า

เมื่อศึกษาการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลไซโลสจากเส้นใยปาล์มที่ผ่านการกำจัดลิกนินให้ ได้ค่าสูงสุดด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และลดการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นเฟอร์ฟูรอล รวมถึงลดการเกิดกรดอะซิติกให้เกิดขึ้นน้อยที่สุด เนื่องจากทั้งเฟอร์ฟูรอลและกรดอะซิติกเป็นสารยับยั้งการเจริญ

ของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการผลิตเอทานอล ตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลไซโลสที่ศึกษาโดยวิธีการหาพื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) คือ ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจาง (0-10%) อุณหภูมิที่เกิดปฏิกิริยา (75-148 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา (0-180 นาที) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลไซโลส คือ กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) อัตราส่วนระหว่างเฮมิเซลลูโลสต่อสารละลายกรดซัลฟูริก เป็น 1 ต่อ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ให้การผลิตน้ำตาลไซโลสและกลูโคสได้สูงสุดเท่ากับ 28.7 และ 3.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับกรดอะซิติกและเฟอร์ฟูรอลภายใต้สภาวะดังกล่าวมีค่า 10.56 และ 0.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่า สภาวะการผลิตไซโลสดังกล่าวนี้ ยังเหมาะกับการผลิตไซโลสจากเส้นใยปาล์มที่ยังไม่ผ่านกระบวนการกำจัดลิกนินอีกด้วย ได้ไซโลสและกลูโคสเท่ากับ 27.23 และ 2.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อีกทั้งยังผลิตกรดอะซิติก (5.99 กรัมต่อลิตร) และ เฟอร์ฟูรอล (0.42 กรัมต่อลิตร) ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากการใช้เส้นใยปาล์มที่ผ่านการกำจัดลิกนิน ดังนั้นจึงได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลสจากเส้นใยปาล์มโดยตรง

การศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ *Candida shehatae* TISTR5843 ในอาหารสังเคราะห์ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะสมเท่ากับ 24 กรัมต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 2:8 กรัมต่อกรัม ที่พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และการเขย่าที่อัตราเร็วเท่ากับ 180 รอบต่อนาที ให้ค่าผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.42-0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.103-0.343 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อวัน และ ความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 0.37-1.30%

เมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสไฮโดรไลสเสดโดยเชื้อยีสต์สองสายพันธุ์ (*Candida shehatae* TISTR5843 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5017) และเชื้อแบคทีเรีย (*Zymomonas mobilis* TISTR405) พบว่า *S. cerevisiae* TISTR5017 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 2.82 กรัมต่อลิตร (0.34 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) จากการศึกษาสามปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการหาพื้นที่การตอบสนอง (RSM) ได้แก่ พีเอชเริ่มต้น (4-6) อัตราการเขย่า (120-240 รอบต่อนาที) และ ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น (0.4-1.0 กรัมต่อลิตร) พบว่า สภาวะที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.40 ที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 137 รอบต่อนาที

และความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 0.56 กรัมต่อลิตร หลังการหมัก 24 ชั่วโมง ได้เอทานอลเข้มข้น 3.98 ± 0.42 กรัมต่อลิตร (0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) ($R^2=0.97$)

เมื่อศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของไนโตรเจน อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนและสารยับยั้งต่อการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR5843 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เปปโตนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนเท่ากับ 9.3 เป็นสภาวะที่เหมาะสม สามารถผลิตเอทานอลได้ 4.75 กรัมต่อลิตร อีกทั้งสารยับยั้งต่างๆ ที่มีอยู่ในไฮโดรไลเสตของเส้นใยปาล์ม ได้แก่ อะซิเตท เฟอร์ฟูรอลและวานิลินต้องมีค่าน้อยกว่า 2.5 0.5 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อให้ได้อัตราการผลิตเอทานอลที่ดี อีกทั้งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสตของเส้นใยปาล์มโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR5843 คือ อัตราการเจือจางของไฮโดรไลเสต พบว่า อัตราการเจือจางที่ 1/2 เป็นอัตราการเจือจางที่เหมาะสม ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 0.32 กรัม เอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.125 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ไฮโดรไลเสตของเส้นใยปาล์มประกอบด้วยไซโลสและกลูโคสเท่ากับ 27.23 และ 2.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีการเติมสารอาหารต่างๆ และปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 จากนั้นนำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR5843 เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อการผลิตเอทานอล ได้แก่ พีเอชเริ่มต้น อัตราการเขย่า และความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น ด้วยวิธีการหาพื้นที่การตอบสนอง (RSM) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.25 อัตราการเขย่าเท่ากับ 135 รอบต่อนาที ร่วมกับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 5.25 ± 0.72 กรัมต่อลิตร และได้ผลผลิตเท่ากับ 0.40 กรัมเอทานอลต่อกรัมไซโลส ($R^2=0.98$) ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและเฟอร์ฟูรอลในอาหารไฮโดรไลเสตเท่ากับ 0.30 ± 0.01 และ 0.08 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตการผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสตของเส้นใยปาล์มโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR5843 ในกระบวนการแบบกึ่งกะ (fed batch process) และแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous process) โดยทดลองในถังหมักขนาด 3 ลิตร ใช้ไฮโดรไลเสตของเส้นใยปาล์มที่ผ่านการเจือจางที่ระดับ 1/2 ซึ่งจะมีการป้อนไฮโดรไลเสตเข้าสู่ระบบทั้งสิ้น 3 ครั้ง พบว่า การผลิตเอทานอลสูงสุดของแบบกึ่งกะและแบบกึ่งต่อเนื่องเท่ากับ 3.92 และ 4.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับการผลิตเอทานอลแบบกะ (batch process) (4.07 กรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตาม การผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะและแบบกึ่งต่อเนื่องจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อทำการหมักในรอบต่อไป เนื่องจากมีการสะสมของสารยับยั้งเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เส้นใยปาล์มและเส้นใยปาล์มที่ปราศจากกลีนินเป็นตัวตั้งเซลล์ *C. shehatae* TISTR5843 พบว่า ยีสต์ที่ตรึงด้วยเส้นใยปาล์มปราศจากกลีนินที่ผ่านการบดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดถึง 11.5 กรัมต่อลิตร (0.47 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล) เมื่อเลี้ยงเชื้อ 36 ชั่วโมง สำหรับการเลี้ยงแบบกะ พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลและผลผลิตเอทานอลที่ได้โดยยีสต์ที่ตรึงด้วยเส้นใยปาล์มมีค่าสูงกว่าการใช้เชื้อยีสต์อิสระคิดเป็น 6.20% และ 6.82% ตามลำดับ เชื้อยีสต์ที่ตรึงด้วยเส้นใยปาล์มและเส้นใยปาล์มที่ปราศจากกลีนินที่ผ่านการบดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร มีความสามารถในการผลิตเอทานอลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้น เมื่อใช้เชื้อยีสต์ที่ตรึงด้วยเส้นใยปาล์มที่ผ่านการบดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร ผลิตเอทานอลด้วยการเลี้ยงแบบกะหมุนเวียน (Repeated batches process) พบว่า ประสิทธิภาพของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ผลผลิตเอทานอล และอัตราการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ที่ตรึงด้วยเส้นใยปาล์มที่ผ่านการบดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร มีค่าสูงกว่าการเลี้ยงแบบใช้เซลล์อิสระ มีค่าเท่ากับ 10.78-30.12%, 9.52-22.22% และ 11.90-32.35% ตามลำดับ โดยเชื้อยีสต์ที่ตรึงด้วยเส้นใยปาล์มที่ผ่านการบดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตรสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 4 รอบโดยคงประสิทธิภาพการผลิตไว้ได้ถึง 93%

