KKU Res. J. 2013; 18(1):112-121
http : //resjournal.kku.ac.th

การย่อยชานอ้อยซ้ำด้วยกรดอ่อนเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้ *Candida shehatae* TISTR 5843

Repetitive dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production by *Candida shehatae* TISTR 5843

แพรวพรรณ ยุวเดชกุล[1,2], *บัวสาย อัคชาติ*[1], *มัลลิกา บุญมี*[1,3*]
Prawphan Yuvadetkun[1,2], *Buasai Ackachat*[1], *Mallika Boonmee*[1,3*]

[1] *ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002*
[2] *บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002*
[3] *ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002*
[*] *Correspondent author: mallikab@kku.ac.th*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงสภาวะที่ใช้ในการแยกส่วนเฮมิเซลลูโลสจากชานอ้อยด้วยกรดอ่อนและความร้อน ให้ได้ปริมาณน้ำตาลต่อน้ำหนักชานอ้อยสูงสุด รวมถึงการนำน้ำตาลไปผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843 โดยเมื่อย่อยชานอ้อยซ้ำหลายขั้นตอนที่อุณหภูมิ 140 และ 170 องศาเซลเซียสพบว่าสภาวะที่ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดคือใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2% ย่อยซ้ำ 3 รอบ โดยใช้เวลาในการย่อย 90 นาทีที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสและ 45 นาทีที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส ซึ่งปริมาณน้ำตาลทั้งหมดรวม 3 รอบเท่ากับ 351±101 และ 171±62 มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมชานอ้อย ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อนำไฮโดรไลเสทจากการย่อยชานอ้อยซ้ำ 3 รอบ มาผ่านการปรับสภาพด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วนำมาเพาะเลี้ยง *Candida shehatae* TISTR 5843 พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 1.61 กรัมต่อลิตร โดยมีผลได้ต่อน้ำตาลทั้งหมดเป็น 0.20 กรัมต่อกรัมและอัตราผลผลิต 0.013 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Abstract

This article reported the conditions for hydrolyzing hemicellulosic fraction of sugarcane bagasse into sugars using dilute acid and heat treatment. It also included the use of the hydrolyzate for ethanol production by *Candida shehatae* TISTR 5843. When hydrolyzing the hemicellulosic fraction with dilute acid at 140 and 170 ºC, the highest total sugar concentration obtained when using 2% H_2SO_4 and 3 repeats of hydrolysis. For 90 min at 140 ºC and 45 min at 170 ºC, the pooled amount of total sugar obtained after 3 repetitive hydrolysis were 351±101 mg/g and 171±62 mg/g respectively. When using the hydrolyzate that was treated with calcium carbonate as substrate

for the cultivation of *C. shehatae* TISTR 5843, ethanol concentration, ethanol yield and ethanol productivity were 1.61 g/L, 0.20 g/g and 0.013 g/L.h respectively.

คำสำคัญ: ชานอ้อย การย่อยด้วยกรดอ่อน เอทานอล *Candida shehatae*

Keywords: sugarcane bagasse, dilute acid hydrolysis, ethanol, *Candida shehatae*

1. บทนำ

จากที่มีการสนับสนุนการใช้และผลิตพลังงานทดแทนอย่างกว้างขวางเพื่อลดปริมาณการใช้น้ำมันปิโตรเลียม โดยพลังงานทดแทนที่สำคัญทั้งในแง่การนำมาใช้และการผลิตคือเอทานอล ซึ่งในปัจจุบันการผลิตเอทานอลจะเน้นการใช้วัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลเป็นหลักโดยเฉพาะมันสำปะหลังและกากน้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบประเภทดังกล่าวนอกจากจะถูกใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลแล้ว ยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมอื่นอีก เช่น การผลิตกรดซิตริกและแลคติก (1-4) ปัจจุบันทั้งมันสำปะหลังและกากน้ำตาลถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลายมาก ทำให้วัตถุดิบดังกล่าวบางครั้งขาดตลาดในการป้อนเข้าสู่โรงงานแปรรูปต่างๆ ทั้งนี้ยังไม่นับการที่แป้งและน้ำตาลถูกใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่บริโภคได้สำหรับคนและสัตว์ได้อีก จึงจะเห็นในภาพรวมได้ว่ามีความต้องการในการใช้วัตถุดิบแป้งและน้ำตาลในปริมาณที่สูงในหลายภาคส่วน

