KKU Res J. 2011; 16(8): 919-930
http://resjournal.kku.ac.th

การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในระดับขยายขนาด

Selection of Yeast Strain and Optimum Conditions for Scale-up Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice

ลักขณา เหล่าไพบูลย์[1], กุลเชษฐ์ เพียรทอง[2], วรวุฒิ ศรีดี[1], ประสิทธิ์ ใจศิล[3], มัลลิกา บุญมี[1] และ พัฒนา เหล่าไพบูลย์[1]*

Lakkana Laopaiboon[1], Kulachate Pianthong[2], Worawut Sridee[1], Prasit Jaisil[3], Mallika Boonmee[1] and Pattana Laopaiboon[1]*

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
[3]ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
**Corresponding author: lakcha@kku.ac.th*

Received February 10, 2011
Accepted September 12, 2011

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน พร้อมศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีการฆ่าเชื้อเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เมื่อเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SC90 และ *S. cerevisiae* TISTR5048 ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอ็กแทร็กซ์มอลท์เอ็กแทร็กซ์ (YM) และในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) 15 องศาบริกซ์ พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของยีสต์สองสายพันธุ์ในอาหารทั้ง 2 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกัน เมื่อหมักเอทานอลจากน้ำคั้นปลอดเชื้อที่มีปริมาณ TSS 15, 18 และ 24 องศาบริกซ์ (คิดเป็นน้ำตาลทั้งหมด 130, 162 และ 225 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์หมักในฟลาสก์ป้องกันอากาศเข้าขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ใช้ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้น 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ SC90 มีอัตราการใช้น้ำตาลและอัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์ TISTR5048 ในทุกสภาวะการทดลอง ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์ SC90 ในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นที่มีปริมาณ TSS 15 องศาบริกซ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยแปรผันวิธีการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำคั้น 3 วิธี คือ (1) ใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส 40 นาที (2) ไม่ฆ่าเชื้อ และ (3) เติมเพนนิซิลิน 0.05 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าน้ำคั้นที่ฆ่าเชื้อโดยวิธีที่ (1) ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดในแง่ของความเข้มข้น (P, 60.87 ± 4.58 กรัมต่อลิตร) อัตราผลผลิต (Q_p, 1.27 ± 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และผลได้เอทานอล ($Y_{p/s}$, 0.49 ± 0.00) ในขณะที่เมื่อใช้น้ำคั้นที่เตรียมอีก 2 วิธี ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลลดลง 14 ถึง 17 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับวิธีที่ (1) เมื่อขยายขนาดการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นปลอดเชื้อในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่า P, Q_p และ $Y_{p/s}$ มีค่าใกล้เคียงกับเมื่อหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร

Abstract

This research aims to select yeast strains giving high ethanol production efficiency from sweet sorghum juice as well as to study batch ethanol production under sterile and non-sterile conditions for industrial scale productions. When *Saccharomyces cerevisiae* SC90 and *S. cerevisiae* TISTR5048 were grown in sterile yeast extract malt extract (YM) medium and in sterile juice containing 15 ^{o}Brix of total soluble solid (TSS), the maximum specific growth rates (μ_{max}) of the two strains in both media were not different. The ethanol production from the sterile juice containing 15, 18 and 24 ^{o}Brix of TSS (corresponding to 130, 162 and 225 g/l of total sugar, respectively) by the two yeast strains was further carried out in a 500-ml air-locked flask at 30 ^{o}C, 100 rev/min with the initial yeast cell concentration of 2×10^{7} cells/ml. The results showed that the rates of sugar consumption and ethanol production of SC90 were higher than those of TISTR5048 at all conditions. Therefore, SC90 was selected for the ethanol production from the juice containing 15 ^{o}Brix of TSS in a 2-litre stirred tank bioreactor. Three sterilization methods were tested as follows: (1) autoclave at 110^{o}C 40 min, (2) no sterilization and (3) penicillin addition at 0.05 g/l. The results showed that the juice sterilized by method (1) gave the highest ethanol production efficiencies in terms of ethanol concentration (P, 60.87 ± 4.58 g/l), productivity (Q_p, 1.27 ± 0.10 g/l.h) and yield ($Y_{p/s}$, 0.49 ± 0.00), while the ethanol production efficiencies of using the juices sterilized by other two methods were decreased about 14 to 17 % compared to those of method (1). When the ethanol production from the sterile juice was scaled up in a 50-litre stirred tank bioreactor, P, Q_p and $Y_{p/s}$ were similar to those in the 2-litre stirred tank bioreactor.