Thesis Title Bioethanol and Furfural Production from Palm Pressed Fiber
Author Mr. Wiboon Riansa-ngawong
Major Program Biotechnology
Academic Year 2010

ABSTRACT

E46246

Palm pressed fiber (PPF) is a potential source for production hemicellulose which is a starting material for furfural production. In this study, PPF was delignified by soaking the mixture of PPF to sodium chlorite (NaClO_2) in the ratio of 10:1 (w/w) in 0.01% acetic acid solution at 70°C for 1 h and repeated 3-4 times until PPF became white. Three parameters affecting extraction of hemicellulose from the delignified PPF (dPPF) were optimized using response surface methodology (RSM) with 20 batch experiments. The optimum condition was found to be 28.8% (w/v) KOH, the dPPF: KOH ratio of 1:20 (w/v) and reaction time of 20 min ($R^2 = 98\%$). The highest hemicellulose yield of $38.67 \pm 1.21\%$ (based on dPPF) with 99.25% extraction and the xylose content of 80.8% was achieved. The extracted hemicellulose was used in one-stage process for furfural production. Optimization studies were conducted on the reaction temperature ($120\text{-}150^\circ\text{C}$), liquid (sulfuric acid)/solid (hemicellulose) ratio (LSR) (8-10 ml/g hemicellulose), sulfuric acid concentration (5-10 % v/v) and reaction time (0-120 min). The best condition was reaction temperature of 150°C , LSR of 8 ml/g hemicellulose, sulfuric acid concentration of 5% (v/v) and reaction time of 90 min. This gave the highest furfural concentration of 0.86 g/l or 3.44 wt% (g furfural/100 g hemicellulose).

Two-stage process was consisted of acid hydrolysis stage followed by dehydration stage was conducted to improve furfural production from extracted hemicellulose. The optimum conditions in both steps were achieved by RSM. In the acid hydrolysis step to convert hemicellulose to xylose, there were four important parameters consisted of reaction temperature ($100\text{-}150^\circ\text{C}$), sulfuric acid concentration

(1-10 % v/v), ratio of sulfuric acid to hemicellulose (LSR) (8-10 v/w), and reaction time (30-120 min). The maximum xylose production (12.32 ± 2.42 g/l) was achieved at 120°C, 5.7% sulfuric acid, L/S ratio of 8.5 ml/g for 31 min with the determination coefficient (R^2) value of 0.90. For dehydration process, two parameters; reaction temperature (120-160°C) and reaction time (30-150 min), were optimized. The maximum furfural production (8.67 ± 0.62 g/l) was achieved at the reaction temperature of 135.24°C for 90.34 min with the determination coefficient (R^2) value of 0.93. The furfural obtained was 10 times higher than that from one stage process.

The white residual solid after hemicelluloses extraction, cellulose, was used as a source for glucose production by enzymatic and concentrated acid hydrolysis. An experimental design to get the maximum of glucose production by cellulase (*Trichoderma reesei*) was conducted, in which the effect of pH, temperature, substrate concentration, enzyme dosage, and incubation time were evaluated. The maximum reducing sugar (7.9 g/l) mainly glucose was achieved when incubated 12 g/l of the extracted cellulose with cellulase of 80 U/g substrate under the optimum condition pH of 4.8 at 50 °C for 15 h, giving 60% saccharification. For acid hydrolysis, the glucose production was conducted by two-stage process, firstly it was treated by 72% sulfuric acid for 90 min and followed by 4% sulfuric acid hydrolysis using solid/liquid ratio (SLR) of 1:16 (w/v) at 120 °C for 86 min. The 0.54 g/l glucose was produced under those conditions. The glucose obtained was 14.6 fold lower than that achieved from enzymatic method.