จากเหตุผลที่กล่าวมาแล้วจึงมีการศึกษาเพื่อหาวัสดุทางเลือกเพื่อนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งวัสดุที่มีแนวโน้มในการนำมาใช้เป็นวัสดุทางเลือกคือ วัสดุลิกโนเซลลูโลส การใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลส เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ฯลฯ เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลนั้นกำลังเป็นที่สนใจในการศึกษา เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมการอาหาร ซึ่งจะมีวัสดุจำพวกนี้อยู่มาก ทั้งนี้วัสดุลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบ 3 ส่วนหลักๆ คือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งโมเลกุลของน้ำตาลจะต่อกันเป็นโพลีแซคคาไรด์อยู่ในส่วนเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส ดังนั้นการนำน้ำตาลที่มีอยู่ในวัสดุทางเลือกดังกล่าวที่เป็นวัสดุทางการเกษตรนั้น มาใช้จำเป็นที่จะต้องผ่านกระบวนการย่อยเพื่อให้เกิดน้ำตาลก่อนนำมาใช้ โดยในการศึกษานี้สนใจการนำส่วนเฮมิเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ ทั้งนี้กระบวนการย่อยส่วนเฮมิเซลลูโลสที่ใช้อย่างกว้างขวางคือการย่อยด้วยกรดอ่อน (5) ซึ่งน้ำตาลหลักที่ได้จากการย่อยคือไซโลสและอาจเกิดกลูโคสออกมาในปริมาณเล็กน้อย สำหรับการย่อยด้วยกรดอ่อนนิยมใช้กรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริกในการย่อย (6) ในหลายๆ การศึกษาใช้การย่อยเพียงครั้งเดียว (7-9) ทั้งนี้เมื่อใช้อุณหภูมิในการย่อยต่ำกว่า 160 องศาเซลเซียส ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะมีการย่อยแบบ heterogeneous โดยจะมีส่วนที่ย่อยได้ง่ายและส่วนที่ย่อยได้ช้ากว่า (10) ดังนั้นหากมีการย่อยส่วนเฮมิเซลลูโลสซ้ำอาจทำให้ได้น้ำตาลมากกว่าการย่อยเพียงครั้งเดียว

ทั้งนี้หากต้องการใช้ประโยชน์จากส่วนเฮมิเซลลูโลสในการผลิตเอทานอลนั้น จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะต้องสามารถเปลี่ยนน้ำตาลทั้งหมดคือไซโลสและกลูโคสที่ได้จากการย่อยไปเป็นเอทานอล ทั้งนี้จากการศึกษาต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่สามารถใช้ไซโลสในการผลิตเอทานอลได้เช่น *Pichia stipitis* (11), *Candida shehatae* (12) และ *Pachysolen tannophilus* (13)

การศึกษานี้นำเสนอการย่อยชานอ้อยด้วยกรดอ่อนหลายซ้ำและการขยายขนาดการย่อยรวมถึงการนำไฮโดรไลเสทของชานอ้อยมาใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida shehatae* TISTR 5843 ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตเอทานอลได้

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมวัตถุดิบชานอ้อย

นำชานอ้อยที่ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาลมิตรภูเวียง อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น โรงงานแห่งนี้ใช้อ้อยเพื่อผลิตน้ำตาลด้วยการบีบอ้อยเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวเพื่อนำไปผลิตน้ำตาล ส่วนชานอ้อยที่ผ่านการแยกของเหลวออกแล้วกลายเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการนี้ นำชานอ้อยจากโรงงานมาตากแห้งด้วยแสงแดดเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำชานอ้อยมากำจัดลิกนินด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ที่มีความเข้มข้น 15% โดยปริมาตร โดยใช้สัดส่วนคือ 100 กรัมจากชานอ้อยต่อแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) 3 ลิตร ผสมชานอ้อยและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในขวดโหลแก้วขนาด 5 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยมีการกวนทุกๆ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกส่วนชานอ้อยออกโดยการกรองด้วยผ้าขาวบางแล้วล้างด้วยน้ำกรอง 3 ครั้ง จึงอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักชานอ้อยคงที่

2.2 การย่อยชานอ้อยด้วยกรดอ่อน

นำชานอ้อยที่ผ่านการกำจัดลิกนินแล้วมาย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) 1% และ 2% โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 140 และ 170 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการย่อยอยู่ในช่วง 15-120 นาที โดยใช้สัดส่วนของชานอ้อยต่อกรดซัลฟิวริกคือ ชานอ้อย 5 กรัมต่อกรดซัลฟิวริก 100 มิลลิลิตร ดำเนินการย่อยในขวดขนาด 500 มิลลิลิตรที่ปิดฝาขวดสนิทเพื่อป้องกันการระเหยของของเหลว ทำการย่อยโดยใช้ตู้อบลมร้อนเป็นแหล่งให้ความร้อน เมื่อครบเวลาในการย่อยขั้นแรกแล้ว แยกส่วนชานอ้อยที่เหลือและของเหลวด้วยผ้าขาวบางโดยมีการบีบเพื่อให้ได้ส่วนของเหลวออกมามากที่สุด จากนั้นนำส่วนของแข็งไปย่อยซ้ำโดยเติมกรดซัลฟิวริกใหม่เข้าไปในขวดในปริมาตรเท่ากับการย่อยในขั้นที่ 1 และดำเนินการย่อยเช่นเดิม ดำเนินการย่อยเช่นนี้ 5 ครั้ง ของเหลวที่ได้จากการย่อยในแต่ละขั้นตอนถูกนำมาปรับค่าพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมล่าร์ ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยจะมีการบันทึกปริมาตรของของเหลวหลังการย่อยและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ปรับค่าพีเอชเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการคำนวณและเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในไฮโดรไลเสทระหว่างที่มีการย่อยซ้ำรอบที่ 2, 3, 4 และ 5