คำสำคัญ: ไบโอเอทานอล การขยายขนาด ข้าวฟ่างหวาน *Saccharomyces cerevisiae*

Keywords: bioethanol, scale up, sweet sorghum, *Saccharomyces cerevisiae*

1. บทนำ

เอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกชนิดหนึ่งซึ่งสามารถผลิตได้จากชีวมวล (biomass) โดยกระบวนการหมักของยีสต์หรือแบคทีเรีย ในประเทศไทยวัตถุดิบหลักที่นำมาใช้ผลิตเอทานอล คือ กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง จากแผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี (ปี พ.ศ. 2551-2565) ของประเทศไทยคือ ตั้งเป้าในการเพิ่มผลผลิตเอทานอลเป็น 3, 6.2 และ 9 ล้านลิตรต่อวัน ในปี พ.ศ. 2554, 2559 และ 2565 ตามลำดับ (1) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่กากน้ำตาลและมันสำปะหลังจะมีไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล

ข้าวฟ่างหวาน (*Sorghum bicolor* L. Moench) เป็นธัญพืชชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเสริมในการผลิตเอทานอล (2, 3) เนื่องจากมีข้อได้เปรียบคือ เป็นพืชที่มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี มีช่วงการเจริญเติบโตและการเก็บเกี่ยวสั้นประมาณ 100 ถึง 140 วัน (4) และคุณภาพของน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานมีค่าใกล้เคียงกับน้ำคั้นจากอ้อยคือ ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีธาตุอาหารอื่นๆ ที่สำคัญอีกมากมาย (3) จึงทำให้สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้เป็นอย่างดี

กระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์เกิดขึ้นได้เนื่องจาก ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยผ่านวิถีไกลโคไลซีส โดยทางทฤษฎีน้ำตาลกลูโคสสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 51 เปอร์เซ็นต์ (กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้) และได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีก 49 เปอร์เซ็นต์ (กรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกรัมกลูโคสที่ถูกใช้) โดยความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ขึ้นอยู่กับสารอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม นอกจากนี้การใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล โดยในประเทศไทย *Saccharomyces cerevisiae* SC90 และ TISTR5048 เป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ งานวิจัยนี้จึงเลือกยีสต์ 2 สายพันธุ์นี้มาทดลองหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยทั่วไปการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในระดับห้องปฏิบัติการจะมีการฆ่าเชื้อวัตถุดิบโดยใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 หรือ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองพลังงานค่อนข้างสูงในการฆ่าเชื้อ หากจะนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจึงไม่เหมาะสม การลดพลังงานในการฆ่าเชื้อโดยวิธีอื่นจึงเป็นทางเลือกในการฆ่าเชื้อและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบ

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงจากการใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบ และหาวิธีการเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับขยายขนาด

2. วิธีการวิจัย

2.1 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

S. cerevisiae SC90 (ได้รับความอนุเคราะห์จากองค์การสุรา กรมสรรพสามิต อ. บางคล้า จ. ฉะเชิงเทรา) และ *S. cerevisiae* TISTR5048 (ซื้อจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) ที่เจริญบน yeast extract malt extract (YM) agar slant นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่ประกอบด้วยยีสต์เอ็กแทร็กซ์ 3 กรัมต่อลิตร มอลท์เอ็กแทร็กซ์ 3 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงบนเครื่องบ่มแบบเขย่า (G10 Gyrotory, New Brunswick Scientific Edison, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มจำนวนกล้าเชื้อโดยถ่ายยีสต์ดังกล่าวลงในอาหารเดิมปริมาตร 350 มิลลิลิตร โดยให้ได้จำนวนยีสต์เริ่มต้นประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเอทานอลต่อไป

2.2 การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการหมัก

เก็บเกี่ยวข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 อายุประมาณ 100-120 วัน จากนั้นคั้นน้ำหวานออกจากลำต้นโดยใช้เครื่องหีบ วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ในน้ำคั้นที่ได้จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปบรรจุและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -17 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ และน้ำคั้นอีกส่วนหนึ่งนำไปเคี่ยวที่อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส โดยเคี่ยวให้ได้ค่า TSS ประมาณ 75 องศาบริกซ์ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองที่ใช้น้ำคั้นที่มีปริมาณ TSS 18 และ 24 องศาบริกซ์ โดยเจือจางน้ำคั้นเข้มข้นที่ได้ให้มีปริมาณ TSS ตามที่ต้องการ

การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อ ทำโดยฆ่าเชื้อน้ำคั้นโดยใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (UM-65 L VA, United Mechanical, ประเทศไทย) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 15 หรือ 40 นาที เมื่อฆ่าเชื้อน้ำคั้นในฟลาสก์ที่ป้องกันอากาศเข้าหรือฟลาสก์แอร์ล๊อค (air-lock flask) ขนาด 500มิลลิลิตร หรือในถังหมักขนาด 2 ลิตร ตามลำดับ

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การหาอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในอาหาร YM และในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน

เติมกล้าเชื้อยีสต์ในข้อที่ 2.1 ลงในอาหาร YM ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อที่มีปริมาณ TSS 15 องศาบริกซ์ ปริมาตร 350 มิลลิลิตร โดยให้มีจำนวนยีสต์เริ่มต้นประมาณ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงยีสต์ในสภาวะดังข้อที่ 2.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต จากนั้นคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ 2 สายพันธุ์ ในอาหารทั้ง 2 ชนิด