To increase xylose production from dPPF by dilute sulfuric acid (H_2SO_4) hydrolysis to obtain solutions with a maximum xylose concentration and minimum concentration of furfural and acetic acid (inhibitors for growth and ethanol production). The effect of H_2SO_4 concentration (0-10% v/v), reaction temperature (75-148°C), and reaction time (0-180 min) were studied by RSM. Kinetic parameters of mathematical models were obtained in order to predict concentration of xylose, glucose, furfural and acetic acid in the hydrolysate and to optimize the process. The optimum condition was the 2% (v/v) H_2SO_4 with solid/liquid ratio (SLR) of 1:10 (w/v) at 120 °C for 30 min, giving the highest xylose and glucose yields of 28.7 and

3.5 g/l, respectively. The concentrations of the inhibitors acetic acid and furfural were 10.56 g/l and 0.55 g/l, respectively. In addition, this optimal condition was also suitable for production of xylose from PPF giving the highest xylose and glucose yields of 27.23 and 2.3 g/l with lower acetic acid (5.99 g/l) and furfural (0.42 g/l) production.

The ethanol production in synthetic medium by *Candida shehatae* TISTR5843 was studied. Cultivation in synthetic medium with glucose as a sole carbon source, the optimum glucose concentration was found to be 24 g/l, whereas cultivation in the synthetic medium containing xylose as a sole carbon source, the optimum xylose concentration was 20 g/l. The optimum glucose to xylose ratio in the medium was 2:8 w/w with initial pH of 5.0 at room temperature (30°C) and the shaking speed of 180 rpm. The highest ethanol yields, ethanol productivities and ethanol concentration under the optimum condition were 0.42-0.45 g ethanol/ g sugar, 0.103-0.343 g/l/h and 0.37-1.30%, respectively.

Ethanol production from cellulosic hydrolysate using two yeast strains (*Candida shehatae* TISTR5843 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5017) and bacteria (*Zymomonas mobilis* TISTR405) were studied. *S. cerevisiae* TISTR5017 was found to be the best strain for ethanol production giving the highest ethanol concentration and ethanol yield of 2.82 g/l and 0.34 g ethanol/g sugar, respectively. Three parameters, initial pH (4-6), shaking speed (120-240 rpm), and initial cell concentration (0.4-1.0 g/l), were studied by using RSM. The optimal condition was initial pH 5.40 with shaking speed of 137 rpm and initial cells concentration of 0.56 g/l. After 24 h fermentation, ethanol concentration and ethanol yield were 3.98 ± 0.42 g/l and 0.48 g ethanol/g sugar ($R^2=0.97$).

The effects of nitrogen source and concentration, C/N ratio as well as inhibitory compounds on ethanol production by *C. shehatae* TISTR5843 were studied in the synthetic xylose medium. The highest ethanol production (4.75 g/l) was obtained at 3 g/l peptone, which corresponded to a C/N ratio of 9.3. The inhibitory compounds presented in PPF hydrolysate such as acetate, furfural, and vanillin, should be less than 2.5, 0.5, and 0.5 g/l, respectively in order to get the productive ethanol. Moreover, dilution of PPF hydrolysate played a major role in ethanol

production by *C. shehatae* TISTR5843. The 1/2 dilution was a suitable dilution for production of ethanol, giving the maximum yield of 0.32 g ethanol/g sugar and ethanol productivity of 0.125 g/l/h.

The PPF hydrolysate containing xylose and glucose of 27.23 and 2.3 g/l, respectively, was supplemented with nutrients and adjusted pH to 5.0 was used for ethanol production by *C. shehatae* TISTR5843. Optimization on the environmental factors (initial pH, shaking speed and inoculum concentration) affecting on ethanol production were conducted using response surface methodology (RSM). The optimal condition was the initial pH 5.25 with shaking speed of 135 rpm and inoculum concentration of 1.08 g/l. The maximum ethanol concentration and ethanol yield were 5.25 ± 0.72 g/l and 0.40 g ethanol/g xylose ($R^2=0.98$). The final acetic acid and furfural in the hydrolysate medium were 0.08 ± 0.02 g/l and 0.30 ± 0.01 g/l, respectively.

Fed batch and semi-continuous processes were studied to enhance the ethanol production from PPF hydrolysate by *C. shehatae* TISTR5843. The experiments were carried out in 3 cycles of 1/2 dilution of fresh medium in 3 liters fermenter. The maximum ethanol productions of fed batch and semi-continuous process were 3.92 and 4.02 g/l, respectively, which were similar to ethanol production from batch process (4.07 g/l). However, the ethanol productions of fed batch and semi-continuous process were slightly decreased in the following cycles because of the accumulation of toxic compounds.

Potential use of palm pressed fiber (PPF) and delignified palm pressed fiber (DPPF) as immobilization supports of *C. shehatae* TISTR5843 for ethanol production in synthetic glucose medium was studied. A small size less than 5 mm of DPPF (sDPPF) gave the maximum ethanol production of 11.5 g/l (0.47 g ethanol/g glucose) at 36 h cultivation. In batch system, the ethanol concentration and ethanol yield by immobilized cells were higher than the free cell for 6.20% and 6.82%, respectively. There was no significant difference between immobilized yeast on sPPF and sDPPF ($P>0.05$). The sPPF was used as a support in four repeated batches fermentation. The ethanol concentrations, ethanol yields and ethanol productivities of the immobilized cells in the range of 10.78-30.12%, 9.52-22.22% and 11.90-32.35%,

E46246

respectively, were higher than those of the free cells. The immobilized cells on sPPF could be reused 4 times with retaining activity of 93%.