2.3 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

2.3.1 จุลินทรีย์

Candida shehatae TISTR 5843 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ถูกเก็บรักษาในอาหาร YM ที่มีกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อของ *C. shehatae* TISTR 5843

การเตรียมกล้าเชื้อของ *C. shehatae* TISTR 5843 ทำเป็น 2 ขั้นตอน โดยกล้าเชื้อที่ 1 เตรียมจากการนำโคโลนีเดี่ยวมา 1-2 โคโลนี ถ่ายลงในอาหาร YM ที่ประกอบไปด้วยยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และไซโลส 10 กรัมต่อลิตรโดยมีปริมาตรใช้จริง 30 มิลลิลิตร ในฟลาส์กที่มีแผ่นกั้น (Baffle-flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีการเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกล้าเชื้อที่ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ถ่ายลงในอาหารกล้าเชื้อที่ 2 ที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับกล้าเชื้อที่ 1 แต่เพิ่มปริมาณไซโลสเป็น 20 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มและเขย่าที่สภาวะเดิม

2.4 การเพาะเลี้ยง *Candida shehatae* TISTR 5843 เพื่อผลิตเอทานอล

การเพาะเลี้ยง *Candida shehatae* TISTR 5843 แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตชีวมวลและการนำชีวมวลมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอทานอล การผลิตชีวมวลจะทำในฟลาส์กที่มีแผ่นกั้น (Baffle-flask) ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยถ่ายกล้าเชื้อที่ 2 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ลงในอาหาร YM-ไฮโดรไลเสทชานอ้อยปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งอาหาร YM-ไฮโดรไลเสทชานอ้อยมีองค์ประกอบเหมือนกับอาหารสำหรับกล้าเชื้อที่ 2 แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจาก

ไซโลสเป็นไฮโดรไลเสทชานอ้อยโดยปรับให้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในไฮโดรไลเสทเป็น 10 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มและเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาทีจนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์คงที่ หลังการเพาะเลี้ยงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสทิ้งแล้วนำชีวมวลที่ได้จากขั้นนี้ไปใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

นำชีวมวลที่ได้ถ่ายลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดิมปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงจนกระทั่งการใช้น้ำตาลทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ไซโลส กลูโคส อะราบิโนส และเอทานอล

2.5 การวิเคราะห์

ความเข้มข้นเซลล์วัดโดยวิเคราะห์ค่าความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดวัดโดยใช้วิธีฟีนอลซัลฟิวริก (phenol sulfuric method) (14) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์วัดโดยวิธี DNS (15)

สำหรับปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส) วิเคราะห์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) (Shimazu, ญี่ปุ่น) โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H (Bio-Rad, อเมริกา) ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบ RID (Refractive index detector) ใช้กรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์เป็นตัวชะด้วยอัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที

2.6 การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลจากการย่อย

การศึกษานี้วิเคราะห์ประสิทธิภาพของการย่อยจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ที่ได้จากการย่อยต่อหนึ่งหน่วยวัตถุดิบ เนื่องจากปริมาตรไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยในแต่ละครั้งนั้นแตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อการคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อย ดังนั้นจึงมีการบันทึกปริมาตรของไฮโดรไลเสทหลังการย่อยทุกครั้ง (ข้อ 2.2) เพื่อใช้ในการคำนวณ ซึ่งการคำนวณปริมาณน้ำตาลจากการย่อยแต่ละครั้งเป็นไปดังสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อกรัม)} = \frac{A \times (B \times 0.001)}{c}$$

โดยที่ A= ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในไฮโดรไลเสท (กรัมต่อลิตร)

B= ปริมาตรไฮโดรไลเสทหลังการย่อย (ลิตร)

C= น้ำหนักชานอ้อยที่ใช้เริ่มต้นในแต่ละสภาวะ (กรัม)

สำหรับปริมาณน้ำตาลรวมจากการย่อยหลายซ้ำของแต่ละสภาวะนั้นคำนวณจากผลรวมของปริมาณน้ำตาลในแต่ละซ้ำ (หน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมของชานอ้อย)

