

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer

วิธีการ

- 1) ใช้ผ้าสะอาดนุ่มชุบน้ำ ทำความสะอาดปริซึมของเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์และเช็ดให้แห้ง
- 2) หยดน้ำกลั่นลงบนปริซึม 1-2 หยด ปิดฝาครอบเพื่อให้น้ำกลั่นกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นมองผ่านเลนส์ตา และปรับตัวเลขให้เป็น “0” เมื่อปรับแล้วให้ทำความสะอาดปริซึมอีกครั้ง
- 3) ใช้หลอดดูดตัวอย่างที่ต้องการวัดแล้วหยดลงบนปริซึม 1-2 หยด
- 4) ปิดฝาครอบเพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เพราะจะมีผลทำให้ค่าที่อ่านได้ผิดไป
- 5) มองเลนส์ตา และอ่านค่าที่ระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นสีฟ้า ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (จำนวนกรัมของสารที่ละลายได้ ต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง)
- 6) ใช้กระดาษเช็ดเลนส์เช็ดตัวอย่างที่ติดอยู่กับปริซึมออก แล้วทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง

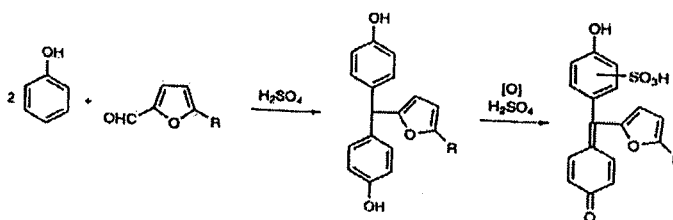
ภาคผนวกที่ 2 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลช่วง 1 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิคัล น้ำตาลอนรีดิคัล หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาน้ำตาลได้ด้วยวิธีนี้

2.1 หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

น้ำตาล mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ทำปฏิกิริยากับฟีนอล และกรดซัลฟูริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสารที่มีสี สามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยา เชื่อว่า ในกรณีน้ำตาล oligo- และ polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้น ก็เกิดปฏิกิริยา

การจัดน้ำออกที่แทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ที่จะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triarylmethane dyes)



รูปที่ ๑. 1 ปฏิกริยาระหว่างฟีนอลและคาร์โบไฮเดรต (ฟรุคโตส) ในการดัดฟริกเข้มข้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสีส้มของสาร triarylmethane dyes (Scherz and Bonn, 1998)

2.2 สารเคมี

- สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมได้โดยละลายผลึกของฟีนอล 25.0 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
- กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2.3 วิธีวิเคราะห์

- 1) ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำสารไร้ตัวอย่าง (blank) ด้วย โดยการใช้ น้ำกลั่น ปริมาตรเท่ากันแทนตัวอย่าง
- 2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างผสมให้เข้ากัน
- 3) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมข้อ 2) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรง ๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำ จะร้อนเค็ด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที
- 4) นำชุดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง

2.4 การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสง (OD}_{490}\text{)} \times \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \frac{1}{\text{การเจือจาง}}$$

โดย ความชัน = ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

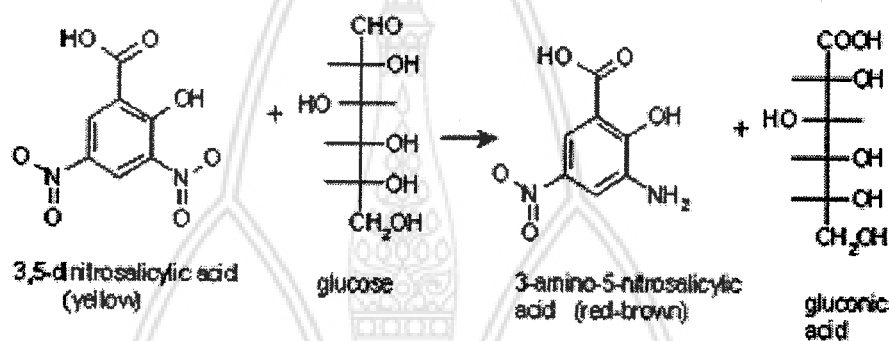
และการเจือจาง = ค่าเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ภาคผนวกที่ 3 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลพวก Reducing sugar ในช่วงระหว่าง 5-500 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.1 หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