2.3.2 การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่างๆ

เตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อ (350 มิลลิลิตร) ที่มีปริมาณ TSS 15, 18 และ 24 องศาบริกซ์ โดยเตรียมในฟลาสก์แอร์ล๊อคขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อโดยใช้ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.1 (เลือกใช้อาหารที่ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด) โดยเติมกล้าเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นในน้ำหมักประมาณ 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญในระหว่างการหมัก จากนั้นคำนวณและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของยีสต์ 2 สายพันธุ์ ที่สภาวะต่างๆ

2.3.3 การผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ฆ่าเชื้อโดยวิธีต่างๆ

แปรผันวิธีการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน 3 วิธี ดังนี้ วิธีที่ 1: การใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส 40 นาที (ชุดควบคุม) วิธีที่ 2: ไม่มีการฆ่าเชื้อ และวิธีที่ 3: การเติมเพนนิซินลิน (penicillin) 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร (5) โดยใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณ TSS 15 องศาบริกซ์ จากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์โดยใช้สายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดจากการทดลองที่ 2.3.2 โดยหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร (Biostat B2 S/N 4507, ประเทศเยอรมนี) ปริมาตรน้ำหมัก 1.5 ลิตร อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญในระหว่างการหมัก

2.3.4 การศึกษาการขยายขนาดการหมักเอทานอล

ศึกษาการผลิตเอทานอลในระดับขยายขนาดโดยใช้สภาวะการฆ่าเชื้อที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดจากการทดลองที่ 2.3.3 โดยหมักในถังหมักขนาด 50 ลิตร ปริมาตรน้ำหมัก 35 ลิตร อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญในระหว่างการหมัก

2.3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญในระหว่างการหมักและการหาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด หรือ TSS โดยใช้ Hand-held refractometer (Atago, ประเทศญี่ปุ่น) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (6) ปริมาณเอทานอล โดย Gas chromatography (2) พีเอชวัดโดยเครื่องพีเอชมิเตอร์ ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตในน้ำหมักโดยย้อมเซลล์ยีสต์ด้วยเมทิลลีนบลู และนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Heamacytometer (7) และจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียผลิตกรดที่ปนเปื้อนในน้ำหมัก โดยวิธี Total viable plate count บนอาหาร nutrient agar และ MRS agar ตามลำดับ (8)

คำนวณความเข้มข้น (concentration, P) ผลได้ (yield, $Y_{p/s}$) และอัตราผลผลิต (productivity, Q_p) ของเอทานอล (2) โดย

$Y_{p/s} = P / (S_0 - S_t)$ และ $Q_p = P / t$

เมื่อ S_0 และ S_t คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เวลา 0 และเวลา t ชั่วโมง ตามลำดับ และ t คือเวลาของการหมักที่ได้เอทานอลสูงสุด

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

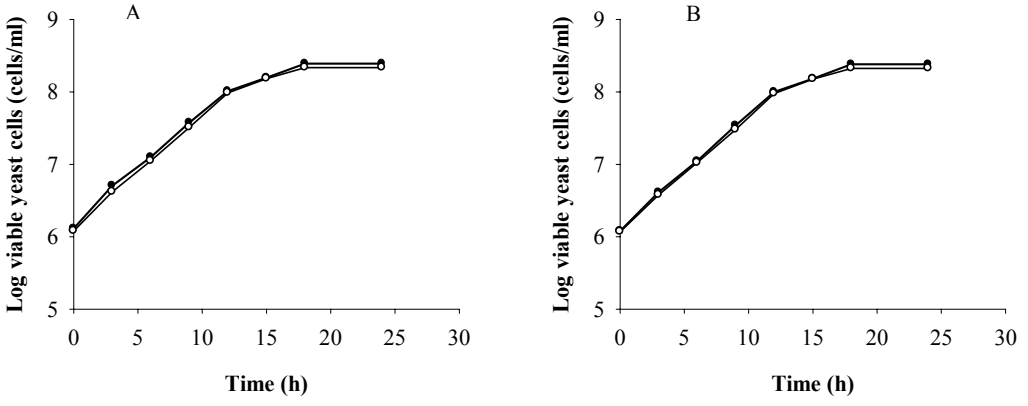
3.1 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในอาหาร YM และในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน

รูปที่ 1 แสดงการเจริญของยีสต์ SC90 และ TISTR5048 ในอาหาร YM (กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร) และในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน (TSS 15 องศาบริกซ์) ซึ่งพบว่าจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในอาหารทั้ง 2 ชนิด เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และคงที่ที่ 18 ชั่วโมง และตารางที่ 1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของยีสต์ 2 สายพันธุ์ โดยพบว่า μ_{max} ของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารทั้งสองชนิดมีค่าไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้ยังแสดงให้เห็นว่ายีสต์สามารถใช้น้ำตาลจากทั้งสองแหล่งได้ดีในอัตราที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน (TSS 15 องศาบริกซ์) แทนการใช้อาหาร YM

3.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล

ปริมาณ TSS ของน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่หีบได้ในการทดลองนี้มีค่า 15 องศาบริกซ์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปกติ (ปกติมีค่า TSS ประมาณ 18 องศาบริกซ์) เนื่องจากมีฝนตกก่อนเก็บเกี่ยว ในการทดลองนี้จึงใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณ TSS 15, 18 และ 24 องศาบริกซ์ ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 130, 162 และ 225 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