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

3.1 การย่อยชานอ้อย

3.1.1 การย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส

ในการย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส มีการแปรผันเวลาในแต่ละขั้นตอนของแต่ละชุดการทดลองเป็น 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที โดยดำเนินการทั้งสิ้น 5 ครั้ง (ขั้นตอน) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสเมื่อแปรผันเวลาต่างๆ แสดงในตารางที่ 1 โดยในทุกเวลาที่ใช้ในการย่อยด้วยกรดทั้ง 2 ความเข้มข้นพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าสูงสุดในการย่อยขั้นที่ 1 จากนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงเมื่อย่อยชานอ้อยในขั้นที่ 2 ถึงขั้นที่ 4 ทั้งนี้น้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากชานอ้อยเมื่อย่อยในขั้นที่ 5 ไม่แตกต่างกันกับขั้นที่ 4 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้ในขั้นที่ 1 ซึ่งเป็นขั้นที่ให้ประสิทธิภาพการย่อยที่ดีที่สุดพบว่าการย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเมื่อใช้เวลาในการย่อย 120 นาที โดยน้ำตาลทั้งหมดที่ย่อยได้มีค่าเฉลี่ย 16.0±3.8 กรัมต่อลิตรคิดเป็น 152±22 มิลลิกรัม

น้ำตาลต่อกรัมชานอ้อย ในขณะที่การย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 2 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดเมื่อใช้เวลาการย่อย 90 นาที โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.73±0.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 214±59 มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมชานอ้อย ซึ่งเมื่อเพิ่มเวลาในการย่อยเป็น 120 นาทีปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้มีค่าลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการที่เมื่อใช้เวลาในการย่อยนานจะทำให้น้ำตาลถูกสลายต่อไปเป็นสารอื่น เช่น เฟอร์ฟูรอล เป็นต้น ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้มีค่าต่ำลง (7,16)

ดังนั้นสภาวะที่ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสคือใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการย่อย 90 นาที โดยย่อยชานอ้อยทั้งสิ้น 3 รอบ ซึ่งสภาวะดังกล่าวให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดในการย่อยรอบที่ 1 จากนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะมีค่าลดลง 61 และ 75 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับรอบที่ 1 ในการย่อยรอบที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดรวมทั้ง 3 รอบคิดเป็น 351±101 มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมชานอ้อย

3.1.2 การย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส

เมื่อย่อยชานอ้อยด้วยสภาวะเช่นเดียวกันที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการย่อย 15, 30, 45, 60 และ 90 นาทีพบว่าการย่อยในรอบที่ 1 ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเช่นเดียวกับเมื่อใช้อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส จากนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จะลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงการย่อยรอบที่ 3 และไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อย่อยในรอบที่ 4 และ 5 เมื่อเทียบกับรอบที่ 3 ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยชานอ้อยที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียสพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสในทุกรอบของการย่อย (ตารางที่ 1 และ 2) ซึ่งอาจเกิดจากการที่การใช้อุณหภูมิสูงในการย่อยจะส่งผลต่อการเกิดน้ำตาลจากส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า โดยปริมาณน้ำตาลที่ได้นั้นจะมีค่าลดลง ซึ่งอาจเกิดจากน้ำตาลที่ได้ถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นตัวยับยั้งจึงส่งผลให้ปริมาณของตัวยับยั้งเพิ่มขึ้นอีกด้วย (17)

สำหรับการพิจารณาเวลาในการย่อยจะพิจารณาจากผลการย่อยในขั้นที่ 1 ซึ่งพบว่าการย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดเมื่อใช้เวลาในการย่อย 60 นาที โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ย่อยได้มีค่าเฉลี่ย 9.71±2.71 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 91.3±33.6 มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมชานอ้อย ในขณะที่การย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 2 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเมื่อใช้เวลาการย่อย 45 นาที โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 9.05±4.22 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 106±46 มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมชานอ้อย ซึ่งเมื่อเวลาในการย่อยเพิ่มเป็น 60 นาทีและ 90 นาที ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้จะมีค่าลดลงคล้ายคลึงกับที่เกิดในกรณีการย่อยที่ 140 องศาเซลเซียส

ดังนั้นสภาวะที่ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดเมื่อย่อยชานอ้อยที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียสคือใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการย่อย 45 นาที โดยย่อยทั้งสิ้น 3 รอบ ทั้งนี้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยมีค่าสูงสุดในการย่อยรอบขั้นที่ 1 และจะลดลง 60 และ 78 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับรอบที่ 1 ในการย่อยในรอบที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งในสภาวะดังกล่าวได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดรวมทั้ง 3 รอบเป็น 171±62 มิลลิกรัมน้ำตาลต่อกรัมชานอ้อย