การต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายต่างที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนรูปไปเป็นสารที่มีสีเข้มขึ้น ซึ่งมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสงช่วง 500-550 นาโนเมตร ปฏิกิริยานี้จะไม่หยุดจนกว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์หมด เชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเป็นสีของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid



รูปที่ ๓. ๒ ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และสาร 3,5- dinitrosalicylic acid ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเข้มของ 3- amino-5- nitrosalicylic acid (ที่มา : <http://biochem.ncsu.edu/faculty>)

3.2 สารเคมี

- 1) 2 N NaOH 50 มิลลิลิตร (เตรียมโดย ละลาย 4 กรัม NaOH ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร)
- 2) DNS solution เตรียมโดยละลาย 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ลงใน 50 มิลลิลิตรของ 2 N NaOH เติม Sodium potassium tartrate (Rochelle salt) 70.55 กรัม และคนจนละลายหมดเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง จะสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายอาทิตย์

3.3 วิธีวิเคราะห์

- 1) ดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง สำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) ใช้น้ำกลั่น
- 2) เติม DNS solution 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3) ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที
- 4) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว

5) เติมน้ำลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

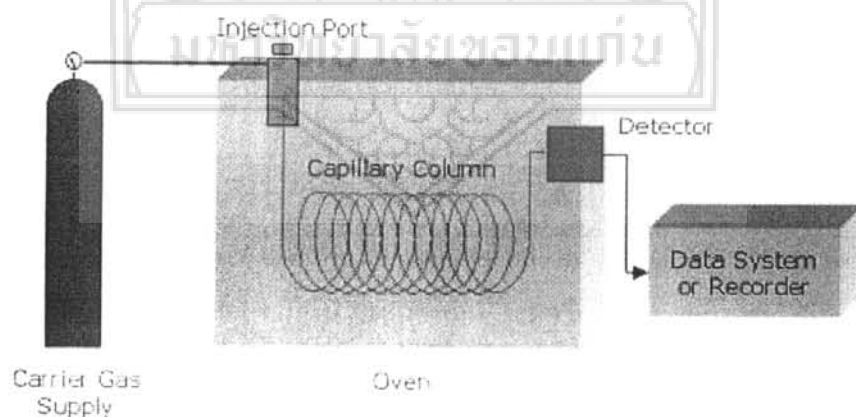
6) นำชุดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง

ภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography)

4.1 หลักการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นมักจะวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ ที่สามารถดูดซับเอทานอลหรือแอลกอฮอล์อื่น ๆ ได้ ภายใต้อุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สพาหะ (ในโตรเจน) ที่เหมาะสม ความคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 150 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สพาหะ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

สารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ด้วยไมโครไซริง (micro syringe) อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างจะระเหยกลายเป็นไอทันที และถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ (รูปที่ ก. 3) ซึ่งในคอลัมน์นี้แอลกอฮอล์จะถูกแยกออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ เมื่อไอระเหยออกจากคอลัมน์จะเข้าสู่เครื่องตรวจวัด จากนั้นเครื่องตรวจวัดจะส่งสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกข้อมูล ซึ่งแสดงข้อมูลที่ได้ออกมาเป็นพีค (peak) โดยพื้นที่ใต้พีคนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอทานอลในสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป



รูปที่ ก. 3 Gas chromatography ในการวิเคราะห์หาเอทานอล (ที่มา : www.depts.washington.edu)