รูปที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล

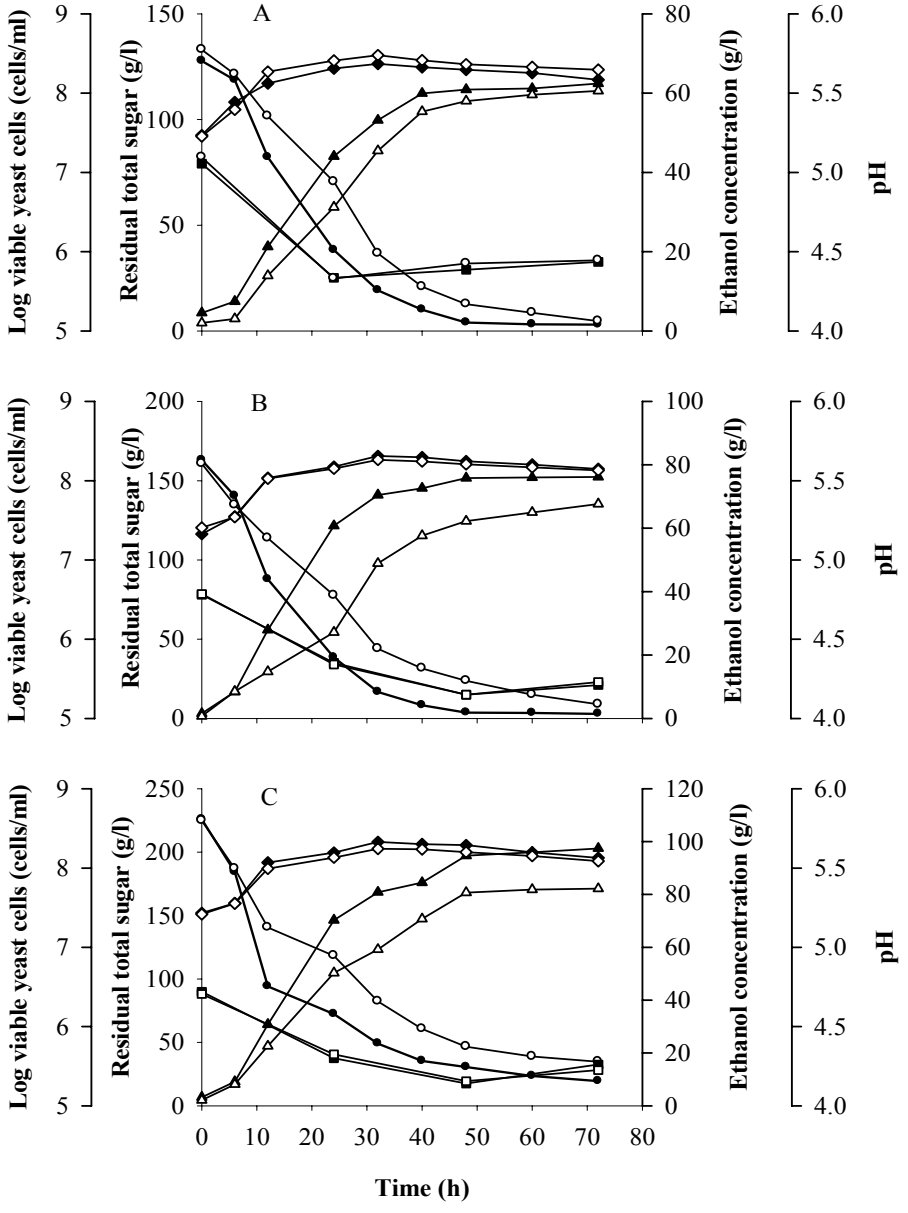


รูปที่ 1. การเจริญของ *S. cerevisiae* SC90 (●) และ TISTR5048 (○) ในอาหาร YM ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร (A) และในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณ TSS 15 องศาบริกซ์ (B)

ตารางที่ 1. อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ของยีสต์สายพันธุ์ SC90 และ TISTR5048 ในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน (TSS 15 องศาบริกซ์) และในอาหาร YM (กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร)

สายพันธุ์ยีสต์	μ_{max} (ต่อชั่วโมง)	
	น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน	อาหาร YM
SC90	0.37 ± 0.00	0.36 ± 0.00
TISTR5048	0.36 ± 0.00	0.36 ± 0.00

การผลิตเอทานอล จำนวนเซลล์ยีสต์ และพีเอช ของการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณ TSS ต่างๆ โดยยีสต์ SC90 และ TISTR5048 ซึ่งพบว่า อัตราการใช้น้ำตาล และอัตราการผลิตเอทานอล ของยีสต์ SC90 มีค่าสูงกว่ายีสต์ TISTR5048 ที่ทุกๆ ความเข้มข้นของ