ตารางที่ 1. แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัม/กรัมชานอ้อย)							
ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก	รอบที่	เวลา (นาที)					
		15	30	45	60	90	120
1%	1	$32.5\pm7.8^{a, C}$	$87.0\pm23.1^{a, B}$	$112\pm29^{a, AB}$	$136\pm9^{a, A}$	$126\pm16^{a, A}$	$152\pm22^{a, A}$
	2	$20.9\pm6.7^{b, C}$	$32.4\pm1.6^{b, BC}$	$50.9\pm12.0^{b, AB}$	$56.3\pm17.8^{b, A}$	$64.5\pm11.3^{b, A}$	$64.0\pm11.2^{b, A}$
	3	$12.9\pm3.1^{bc, B}$	$22.0\pm9.5^{bc, B}$	$30.3\pm7.5^{bc, A}$	$45.4\pm13.6^{b, A}$	$28.1\pm4.9^{c, B}$	$46.8\pm11.6^{b, A}$
	4	$7.4\pm3.2^{c, B}$	$8.45\pm1.7^{c, B}$	$15.5\pm5.8^{c, AB}$	$17.6\pm7.3^{c, A}$	$17.3\pm3.1^{c, A}$	$15.9\pm1.9^{c, A}$
	5	$7.7\pm5.0^{c, B}$	$12.3\pm3.6^{c, AB}$	$13.5\pm4.5^{c, AB}$	$15.2\pm2.4^{c, AB}$	$17.1\pm6.0^{c, A}$	$14.3\pm2.1^{c, AB}$
2%	1	$73.6\pm33.6^{a, D}$	$108\pm22^{a, CD}$	$149\pm8^{a, BC}$	$148\pm5^{a, BC}$	$214\pm59^{a, A}$	$180\pm9^{a, AB}$
	2	$34.5\pm4.7^{b, B}$	$63.4\pm26.9^{b, AB}$	$70.7\pm11.1^{b, A}$	$68.3\pm6.4^{b, A}$	$82.7\pm29.0^{b, A}$	$80.9\pm0.6^{b, A}$
	3	$19.7\pm8.6^{bc, B}$	$21.7\pm11.1^{c, B}$	$25.8\pm3.6^{c, B}$	$45.5\pm5.1^{c, A}$	$54.6\pm13.9^{bc, A}$	$43.6\pm9.8^{c, A}$
	4	$7.5\pm4.5^{c, D}$	$11.5\pm2.6^{c, CD}$	$17.5\pm3.4^{cd, BC}$	$21.3\pm2.7^{d, AB}$	$24.8\pm8.6^{c, A}$	$29.3\pm3.5^{d, A}$
	5	$6.4\pm2.5^{c, C}$	$14.7\pm0.8^{c, AB}$	$12.8\pm0.7^{d, B}$	$18.7\pm4.0^{d, A}$	$17.3\pm2.6^{c, A}$	$18.8\pm5.6^{d, A}$

ตัวพิมพ์ใหญ่เปรียบเทียบในแนวนอน, ตัวพิมพ์เล็กเปรียบเทียบในแนวตั้ง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ข้อมูลจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 2. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัม/กรัมชานอ้อย)						
ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก	รอบที่	เวลา (นาที)				
		15	30	45	60	90
1%	1	$30.1\pm14.1^{a, B}$	$57.7\pm25.5^{a, AB}$	$72.9\pm34.5^{a, AB}$	$91.3\pm33.6^{a, A}$	$59.2\pm10.4^{a, AB}$
	2	$24.7\pm5.7^{ab, B}$	$41.2\pm25.8^{a, AB}$	$47.1\pm21.2^{ab, AB}$	$52.7\pm4.6^{b, AB}$	$57.6\pm8.1^{a, A}$
	3	$16.4\pm4.9^{bc, B}$	$20.9\pm4.6^{b, B}$	$19.1\pm4.7^{bc, B}$	$19.6\pm4.8^{c, B}$	$29.7\pm4.6^{b, A}$
	4	$8.7\pm4.3^{c, B}$	$10.3\pm3.2^{b, B}$	$14.0\pm5.1^{bc, AB}$	$13.0\pm2.3^{c, AB}$	$18.4\pm1.6^{b, A}$
	5	$5.1\pm2.8^{c, B}$	$7.5\pm0.9^{b, B}$	$9.3\pm4.5^{c, B}$	$9.2\pm1.7^{c, B}$	$14.9\pm0.3^{bc, A}$
2%	1	$61.1\pm0.6^{a, A}$	$84.0\pm23.1^{a, A}$	$106\pm46^{a, A}$	$71.3\pm13.9^{a, A}$	$82.3\pm37.2^{a, A}$
	2	$48.4\pm20.7^{a, A}$	$38.4\pm9.1^{b, A}$	$42.1\pm8.8^{b, A}$	$56.7\pm21.2^{a, A}$	$62.0\pm26.4^{a, A}$
	3	$14.7\pm7.2^{b, B}$	$14.0\pm3.8^{c, B}$	$23.4\pm7.2^{b, B}$	$19.7\pm6.0^{b, B}$	$44.3\pm9.4^{ab, A}$
	4	$8.3\pm2.5^{b, B}$	$7.8\pm2.8^{c, B}$	$11.6\pm1.1^{b, B}$	$16.6\pm4.5^{b, AB}$	$19.2\pm3.4^{b, A}$
	5	$8.5\pm1.3^{b, A}$	$10.4\pm4.6^{c, A}$	$9.8\pm1.9^{b, A}$	$11.9\pm4.4^{b, A}$	$13.4\pm1.4^{b, A}$