ACKNOWLEDGEMENT

This thesis could not be successfully completed without the kindness of my major advisor, Assoc. Prof. Dr. Poonsuk Prasertsan, for pushing me to reach my potential. I appreciate her confidence in me as her graduate student to make my own mistakes and learn from them. She opened me to biotechnological world and provided lots of good ideas and advices. Special thanks to Prof. Dr. Kenji Iiyama, for his comments and suggestions at the initial stage of my experimental work.

Many thanks to my fellow lab mates in Environmental Biotechnology Laboratory: Dr. Maneewan (Joy) Suwansaard for the stimulating discussions, for the sleepless nights we were working together before deadlines, and for all the fun we have had during my Ph. D study. I would like to thanks Environmental Biotechnology Lab members for their kind assistance. Also I thanks P' Sa, P' Pan, P' Pu and P' Da, the officers in Scientific Equipment Center (SEC), Prince of Songkla University for all technical suggestions.

I would like to express my sincere appreciation to The Joint Graduate School of Energy and Environment (JGSEE), Palm Oil Products and Technology Research Center (POPTEC) at Faculty of Agro-Industry, and Graduate School of Prince of Songkla University, Thailand for the research grant.

Lastly, and most importantly, I am grateful to my wonderful family, parents Soraphum -Suwanna Riansa-ngawong, brothers and sisters. They provided the unconditional love, supports, and encouragement to help me learn that I can truly accomplish anything. To them I dedicate this thesis.

Wiboon Riansa-ngawong

CONTENT

	Page
CONTENT.....	xiv
LIST OF TABLES.....	xviii
LIST OF FIGURES.....	xxiii
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS.....	xxxiv
CHAPTER	
1 INTRODUCTION.....	1
Introduction.....	1
Literature Review.....	2
1. Standard palm oil milling process.....	2
2. Palm oil industrial wastes and their utilization.....	4
3. Characteristics of lignocellulosic materials.....	7
4. Lignocellulosic pretreatment.....	9
5. Key factors for an effective pretreatment of lignocellulosic biomass.....	23
6. Detoxification of lignocellulosic hydrolyzates.....	25
7. Conversion of lignocellulosic materials to value added products.....	28
Objectives.....	65
2 MATERIALS AND METHODS.....	66
1. Materials.....	66
1.1 Palm pressed fiber.....	66
1.2 Microorganisms.....	66
1.3 Media.....	67

CONTENT (Cont.)

	Page
1.4 Enzyme.....	67
1.5 Chemicals and reagents	67
1.6 Instruments	67
2. Analytical methods	68
2.1 Sugars analysis	68
2.2 Enzyme assay	69
2.3 Ethanol, furfural and acetate determination	70
2.4 Protein estimation	70
2.5 Electron microscopic scanning	70
3. Methods	70
3.1 PPF preparation and its composition	71
3.2 Delignification process	71
3.3 Extraction and optimization of hemicellulose by alkaline hydrolysis	72
3.4 Production and optimization of furfural from extracted hemicellulose	74
3.5 Hemicellulosic hydrolysate production	76
3.6 Cellulosic hydrolysate production	79
3.7 Ethanol production by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 in synthetic medium	81
3.8 Ethanol production in cellulosic hydrolysate	82
3.9 Effect of inhibitory compounds presented in hemicellulose hydrolysate on ethanol production by <i>Candid shehatae</i> TISTR5843	83

CONTENT (Cont.)

	Page
3.10 Ethanol production from PPF hydrolysate by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843	84
3.11 Ethanol production from PPF hydrolysate in 3 L reactor by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843	86
3.12 Bioethanol production by immobilized <i>Candida</i> <i>shehatae</i> TISTR5843 using PPF as a support	87
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	88
3.1 PPF composition	88
3.2 Delignification of PPF	88
3.3 Optimization of hemicellulose extraction by alkaline hydrolysis	90
3.4 Composition of extracted hemicellulose	96
3.5 Optimization of furfural production from extracted hemicellulose	97
3.6 Cellulosic hydrolysate production	114
3.7 Hemicellulosic hydrolysate production	126
3.8 Ethanol production in synthetic glucose or/and xylose medium by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843	143
3.9 Ethanol production in cellulosic hydrolysate	167
3.10 Ethanol production from PPF hydrolysate by <i>C.</i> <i>shehatae</i> TISTR5843	174
3.11 Potential of ethanol production by immobilized <i>C. shehatae</i> TISTR5843 using PPF as a support	205
4 CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS.....	211
Conclusions.....	211

CONTENT (Cont.)