รูปที่ 2. ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต เอทานอล และพีเอช ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 15 (A) 18 (B) และ 24 (C) องศาบริกซ์ โดย *S. cerevisiae* SC90 (สัญลักษณ์ทึบ) และ *S. cerevisiae* TISTR5048 (สัญลักษณ์โปร่ง) (น้ำตาล = ●, ○; จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต = ◆,◇; เอทานอล = ▲, △ และพีเอช = ■, □)

น้ำตาลเมื่อเปรียบเทียบการทดลองในสภาวะเดียวกัน ในขณะที่เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตทั้งหมดของยีสต์ 2 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากใน 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นอัตราการเจริญของยีสต์ลดลงโดยเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงชั่วโมงที่ 30 หลังจากนั้นปริมาณเซลล์ยีสต์ค่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดการหมัก โดยการเปลี่ยนแปลงนี้คล้ายคลึงกันที่ทุกสภาวะการทดลอง แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในช่วง 130 ถึง 225 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของ pH มีค่าไม่แตกต่างกันที่ทุกสภาวะการทดลอง

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีค่า TSS ต่างๆ โดยยีสต์ SC90 และ TISTR5048 พบว่าค่า P มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณน้ำตาลในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมีค่าสูงขึ้น (ในช่วง 130 ถึง 225 กรัมต่อลิตร) การผลิตเอทานอลโดยยีสต์ SC90 ให้ค่า P และ Q_p สูงกว่าเมื่อใช้ยีสต์ TISTR5048 ในทุกสภาวะการทดลอง ส่วนค่า $Y_{p/s}$ ของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อใช้น้ำคั้นที่มี TSS เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ มีค่าไม่แตกต่างกัน (อยู่ในช่วง 0.49 ถึง 0.50) ในขณะที่เมื่อปริมาณ TSS เริ่มต้นในน้ำคั้นเพิ่มขึ้นเป็น 18 และ 24 องศาบริกซ์ ค่า $Y_{p/s}$ ของยีสต์ TISTR5048 มีค่าลดลงเหลือเพียง 0.45 ส่วน $Y_{p/s}$ ของยีสต์ SC90 ที่ความเข้มข้น TSS ต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกัน ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีน้ำตาลสูงขึ้น TISTR5048 มีการสร้างผลพลอยได้ (byproducts) เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีสต์ SC90 ในการทดลองต่อไป

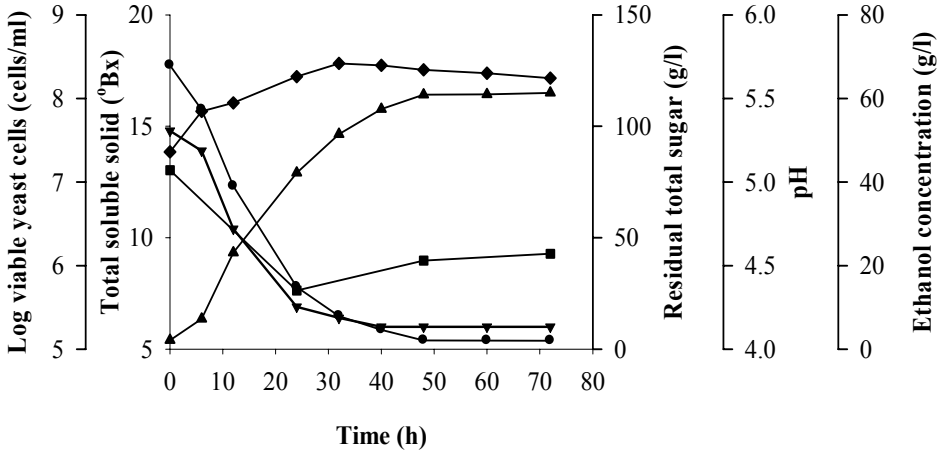
3.3 การผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ฆ่าเชื้อโดยวิธีต่างๆ

การทดลองนี้ทำเพื่อจะนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม โดยการฆ่าเชื้อด้วยการใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส 40 นาที จะใช้เป็นชุดควบคุม เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆ ของน้ำหมักในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ปลอดเชื้อ (ชุดควบคุม) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยยีสต์ SC90 ผลการทดลองพบว่าปริมาณ TSS และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลงและเริ่มคงที่ที่ 48 ชั่วโมง โดยมีน้ำตาลทั้งหมดเหลือประมาณ 4 กรัมต่อลิตร สำหรับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดที่ 32 ชั่วโมง จากนั้นมีค่าลดลงเล็กน้อย พีเอชเริ่มต้นมีค่าประมาณ 5.0 และลดลงจนถึงที่ 24 ชั่วโมง พี

ตารางที่ 2. ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ต่างๆ โดย *S. cerevisiae* SC90 และ TISTR5048

TSS (องศาบริกซ์)	สายพันธุ์ยีสต์	P* (กรัมต่อลิตร)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	Q_p (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	t (ชั่วโมง)
15	SC90	59.00 ± 0.02	0.50 ± 0.01	1.48 ± 0.00	40
	TISTR5048	55.35 ± 0.92	0.49 ± 0.02	1.38 ± 0.02	40
18	SC90	75.83 ± 0.21	0.48 ± 0.00	1.58 ± 0.00	48
	TISTR5048	62.23 ± 0.31	0.45 ± 0.00	1.30 ± 0.01	48
24	SC90	94.67 ± 0.28	0.48 ± 0.01	1.97 ± 0.01	48
	TISTR5048	80.67 ± 0.57	0.45 ± 0.00	1.68 ± 0.01	48