ตัวพิมพ์ใหญ่เปรียบเทียบในแนวนอน, ตัวพิมพ์เล็กเปรียบเทียบในแนวตั้ง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ข้อมูลจากการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.1.3 การเพิ่มปริมาตรการย่อยชานอ้อยด้วยกรดอ่อนที่อุณหภูมิ 140 และ 170 องศาเซลเซียส

จากสภาวะที่ให้ประสิทธิภาพการย่อยชานอ้อยสูงสุดนำมาย่อยโดยใช้ปริมาตรสูงขึ้นคือ 200, 300 และ 500 มิลลิลิตร และคงสัดส่วนชานอ้อยต่อปริมาณกรดที่ใช้คือชานอ้อย 5 กรัมต่อกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 140 และ 170 องศาเซลเซียสและย่อยทั้งสิ้น 3 รอบ พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยทั้ง 2 อุณหภูมิมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาตรการย่อยจาก 100 มิลลิลิตรเป็น 200 มิลลิลิตรแต่มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณการย่อยสูงกว่า 200 มิลลิลิตร การที่ปริมาณน้ำตาลที่ได้มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาตรการย่อยอาจเกิดจากการที่ให้ความร้อนในการศึกษานี้ใช้ตู้อบและไม่มีการเขย่าหรือกวนในระหว่างการย่อยเพื่อช่วยในการถ่ายเทความร้อนจึงอาจทำให้ความร้อนที่ใช้ทำปฏิกิริยานั้นไม่ทั่วถึงเมื่อใช้ปริมาตรการย่อยสูงขึ้น ทำให้การย่อยเกิดได้ไม่ดีเท่าการย่อยที่ปริมาตรน้อยๆ จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้ต่ำลงในกรณีที่ใช้ปริมาตรการย่อย 300 และ 500 มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Laopaiboon และคณะ (16) ที่ย่อยชานอ้อยด้วยกรดอ่อนโดยมีการขยายขนาดการย่อยจากปริมาตร 30 มิลลิลิตร (ไม่มีการกวน) เป็น 50 ลิตรที่มีการกวนตลอดการย่อยพบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 13 กรัมต่อลิตรเป็น 23 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 73% เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยขนาด 30 มิลลิลิตร ซึ่งจากผลดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าการกวนมีผลต่อการทำงานของกรดที่สามารถสัมผัสกับชานอ้อยและช่วยในการย่อยจึงทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น (16)

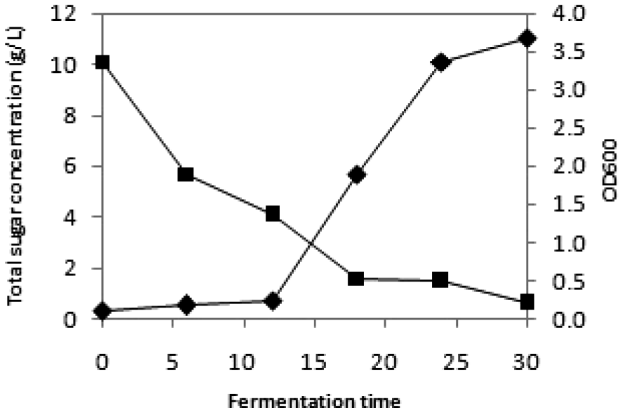
ทั้งนี้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการย่อยชานอ้อยทั้งสิ้น 3 รอบที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียสมีค่า 451±124 มิลลิกรัมต่อกรัม แต่เมื่อใช้อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมชานอ้อย) ที่ได้จากการย่อยชานอ้อยรวมทั้ง 3 รอบ (ขยายขนาด) เมื่อใช้อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส และ 170 องศาเซลเซียส

สัดส่วน (กรัมของชานอ้อย/มิลลิลิตรของกรดซัลฟิวริก)	น้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมชานอ้อย)	
	140 องศาเซลเซียส	170 องศาเซลเซียส
5/100	351±101[ab]	171±61.9[a]
10/200	451±124[b]	320±65.6[b]
15/300	350±84.2[ab]	248±51.6[ab]
25/500	331±132[ab]	196±105[ab]