	Page
Suggestions.....	214
REFERENCES.....	215
APPENDIX.....	250
VITAE.....	260

LIST OF TABLES

Table		pages
1	Characteristics of palm oil mill effluent (POME)	6
2	Detoxification methods of streams resulting of pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production ...	30
3	Fuel ethanol programs in some countries	43
4	World production of ethyl alcohol (milliliters)	44
5	Important characteristics for industrially ethanol production	50
6	Ethanol production from glucose and/or xylose by microorganisms	58
7	Performance of xylose-fermenting yeasts on aeration	62
8	List of some instruments	68
9	Compositions of palm pressed fiber (PPF) and delignified PPF (dPPF)	89
10	Central composite experimental design matrix defining potassium hydroxide (KOH) concentration (% w/v) (X_1), the PPF to KOH ratio (w/v) (X_2), and reaction time (min) (X_3) and results on hemicellulose concentration	92
11	Model coefficient and analysis of variance estimated by ANOVA for hemicellulose production from dPPF	93
12	The confirmation experiments for hemicellulose contents after extraction at the optimal condition	95
13	Operational conditions assayed and experimental data obtained on the furfural production from extracted hemicellulose	99
14	Comparison of furfural yield produced from various lignocellulosic materials using one-stage process	100

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		pages
15	Central composite experimental design matrix defining reaction temperature ($^{\circ}\text{C}$) (X_4), sulfuric acid concentration (% v/v) (X_5), L/S ratio (ml/g) (X_6), and reaction time (min) (X_7) and results on productions of xylose (Y_2), glucose (Y_3), furfural (Y_4) and acetate (Y_5)	104
16	Model coefficient and analysis of variance estimated by ANOVA for xylose production	105
17	The confirmation experiments for xylose contents after hydrolysis using the optimal condition	108
18	Central composite experimental design matrix defining reaction temperature ($^{\circ}\text{C}$) (X_8) and reaction time (min) (X_9) and results on production of furfural	109
19	Model coefficient of furfural production estimated by ANOVA	111
20	The confirmation experiments for furfural yield after hydrolysis and dehydration processes using the optimal condition predicted by RSM	113
21	Comparison of furfural yield produced from various lignocellulosic materials using two-stage process	114
22	Summary of the optimal value of each parameter for the highest reducing sugar yield production	118
23	Results of the experimental design for response surface analysis for producing reducing sugars and by-products formation	120
24	Comparison of predicted and experimental values of five responses (Y_7 - Y_{11}) at the optimal levels predicted from model using response surface method (RSM)	125

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		pages
25	Comparison of reducing sugar and inhibitors between concentrated sulfuric acid and enzymatic hydrolysis	126
26	Kinetics and statistical parameters of xylose, glucose, furfural and acetic acid released during dilute sulfuric acid hydrolysis of delignified palm pressed fiber (dPPF) at various reaction temperatures	133
27	Generalized models for kinetic parameters prediction of dPPF hydrolysis with dilute sulfuric acid at 120°C	134
28	Comparison of xylose production rate (k_1), xylose decomposition rate (k_2), glucose production rate (k_3), furfural formation rate (k_4), and acetic acid generation rate (k_5) on various lignocellulosic materials by acid hydrolysis	139
29	Comparison of reducing sugars and by-products formation during various acid hydrolysis conditions from lignocellulosic materials ..	142
30	Comparisons of ethanol yields, ethanol productivities and ethanol percentages obtained by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 under parameters affecting on ethanol production	166
31	Comparison of ethanol production from cellulosic hydrolysate by <i>C. shehatae</i> TISTR5843, <i>S. cerevisiae</i> TISTR5017, and <i>Z. mobilis</i> TISTR405	167
32	Central composite experimental design matrix defining initial pH (X_{13}), shaking speed (rpm) (X_{14}), and initial cells concentration (g/l) (X_{15}) and results on ethanol production from cellulosic hydrolysate after cultivation of <i>S. cerevisiae</i> TISTR5017 for 72 h at room temperature (30°)	170

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		pages
33	Analysis of variance (ANOVA) for ethanol production from a cellulosic hydrolysate	172
34	The confirmation experiments for ethanol production from cellulosic hydrolysate by <i>S. cerevisiae</i> TISTR5017 cultivated under the optimal condition	173
35	The performance of ethanol production from xylose medium with supplementation of 4.25 g/l acetate and 0.67 g/l furfural at different C/N ratios by <i>C. shehatae</i> TISTR5843	178
36	Growth and ethanol production by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 in synthetic xylose medium in the presence of inhibitory compounds	180
37	Central composite experimental design matrix defining initial pH (X_{16}), shaking speed (rpm) (X_{17}), and initial cells concentration (g/l) (X_{18}) and results on ethanol production from PPF hydrolysate after cultivation of <i>C. shehatae</i> TISTR5843 under 1/2 dilution factor of PPF hydrolysate medium (13 g/l initial xylose content) for 72 h at room temperature (30°)	189
38	Analysis of variance (ANOVA) for ethanol production from a PPF hydrolysate medium	193
39	The confirmation experiments for ethanol production from PPF hydrolysate medium (xylose 13 g/l) by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 cultivated under the optimal condition	195
40	Fermentative kinetics of fed-batch and semi-continuous processes from PPF hydrolysate medium by <i>C. shehatae</i> TISTR5843	202
41	Growth and fermentation kinetics of free and immobilized cells by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 adhered on various supports in batch fermentation	208

LIST OF TABLES (Cont.)

Table		pages
42	Fermentative kinetics of free and immobilized cells by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 adhered on sPPF in four repeated batches fermentation	210

LIST OF FIGURES

Figure		page
1	Schematic diagram of wet processing palm oil production using decanter (——) process; (·····) waste	3
2	The composition of palm pressed fiber (PPF) and the final products	7
3	Fragment of a cellulose chain	7
4	Fragment of a hemicellulose chain	8
5	The elementary phenylpropane building blocks of various lignin ...	9
6	Reaction mechanism of acid hydrolysis of pentosan to furfural	42
7	Schematic representation of glucose and fructose metabolism in <i>Z. mobilis</i> . ———→ common pathway, - - - - -→ exclusive fructose pathway	52
8	Photograph showing single cells of (A) <i>Z. mobilis</i> ZM4 and (B) its flocculent	52
9	Diagram of ethanol production via xylose pathway, pentose phosphate pathway, and Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway	55
10	Initial steps in the metabolism of D-Xylose by yeasts	56
11	Flow chart of this research work	71
12	Experimental protocol used to determine the yields of hemicellulose and furfural	73
13	Three-dimensional graphs of the quadratic model for hemicellulose yield (%) (A-C) within the central composite design (CCD). Experiments A fixed reaction time at centre point of 40 minutes; Experiments B fixed the PPF: KOH ratio at centre point of 1:35 (w/v); and Experiments C fixed KOH concentration at centre point of 30 % (w/v)	94