* P = ความเข้มข้นเอทานอล, $Y_{p/s}$ = ผลได้, Q_P = อัตราผลผลิตเอทานอล และ t = เวลา



รูปที่ 3. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 40 นาที โดย *S. cervisiae* SC90 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (ชุดควบคุม) (▼ = ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด, ● = น้ำตาลทั้งหมด, ◆ = จำนวนเซลล์ยีสต์, ■ = พีเอช และ ▲ = เอทานอล)

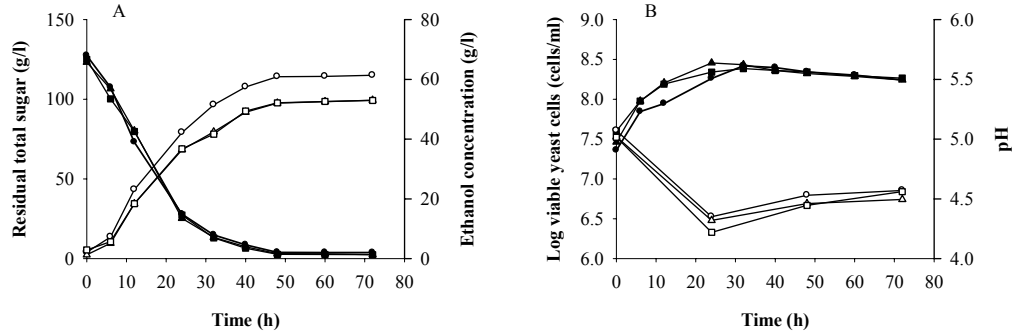
เอชมีค่า 4.3 การที่พีเอชมีค่าลดลงเนื่องจากยีสต์ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการหมัก และคาร์บอนไดออกไซด์สามารถละลายในน้ำหมักกลายเป็นกรดคาร์บอนนิก (9) หลังจากชั่วโมงที่ 24 พีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนเอทานอลมีค่าเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ที่ 48 ชั่วโมง โดยมีค่าประมาณ 61 กรัมต่อลิตร

สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และฆ่าเชื้อโดยการเติมเพนนิซิลิน พบว่ามีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบที่สำคัญต่างๆ คล้ายกับในชุดควบคุม โดยการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และเอทานอลในน้ำหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4A และการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต และพีเอช แสดงดังรูปที่ 4B ซึ่งพบว่า ระยะเวลาการหมักที่ให้เอทานอลสูงสุดของทุกสภาวะคือ 48 ชั่วโมง การใช้น้ำคั้นที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ และการเติมเพนนิซิลินให้ความเข้มข้นเอทานอลไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าต่ำกว่าเอทานอลของชุดควบคุม ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต และพีเอชมีค่าใกล้เคียงกัน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำหมัก และใช้น้ำตาลในการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์อื่น

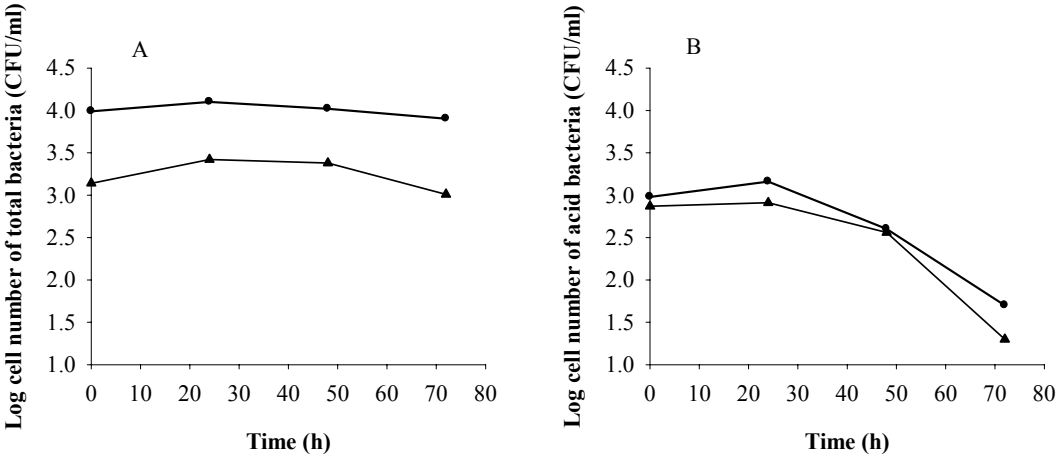
เมื่อตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำหมักในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และใช้การฆ่าเชื้อโดยการเติมเพนนิซิลิน พบว่าจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมดในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่าประมาณ log 4.0 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 5A) และสูงกว่าจำนวนแบคทีเรียในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่เติมเพนนิซิลินประมาณ 1 log scale โดยจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดการทดลอง การตรวจพบแบคทีเรียในน้ำหมักที่เตรียมได้จาก 2 วิธีดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลได้ ส่งผลให้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ SC90 ผลิตได้โดย 2 วิธีนี้ต่ำกว่าวิธีการเตรียมน้ำหมักโดยการฆ่าเชื้อแบบปลอดเชื้อ ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียผลิตกรดในน้ำหมักที่ตรวจพบในอาหาร MRS agar พบว่าน้ำหมักที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และการเติมเพนนิซิลินมีจำนวนแบคทีเรียผลิตกรดในตอนเริ่มต้นใกล้เคียงกัน ประมาณ log 3 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียผลิตกรดที่ปนเปื้อนมีค่าลดลงเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการหมัก (รูปที่ 5B) การที่จำนวนแบคทีเรียผลิตกรดใน