3.2 การผลิตเอทานอลจากไฮโดรไลเสท

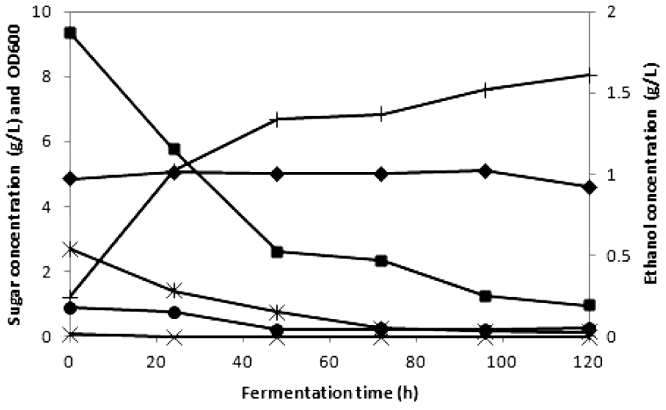
การเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอทานอลโดย *C. shehatae* TISTR 5843 จะทำการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้น คือการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตชีวมวลแล้วจึงนำชีวมวลที่ได้นั้นมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอทานอล (ข้อ 2.4) โดยการผลิตชีวมวล *C. shehatae* TISTR 5843 สำหรับใช้ในการผลิตเอทานอลนั้นพบว่ายีสต์มีการเจริญไม่สอดคล้องกับการใช้น้ำตาลโดยในช่วง 12 ชั่วโมงแรกยีสต์จะเจริญได้ช้าในขณะที่มีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้น *C. shehatae* จะเจริญอย่างรวดเร็วแต่มีการใช้น้ำตาลอย่างช้าๆ โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดได้สมบูรณ์ที่เวลา 30 ชั่วโมงและความเข้มข้นเซลล์มีค่า OD_{600} สูงสุดที่ 3.67 (รูปที่ 1) ทั้งนี้การที่ในช่วงแรกยีสต์มีการใช้น้ำตาลแต่ไม่มีการเจริญอาจเนื่องมาจากการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดอ่อนทำให้เกิดตัวยับยั้งในปริมาณที่อาจไม่ส่งผลในการยับยั้งการเจริญแต่จะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าและทำให้มีช่วงการปรับสภาพของจุลินทรีย์ยาวขึ้น (18)



รูปที่ 1. การเจริญและการใช้น้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยง *C. shehatae* TISTR 5843 ในอาหาร YM-ไฮโดรไลเสทชานอ้อย ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยมีปริมาตรใช้จริง 100 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (♦ คือ OD_{600}, ■ คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด)

เมื่อนำชีวมวลจากการเพาะเลี้ยงข้างต้นมาใช้เพื่อผลิตเอทานอลในสภาวะนิ่งที่ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหาร YM ที่มีไฮโดรไลเสทเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นเซลล์ (OD_{600}) ระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วง 4.80 ถึง 5.10 ตลอดการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 120 ชั่วโมง พบว่าความขุ่นมีค่าลดลงเหลือ 4.60 สำหรับการใช้น้ำตาลทั้งหมดพบว่า *C. shehatae* ใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วใน 48 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้น *C. shehatae* จะใช้น้ำตาลทั้งหมดเรื่อยๆ จนเกือบสมบูรณ์ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือ 1 กรัมต่อลิตรเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 120 ชั่วโมง (รูปที่ 2) ซึ่งอาจเกิดจากการที่ยีสต์ไม่สามารถใช้น้ำตาลทุกชนิดที่มีอยู่ในไฮโดรไลเสทได้ ทั้งนี้การย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดอ่อนนั้นจะเกิดการย่อยโครงสร้างด้วยการตัดพันธะแบบสุ่มซึ่งอาจทำให้เกิดน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ไดแซคคาไรด์ หรือ โมโนแซคคาไรด์บางชนิดที่จุลินทรีย์ไม่สามารถนำมาใช้ได้ (19) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเดี่ยวและเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ไฮโดรไลเสทเป็นแหล่งคาร์บอนโดยวิธี HPLC พบว่าน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักของโมโนแซคคาไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยงโดยมีความเข้มข้นเริ่มต้น 2.71 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบอะราบิโนส 0.9 กรัมต่อลิตรและกลูโคส 0.06 กรัมต่อลิตร ซึ่ง *C. shehatae* สามารถใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาผลรวมของน้ำตาลชนิดโมโนแซคคาไรด์ที่วิเคราะห์พบว่ามีค่า 3.67 กรัมต่อลิตรซึ่งต่ำกว่าน้ำตาลทั้งหมดซึ่งมีค่า 9.35 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ส่วนต่างของน้ำตาลทั้งหมดอาจเป็นโมโนแซคคาไรด์หรือไดแซคคาไรด์ชนิดอื่นที่เกิดจากการย่อยที่ไม่ได้วิเคราะห์ เช่น แมนโนส เป็นต้น (20)

จากผลการเพาะเลี้ยงพบว่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ 1.61 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ต่อน้ำตาลทั้งหมดเป็น 0.20 กรัมต่อกรัมและอัตราผลผลิต 0.013 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้เวลาเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง โดยค่าผลได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Chandel และคณะ (12) ซึ่งใช้ไฮโดรไลเสทจากชานอ้อยมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อใช้เชื้อ *Candida shehatae* NCIM 3501 สามารถผลิตเอทานอลได้ 3.46 กรัมต่อลิตรคิดเป็นผลได้ 0.22 กรัมต่อกรัม แต่อย่างไรก็ตามค่าอัตราผลผลิตในการศึกษานี้ยังคงมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบกับการศึกษาดังกล่าว