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		page
14	(A); TLC chromatogram of digested PPF by 2 N TFA at 120°C for 90 min; 1: standard arabinose, 2: standard rhamnose, 3: standard xylose, 4: standard fructose, 5: standard galactose, 6: standard glucose, 7: standard mannose, 8 and 9: PPF, 10 and 11: extracted hemicellulose from PPF. (B); the retention factor (R_f) values of various standard sugars and hydrolysate samples of PPF	97
15	Three-dimensional graphs of the quadratic model for xylose yield (g/l) (a-f) within the central composite design (CCD). (a) fixed L/S ratio and reaction time at centre point of 9 ml/g and 75 min; (b) fixed H_2SO_4 and reaction time at centre point of 5.5% and 75 min; (c) fixed H_2SO_4 and L/S ratio at centre point of 5.5 % and 9 ml/g; (d) fixed reaction temperature and time at centre point of 120°C and 75 min; (e) fixed reaction temperature and L/S ratio at centre point of 120°C and 9 ml/g; (f) fixed reaction temperature and H_2SO_4 at centre point of 120°C and 5.5%	103
16	Three-dimensional graphs showing the effect of reaction temperature, H_2SO_4 concentration, L/S ratio and reaction time on furfural (a, d, g), acetate (b, e, h) and glucose (c, f, i) productions...	107
17	Graph of the quadratic model for furfural production (g/l) within the central composite design (CCD) of reaction temperature and reaction time	111
18	Time course of furfural production (\square) and pure xylose degradation (Δ) at 135.2°C for 90.3 min	113
19	Effect of pH of cellulase on reducing sugar production from cellulose of PPF at substrate concentration of 2 g/l with cellulase dosage of 500 U/g substrate under 50°C for 24 h	115

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		page
20	Effect of reaction temperature on reducing sugar production from cellulose of PPF at pH at substrate concentration of 2 g/l with cellulase dosage of 500 U/g substrate under pH 4.8 for 24 h	115
21	Effect of substrate concentration (cellulose) on reducing sugar production by enzymatic hydrolysis at cellulase dosage of 500 U/g substrate under 50°C, pH 4.8 for 24 h	116
22	Effect of cellulase dosage on reducing sugar production from cellulose of PPF at substrate concentration of 12 g/l under 50°C, pH 4.8 for 24 h	117
23	Effect of incubation time on reducing sugar production and saccharification values from cellulose by using cellulase hydrolysis at substrate concentration of 12 g/l with cellulase dosage of 4,166 U/g substrate under 50°C, pH 4.8 for 24 h	118
24	Three-dimensional graphs of the quadratic model for reducing sugars yield (g/l) (A-C) and xylose yield (g/l) (D-F) by using Box-Behnken design: (A and D); fixed reaction time at centre point of 120 minutes, (B and E); fixed the dilute sulfuric acid at centre point of 3% (v/v), and (C and F); fixed the solid-liquid ratio at centre point of 1:15 (w/v)	123
25	Three-dimensional graphs of the quadratic model for Acetic acid (g/l) (A-C) furfural (g/l) (D-F) and 5-HMF (g/l) (G-I) by using Box-Behnken design: (A, D and G); fixed reaction time at centre point of 120 minutes, (B, E and H); fixed the dilute sulfuric acid at centre point of 3% (v/v), and (C, F and I); fixed the solid-liquid ratio at centre point of 1:15 (w/v)	124

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		page
26	Experimental and predicted concentrations of xylose released from dPPF at: (a) autohydrolysis (0% sulfuric acid) with various reaction temperature of 75-148°C, (b) 5% sulfuric acid hydrolysis, and (c) 10% sulfuric acid hydrolysis with the same reaction temperature	128
27	Experimental and predicted concentrations of glucose released from dPPF at: (a) autohydrolysis with various reaction temperature of 75-148°C, (b) 5% sulfuric acid hydrolysis, and (c) 10% sulfuric acid hydrolysis with the same reaction temperature	129
28	Experimental and predicted concentrations of furfural generated in dPPF hydrolysate at: (a) autohydrolysis (0% sulfuric acid) with various reaction temperature of 75-148°C, (b) 5% sulfuric acid hydrolysis, and (c) 10% sulfuric acid hydrolysis with the same reaction temperature	131
29	Experimental and predicted concentrations of acetic acid generated in dPPF hydrolysate at: (a) autohydrolysis (0% sulfuric acid) with various reaction temperature of 75-148°C, (b) 5% sulfuric acid hydrolysis, and (c) 10% sulfuric acid hydrolysis with the same reaction temperature	132
30	Effect of sulfuric acid concentration and reaction time on generalized model for prediction of; (a) xylose production, (b) glucose production, (c) furfural formation and (d) acetic acid release	135
31	Comparative studies of xylose (a), and glucose productions (b) from PPF and dPPF using various diluted sulfuric acid at 30 and 60 min	141