น้ำหมักมีค่าลดลงอาจเนื่องจากในระหว่างการหมักเอทานอลมีปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงมากไม่ได้ (7)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ เนื่องจากความเข้มข้นเอทานอลและองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำหมักในทุกๆ สภาวะเริ่มคงที่ที่ 48 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก โดยพบว่าชุดควบคุมหรือการใช้น้ำหมักปลอดเชื้อในการผลิตเอทานอลให้ค่า P, $Y_{p/s}$ และ Q_p สูงสุด คือมีค่า 60.87 กรัมต่อลิตร 0.49 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ และ 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้น้ำหมักที่ฆ่าเชื้ออีก 2 วิธี พบว่าให้ค่าประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลต่ำกว่าชุดควบคุมประมาณ 14 ถึง 17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาค่าผลได้ของการผลิตเอทา



รูปที่ 4. ความเข้มข้นน้ำตาล เอทานอล (A) จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต และพีเอช (B) ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ (ความเข้มข้นน้ำตาล และจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต: ชุดควบคุม = ●, ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ = ▲ และเติมเพนนิซิลิน = ■) (การผลิตเอทานอล และพีเอช: ชุดควบคุม = ○, ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ = △ และเติมเพนนิซิลิน = □)



รูปที่ 5. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (A) และจำนวนแบคทีเรียผลิตกรด (B) ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (●) และการฆ่าเชื้อโดยการเติมเพนนิซิลิน (▲)

ตารางที่ 3. ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ฆ่าเชื้อโดยวิธีต่างๆ โดย *S. cerevisiae* SC90 ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

วิธีการฆ่าเชื้อ	P * (กรัมต่อลิตร)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	Q_p (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ 110 องศาเซลเซียส 40 นาที	60.87 ± 4.58	0.49 ± 0.00	1.27 ± 0.10
ไม่มีการฆ่าเชื้อ	52.03 ± 0.16	0.43 ± 0.02	1.08 ± 0.00
เติมเพนนิซิลิน 0.05 กรัมต่อลิตร	52.13 ± 4.33	0.43 ± 0.01	1.09 ± 0.09

* P = ความเข้มข้นเอทานอล, $Y_{p/s}$ = ผลได้ และ Q_P = อัตราผลผลิตเอทานอล

นอลหรือ $Y_{p/s}$ พบว่าวิธีการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำให้ผลได้สูงกว่าอีก 2 ชุดการทดลอง ซึ่งอาจเป็นเพราะมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียดังได้กล่าวไปแล้ว ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำหมักปลอดเชื้อในการทดลองผลิตเอทานอลในระดับขยายขนาดต่อไป