รูปที่ 2. การเจริญและการใช้น้ำตาลของชีวมวล *C. shehatae* TISTR 5843 เมื่อเพาะเลี้ยงในไฮโดรไลเสทชานอ้อยสภาวะนิ่ง ที่ 30 องศาเซลเซียส (♦ OD_{600}, ■ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด, ×กลูโคส, ∗ไซโลส ● อะราบิโนส และ ＋ เอทานอล)

4. สรุปผลการทดลอง

ชานอ้อยเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่มีแนวโน้มนำมาใช้ผลิตเอทานอลได้โดยผ่านการย่อยเพื่อให้เกิดน้ำตาลสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ การย่อยด้วยกรดอ่อนเป็นการย่อยส่วนเฮมิเซลลูโลส จากการศึกษานี้พบว่าการย่อยชานอ้อย 1 ครั้งสกัดน้ำตาลออกมาได้เพียงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และยังแสดงอีกว่าการย่อยชานอ้อยซ้ำสามารถสกัดน้ำตาลจากส่วนเฮมิเซลลูโลสออกมาเพิ่มได้อีก โดยน้ำตาลที่สกัดได้ในไฮโดรไลเสทชานอ้อยสามารถนำไปใช้เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตชีวมวลรวมถึงการใช้เพื่อผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *C. shehatae* TISTR 5843 ได้อีกด้วย

5. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป และบางส่วนจากทุนโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. เอกสารอ้างอิง

(1) Haq I-U, Ali S, Iqbal J. Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. Process Biochem. 2003; 38: 921-4.

(2) Huang L P, Jin B, Lant P. Direct fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. Bioprocess Biosyst Eng. 2005; 27: 229-38

(3) Thomsen M H, Guyot J P, Kiel P. Batch fermentations on synthetic mixed sugar and starch medium with amylolytic lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biot. 2007; 74: 540-6

(4) Maas R H W, Springer J, Eggink G, Weusthuis R A. Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L(+)-Lactic acid production. J Ind Microbiol Biotechnol. 2008; 35: 569-78.

(5) Taherzadeh M J, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic waste to improve ethanol and biogas production: A review. Int J Mol Sci. 2008; 9: 1621-51.

(6) Lenihan P, Orozco A, O'Neill E, Ahmad M N M, Rooney DW, Walker G M. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. Chem Eng J. 2010; 156: 395-403.

(7) Kuhad R C, Gupta R, Khasa Y P, Singh A. Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation. Bioresource Technol. 2010; 101: 8348-54.

(8) Oberoi H S, Vadlani P V, O'Neill E, Brijwani K, Bhargav V K, Patil R T. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. Process Biochem. 2010; 45: 1299-1306.

(9) Chen W-H, Lin T-S, Guo G-L, Huang W-S. Ethanol production from rice straw hydrolysate by *Pichia stipitis*. Energy Procedia. 2012; 14: 1261-66.

(10) Lee Y Y, Iyer P, Torget R W. Dilute-Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. Adv Biochem Eng Biotechnol**.** Volume 65, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg; 1999.

(11) Nigam J N. Ethanol production from wheat straw hemicelluloses hydrolysate by *Pichia stipitis*. J Biotechnol. 2001; 87: 17-27

(12) Chandel A K, Kapoor R K, Singh A, Kuhad R C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. Bioresource Technol. 2007; 98 (10): 1947-50

(13) Zhao L, Zhang X, Tan T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. Biomass Bioenerg. 2008; 32: 1156-61.

(14) Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956; 28 (3): 350-6.

(15) Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31 (3): 426-8.

(16) Laopaiboon P, Thani A, Leelavatcharamas V, Laopaiboon L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. Bioresource Technol. 2010; 101: 1036-43.

(17) Arslan Y, Eken-Saraçoğlu N. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol. Bioresource Technol. 2010; 101: 8664-70.

(18) Kim J H, Block D E, Shoemaker S P, Mills D A. Conversion of rice straw to bio-based chemicals: an integrated process using *Lactobacillus brevis*. Appl Microbiol Biot. 2010; 86: 1375-85.

(19) Jeong T-S, Um B-H, Kim J-S, Oh K-K. Optimization dilute-acid pretreatment of rapeseed straw for extraction of hemicellulose. Appl Microbiol Biot. 2010; 161 (1-8): 22-33.

(20) Cho D H, Shin S-J, Bae Y, Park C, Kim Y H. Ethanol production from acid hydrolysate based on the construction and demolition wood waste using *Pichia stipitis*. Bioresource Technol. 2011; 102: 4439-43.