เนื่องจากการยากที่จะนิตสารตัวอย่างปริมาณน้อย ๆ ได้ถูกต้องและแม่นยำ และพื้นที่ที่ได้ฟิคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรที่นิตเข้าไปด้วย ดังนั้น จึงมักมีการผสมสารมาตรฐาน (internal standard) ลงไปในตัวอย่างด้วย เมื่อสารมาตรฐานที่เติมลงไปมีความเข้มข้นคงที่และเท่ากันทุกตัวอย่าง ดังนั้นการหาความเข้มข้นของเอทานอลจะใช้อัตราส่วนของพื้นที่ที่ได้ฟิคของเอทานอล และสารละลายมาตรฐาน ด้วยวิธีการนี้การวิเคราะห์จึงไม่ขึ้นกับปริมาตรของสารตัวอย่างที่นิตเข้าไป

1. วิธีการวิเคราะห์

- 1) นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 rpm เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล
- 2) นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้มา 200 ไมโครลิตร เติม n-propanol ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน (internal standard) ลงไปด้วยปริมาตรที่แน่นอน 200 ไมโครลิตร
- 3) นิตสารตัวอย่างที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี
- 4) หลังจากนิตตัวอย่างเข้าไปแล้วประมาณ 15 นาที เครื่องอินทิเกรเตอร์ (integrator) แสดงฟิคของเอทานอล ออกมาก่อนตามด้วยฟิคของ n-propanol โดยเวลาชะ (retention time) ของเอทานอล และ n-propanol มีค่าประมาณ 5.5 และ 10.7 นาที ตามลำดับ เครื่องอินทิเกรเตอร์จะคำนวณพื้นที่ใต้ฟิคออกมาให้โดยอัตโนมัติ จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้ฟิคของเอทานอลต่อ n-propanol แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
- 5) ในแต่ละตัวอย่างทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นเอทานอล
- 6) ก่อนจะนิตตัวอย่างต่อไปควรรอประมาณ 15 นาที หลังจากฟิคที่สองออกมาแล้ว เพื่อเป็นการไล่สารที่อาจตกค้างอยู่ในคอลัมน์ออกให้หมด

ภาคผนวกที่ 5 การนับจำนวนยีสต์ที่มีชีวิตโดยวิธี Direct count method with methylene blue staining

5.1 หลักการ

วิธีนี้ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้อุปกรณ์ช่วยนับที่เรียกว่า Haemocytometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการนับเม็ดเลือด แต่นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ยีสต์และสปอร์ของเชื้อรา เมื่อนำ Haemocytometer มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และให้ปรับโฟกัสลงบนช่องที่ทำไว้เป็นตาราง (Grid lines) ด้วยกำลังขยายต่ำ พบว่าเป็นสไลด์ที่มีช่องแบ่งไว้แน่นอนและมีขอบยกสูงจากบริเวณซิด เวลาใช้ต้องปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover glass) ที่เฉพาะ ขอบของ chamber จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้และทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกสไลด์ในบริเวณที่มีซิดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิเมตร ตามรูปที่ ก. 4 แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ซิดแบ่งที่กำหนดไว้จะประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจตุรัส

ใหญ่ตรงกลางที่ประกอบด้วย 25 ช่องจัดรูปตามรูปที่ ภ. 5 แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร และในแต่ละช่องนี้จะแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก ๆ อีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ นี้จะมีปริมาตร $= 0.05 \times 0.05 \times 0.1 = 0.00025$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ถ้า Chamber มีความลึก 0.1 มิลลิเมตร) กระจกปิดสไลด์ที่ใช้ที่นี่มีความจำเพาะไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่น เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องระหว่างสไลด์ กับ chamber ผิดไป เพื่อความถูกต้องและแม่นยำตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ควรเจือจางในระดับที่สามารถตรวจนับจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็กได้ในช่วง 1-10 เซลล์