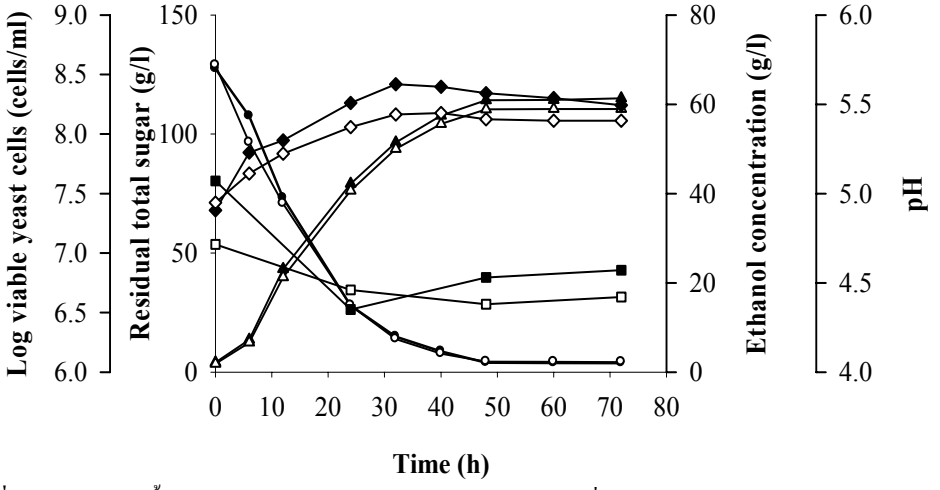
3.4 การหมักเอทานอลแบบกะในระดับขยายขนาด

จากการทดลองที่ 3.3 น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุด อย่างไรก็ตามในการฆ่าเชื้อในถังหมักขนาด 50 ลิตร ที่มีในห้องปฏิบัติการ มีข้อจำกัดคือสามารถใช้อุณหภูมิสูงสุดในการฆ่าเชื้อได้เพียง 90 องศาเซลเซียส และไม่สามารถควบคุมความดันได้ ดังนั้นการหมักในถังหมักขนาด 50 ลิตร จึงฆ่าเชื้อน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยเมื่อตรวจวัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำคั้นหลังฆ่าเชื้อ (ก่อนการหมักเอทานอล) พบว่าไม่พบแบคทีเรียปนเปื้อน เนื่องจากเวลาในการให้ความร้อน (heating time) ในการฆ่าเชื้อน้ำหมัก และเวลาในการทำให้น้ำหมักเย็นลง (cooling time) ในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร ใช้เวลานานกว่าในระบบการฆ่าเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ดังนั้นจึงใช้เวลาในการฆ่าเชื้อ (holding time) น้ำหมักในถังหมัก 50 ลิตรเพียง 30 นาที เพราะการใช้เวลาฆ่าเชื้อนานเกินไปจะทำให้สูญเสียสารอาหารที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เอทานอล จำนวนเซลล์ยีสต์ และพีเอช ของน้ำหมักในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในถังหมักขนาด 50 ลิตร แสดงดังรูปที่ 6 ผลการทดลองพบว่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ คล้ายกับเมื่อหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นในทั้ง 2 สภาวะมีค่าไม่แตกต่างกัน หลังจากนั้นเซลล์ยีสต์ในถังหมักขนาด 2 ลิตรมีค่าสูงกว่าในถังหมักขนาด 50 ลิตรเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม อัตราการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลในระหว่างการหมักในถังหมักทั้ง 2 ขนาดมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อคำนวณค่า P, $Y_{p/s}$ และ Q_p ของการหมักในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่า มีค่าใกล้เคียงกับเมื่อหมักในถังหมักขนาด 2 ลิตร คือ มีค่าเป็น 58.87 ± 0.22 กรัมต่อลิตร 0.47 ± 0.001 กรัมต่อกรัม และ 1.23 ± 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าขนาดของถังหมัก 50 ลิตร ที่ใช้ในการทดลองนี้ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลใกล้เคียงกับถังหมักขนาด 2 ลิตร

4. สรุป

น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานสามารถนำมาใช้ผลิตเอทานอลได้ดีโดยไม่ต้องเติมสารอาหารเสริม *S. cerevisiae* SC90 เหมาะสมต่อการนำมาใช้ผลิต



รูปที่ 6. ความเข้มข้นน้ำตาล (●,○) เอทานอล (▲,△) จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (◆,◇) และพีเอช (■,□) ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร (สัญลักษณ์ทึบ) และ 50 ลิตร (สัญลักษณ์โปร่ง)

เอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมากกว่า *S. cerevisiae* TISTR5048 ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในแง่ของความเข้มข้นและอัตราผลผลิต ซึ่งในการทดลองนี้ TSS ที่เหมาะสมคือ 24 องศาบริกซ์ การใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ปลอดเชื้อให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุด และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 และ 50 ลิตร มีค่าไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ และใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สำนักพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพ กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (พพ.) กระทรวงพลังงาน และศูนย์วิจัยและบริการด้านพลังงาน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบคุณองค์การสุรา กรมสรรพสามิต อ. บางคล้า จ.ฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 และขอขอบคุณศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (FerVAAP) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุและอุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้

6. เอกสารอ้างอิง

(1) Silalertruksa T, Gheewala SH. Security of feedstocks supply for future bio-ethanol production in Thailand. Energ Policy. 2010; 38: 7476-86.

(2) Laopaiboon L, Thanonkeo P, Jaisil P, Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5048. World J Microbiol Biotechnol. 2007; 23: 1497-501.

(3) Laopaiboon L, Nuanpeng S,Srinophakum P, Klanrit P, Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and

nitrogen supplementations. Bioresour Technol. 2009; 100: 4176-82.

(4) Jaisil P, Putto C. Analysis of feed stocks for ethanol production in Thailand. Alternative Energy. 2010; 5: 30-4. Thai.

(5) Aquarone E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. Appl Microbiol. 1960; 8: 263-8.

(6) Mecozzi M. Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration. Chemom Intell Lab Syst. 2005; 79: 84-90.

(7) Zoecklien BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS. Laboratory procedures. In: Wine analysis and production. New York, Chapman & Hall; 1995.

(8) Ison AP, Matthew GB. Measurement of biomass. In: Rhodes PM, Stanbury PF, editors. Applied microbial physio-logy: A practical approach. New York, Oxford University Press; 1997.

(9) Shen HY, Schrijver SD, Moonjai N, Verstrepen KJ, Delvaux F, Delvaux FR. Effects of CO_2 on the formation of flavor volatiles during fermentation with immobilized brewer's yeast. Appl Microbiol Biotechnol. 2004; 64: 636-43.