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		page
32	Comparative studies of acetic acid (a) and furfural productions (b) from PPF and dPPF using various diluted sulfuric acid	143
33	Time course of ethanol production (a) and glucose consumption (b) by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 in various glucose concentrations at 180 rpm, room temperature (28-30°C) for 96 h	145
34	Time course of DCW (a), pH changes (b) and acetate residuals (c) during ethanol production by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various glucose concentrations at 180 rpm, room temperature (28-30°C)	146
35	Time course of ethanol production (a) and xylose consumption (b) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various xylose concentrations at 180 rpm, room temperature (28-30°C)	149
36	Time course of furfural residuals (a) and acetic acid residuals (b) in ethanol production by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various xylose concentrations at 180 rpm, room temperature (28-30°C)	150
37	Time course of DCW (a) and pH changes (b) during ethanol production by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various xylose concentrations at 180 rpm, room temperature (28-30°C)	151
38	Time course of ethanol production (a) and reducing sugar consumption (b) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various glucose to xylose ratios at 180 rpm, room temperature (28-30°C) ..	153
39	Time course of furfural residuals (a) and acetic acid residuals (b) in ethanol production by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various glucose to xylose ratios at 180 rpm, room temperature (28-30°C) ..	154

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure	page
40	Time course of DCW (a) and pH changes (b) during ethanol production by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various glucose to xylose ratios at 180 rpm, room temperature (28-30°C) 155
41	Time course of ethanol production (a) and reducing sugar consumption (b) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various initial pH (3.0-6.0) under 2:8 (w/w) of glucose to xylose ratios at 180 rpm, room temperature (30°C) 157
42	Time course of furfural concentrations (a), protein contents (b) and pH changes (c) during ethanol production by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 in various initial pH (3.0-6.0) under 2:8 (w/w) of glucose to xylose ratios at 180 rpm, room temperature (30°C) 158
43	Time course of ethanol production (a) and reducing sugar consumption (b) by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 in 2:8 (w/w) of C6 to C5 ratios at 180 rpm, pH 5.0 under 30°C and 35 °C 160
44	Time course of acetic acid and furfural concentrations (a) protein content and pH changes (b) during ethanol production by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 in 2:8 (w/w) of glucose to xylose ratios at 180 rpm, pH 5.0 under room temperature (30°C) and 35 °C 161
45	Time course of ethanol production (a) and reducing sugar consumption (b) by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 in various shaking speed in synthetic medium containing 2:8 (w/w) of glucose to xylose ratios, pH 5 at room temperature (30°C) 163
46	Time course of furfural concentrations (a), DCW (b) and pH changes (c) during ethanol production by <i>C. shehatae</i> TISTR5843 in various shaking speed in synthetic medium containing 2:8 (w/w) of glucose to xylose ratios, pH 5 at 30°C 164

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		page
47	Three-dimensional graphs of the quadratic model of ethanol production in a cellulosic hydrolysate medium by <i>S. cerevisiae</i> TISTR5017. for ethanol concentration (a-c), ethanol yield (d-f) and ethanol productivity (g-i) within the central composite design (CCD): a, d and g; fixed initial cells concentration at centre point of 0.70 g/l, b, e and h; fixed shaking speed at centre point of 180 rpm, c, f and i; fixed initial pH at centre point of 5.0	171
48	Time course comparison of ethanol production in synthetic xylose and PPF hydrolysate mediums by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under 20 g/l xylose, initial pH of 5.0, shaking speed of 180 rpm at room temperature (30°C)	175
49	Effect of nitrogen sources on ethanol production by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 with supplementation of acetate (4.25 g/l) and furfural (0.67 g/l) at optimum pH of 5.0 and initial cell concentration of 0.725 g/l incubated at 30°C on a rotary shaker (180 rpm) for 24 and 48 h	176
50	Time course of cell growth and pH change (a), and xylose consumption and ethanol production (b) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under various peptone concentrations of 1-10 g/l in synthetic xylose medium with supplementation of acetate (4.25 g/l) and furfural (0.67 g/l), pH5 with the initial cell concentration of 0.725 g/l. The incubation condition was at 30°C on a rotary shaker (180 rpm)	177

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure	page
51	Time course of growth and pH change (a), and xylose consumption and ethanol production (b) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under various vanillin supplementations of 0-2 g/l in synthetic xylose medium (pH5) with the initial cell concentration of 0.725 g/l. The incubation condition was at 30°C on a rotary shaker (180 rpm) 181
52	Time course of growth and pH change (a), xylose consumption and ethanol production (b), and acetate reduction (c) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under various acetate supplementations of 0-10 g/l in synthetic xylose medium (pH5) with the initial cell concentration of 0.725 g/l. The incubation condition was at 30°C on a rotary shaker (180 rpm) in synthetic xylose medium (pH5) with the initial cell concentration of 0.725 g/l 182
53	Time course of growth and pH change (a), xylose consumption and ethanol production (b), and furfural reduction with furfuryl alcohol (FA) generation (c) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under various furfural supplementations of 0-2 g/l in synthetic xylose medium (pH5) with the initial cell concentration of 0.725 g/l. The incubation condition was at 30°C on a rotary shaker (180 rpm) 183
54	Time course of growth and pH change (a), xylose consumption and ethanol production (b), furfural and acetate reduction with furfuryl alcohol (FA) generation (c) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under mixture of 4.25 g/l acetate and 0.67 g/l furfural in synthetic xylose medium (pH5) with the initial cell concentration of 0.725 g/l at 30°C on a rotary shaker (180 rpm) 184