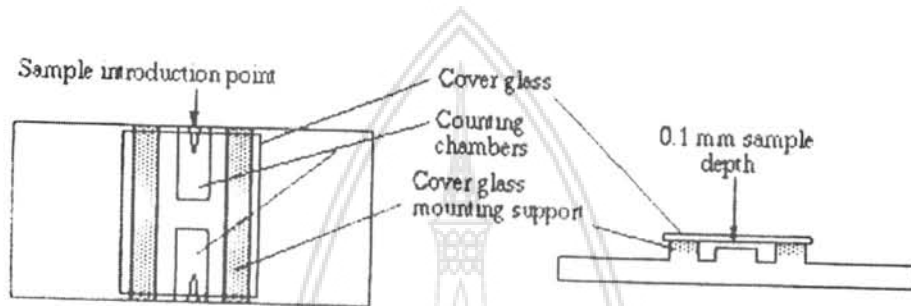
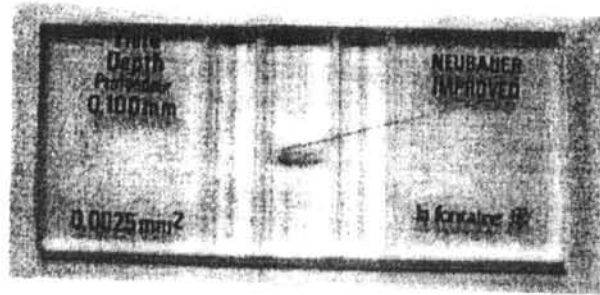
หลักการของวิธีนี้คือ เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสี methylene blue ได้ ในขณะที่เซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วจะไม่มีเอนไซม์นี้ หลังจากที่ย้อมเซลล์ยีสต์ด้วย methylene blue แล้ว สีจะแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว เฉพาะเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่สามารถจะรีดิวซ์สีน้ำเงินของ methylene blue ให้กลายเป็นไม่มีสี ดังนั้นเมื่อนาสไลด์ที่ย้อมด้วย methylene blue มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ยีสต์ที่ตายจะมีสีน้ำเงินส่วนเซลล์ยีสต์ที่ยังมีชีวิตจะไม่มีสี

5.2 วัสดุและอุปกรณ์

- 1) Haemocytometer ที่มีความลึก 0.100 มิลลิเมตร พร้อมกระจกปิด
- 2) Pasteur pipette
- 3) ตัวอย่างยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้สารละลาย methylene blue ผสมใน diluent หลอดสุดท้ายของการทำ serial dilution

5.3 วิธีการทดลอง

- 1) ล้างเครื่องมือให้สะอาด เช็ดให้แห้ง
- 2) ปิดทับบริเวณกลางของ Hemacytometer ด้วยกระจกปิดสไลด์
- 3) ใช้ pasteur pipette ปิเปตดูดตัวอย่าง แล้วแตะปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องระหว่างสไลด์และกระจกปิดสไลด์ให้ตัวอย่างซึมเข้าไปในบริเวณช่องใต้กระจกปิดสไลด์
- 4) ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 10X เพื่อโฟกัสให้เห็น grid line และช่องตรงกลาง (25 ช่อง)
- 5) ตรวจนับจำนวนยีสต์ที่มีชีวิตโดยใช้กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 40X



รูปที่ ๓. 4 (ก) แสดง Haemocytometer และ (ข) แสดงลักษณะของ chamber ด้านตรงและด้านข้าง รวมทั้งการวางกระจกปิดสไลด์บน chamber

5.4 การคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ (ปริมาตรของช่องใหญ่)

รวมจำนวนที่นับได้จากช่องใหญ่แต่ละช่องหารด้วยจำนวนช่องที่นับทั้งหมด (อย่างน้อย 5 ช่อง) จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ต่อหนึ่งช่องใหญ่ เช่น ได้ Y เซลล์ต่อช่องใหญ่

คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อหนึ่งมิลลิลิตรได้ดังนี้

ตัวอย่าง 0.004 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ไมโครลิตร) มีจุลินทรีย์ = Y เซลล์
(ปริมาตรของแต่ละช่องใหญ่)