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure	page
<p>55 Time course of growth and pH change (a) and xylose consumption and ethanol production (b) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various PPF hydrolysate dilutions (pH5) with the initial cell concentration of 0.725 g/l. The incubation condition was 30°C on a rotary shaker (180 rpm)</p>	186
<p>56 Time course of acetate consumption (a) and furfural reduction with furfuryl alcohol (FA) generation (b) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in various PPF hydrolysate dilutions (pH5) with the initial cell concentration of 0.725 g/l. The incubation condition was at 30°C on a rotary shaker (180 rpm)</p>	187
<p>57 Three-dimensional graphs of the quadratic model of ethanol production in PPF hydrolysate by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843: ethanol concentration (a-c), ethanol yield (d-f) and ethanol productivity (g-i) within the central composite design (CCD): a, d and g; fixed initial cells concentration at centre point of 1.2 g/l, b, e and h; fixed shaking speed at centre point of 120 rpm, c, f and i; fixed initial pH at centre point of 5.0</p>	192
<p>58 Time course of xylose consumption and ethanol production (a), pH change (b), and acetate and furfural reduction (c) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under sterilized and non-sterilized PPF hydrolysate medium (pH5.25) with the initial cell concentration of 1.08 g/l. The incubation condition was at 30°C on 135 rpm</p>	196

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure	page	
59	<p>Time course of xylose consumption and ethanol production (a), pH change and DCW (b), acetic acid reduction (c), furfural reduction and furfuryl alcohol production (d) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under non-sterilized with 1/2 dilution of PPF hydrolysate medium (pH 5.25) in both flask and reactor with the initial cell concentration of 1.08 g/l. The incubation condition was at 30°C on a rotary shaker (135 rpm) for 108 h</p>	198
60	<p>Time course of xylose consumption and ethanol production (a), pH change and DCW (b), furfural reduction and furfuryl alcohol generation (c), acetic acid reduction (d) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under non-sterilized fed-batch process with 1/2 dilution (pH5.25) in 3 liters reactor with the initial cell concentration of 1.08 g/l. The incubation condition was at 30°C on a rotary shaker (135 rpm) for 144 h</p>	200
61	<p>Reduction of ethanol production and substrate uptake rate (a) and accumulation of furfural and acetate (b) in all cycles of fed-batch fermentation by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in 3 liters non-sterilized PPF hydrolysate</p>	201
62	<p>Time course of xylose consumption and ethanol production (a), pH change and DCW (b), furfural reduction and furfuryl alcohol generation (c), acetic acid reduction (d) by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 under non-sterilized semi-continuous process with 1/2 dilution of PPF hydrolysate medium (pH5.25) in 3 liters reactor with the initial cell concentration of 1.08 g/l. The incubation condition was at 30°C on a rotary shaker (135 rpm) for 144 h</p>	203

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		page
63	Reduction of ethanol production and substrate uptake rate (a) and accumulation of furfural and acetate (b) in all cycles of semi-continuous fermentation by <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in a 3 liters non-sterilized PPF hydrolysate	204
64	Scanning electron micrograph of (a) IPPF, (b) sPPF and (c) sDPPF; and immobilized cells adhere to the surface of (d) IPPF, (e) sPPF and (f) sDPPF	206
65	Kinetics of ethanol production by free and immobilized cells of <i>Candida shehatae</i> TISTR5843 in batch fermentation, in panel (a) cell growth, (b) ethanol production and (c) glucose consumption; and in repeated batches fermentation, in panel (d) cell growth, (e) ethanol production and (f) glucose consumption at room temperature (30°C) with shaking speed 150 rpm	207

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

ADH	Alcohol dehydrogenase
AFEX	Ammonia fiber explosion
ATP	Adenosine triphosphate
BOD	Biological oxygen demand
CCD	Central composite design
CH ₃ COOK	Potassium acetate
CMC	Carboxymethylcellulose
COD	Chemical oxygen demand
CO ₂	Carbon dioxide
C/N	Carbon to nitrogen ratio
CV	Coefficient of variation
°C	Degree celcius
Da	Dalton
DCW	Dry cell weight
dPPF	Delignified palm pressed fiber
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EFB	Empty fruit bunch
FFB	Fresh fruit bunch
FPA	Filter paper activity
FPU	Filter paper unit
GC	Gas chromatography
g	Gram
g/l	Gram per liter
g/l/h	Gram per liter per hour
g/g	Gram per gram
<i>x g</i>	Gravitational force
h	Hour
HMF	Hydroxymethylfurfural

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS (Cont.)

HPLC	High performance liquid chromatography
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
H ₂ SO ₄	Sulfuric acid
KH ₂ PO ₄	Potassium phosphate
KOH	Potassium hydroxide
LSR	Liquid to solid ratio
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ml/min	Milliliter per minute
MgCl ₂	Magnesium chloride
MSW	Municipal solid wastes
MTHF	Methyltetrahydrofuran
NaClO ₂	Sodium chlorite
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
NH ₄ Cl	Ammonium chloride
NH ₄ NO ₃	Ammonium nitrate
(NH ₄) ₃ PO ₄	Ammonium phosphate
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammonium sulfate
NRE	The national renewable energy
P_{max}	Maximum product production
PKS	Palm kernel shell
PPF	Palm pressed fiber
POME	Palm oil mill effluent
Qp	Ethanol productivity
Qs	Substrate uptake rate
R _f	Retention factor
rpm	Round per minute

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS (Cont.)

R_{max}	Maximum product production rate
RSM	Response Surface Methodology
SEC	Scientific Equipment Center
SEM	Scanning electron microscopy
SLR	Solid to liquid ratio
SHF	Separate hydrolysis and fermentation
SSF	Simultaneous saccharification and fermentation
TISTR	Thailand Institute of Scientific and Technological Research
TLC	Thin layer chromatography
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume
λ	Lag time
μ	Specific growth rate
X_{max}	Maximum cells concentration
$Y_{p/s}$	Ethanol yield