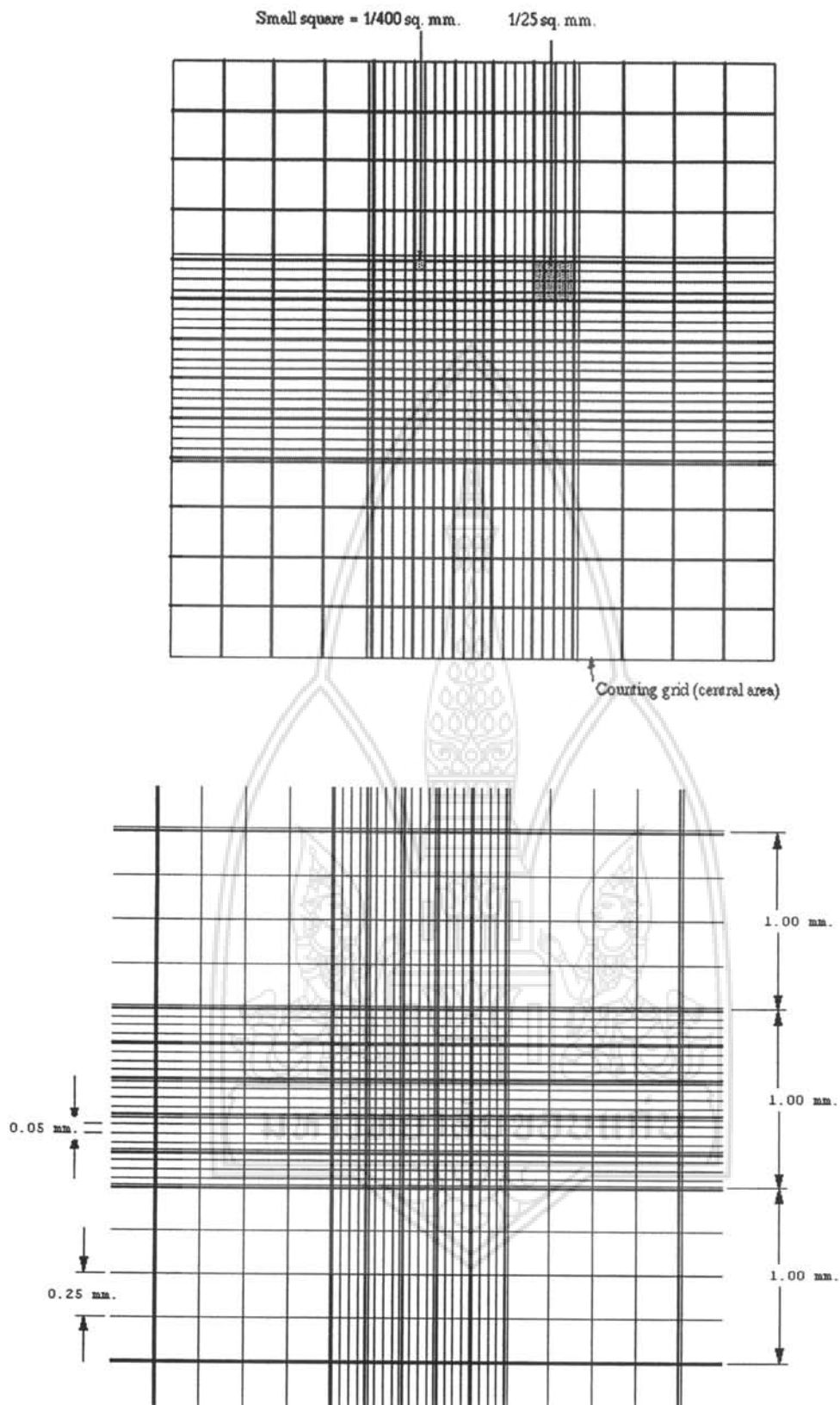
ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (1,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร) มีจุลินทรีย์ = $\frac{(Y)(10^3)}{0.004}$ เซลล์

$$= 2.5 (Y) \times 10^5 \text{ เซลล์}$$

ถ้าตัวอย่างที่นำมาใช้นับจำนวนเซลล์มีการทำการเจือจาง เพราะฉะนั้นจะได้

$$\text{จำนวนเซลล์ / มิลลิลิตร} = (Y) \times 2.5 \times 10^5 \times \text{dilution factor}$$

เมื่อ Y คือ จำนวนสปอร์หรือเซลล์ที่นับได้ต่อ 1 ช่องใหญ่



รูปที่ ๕ แสดงตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์บน Haemacytometer

หมายเหตุ Haemacytometer จะมี counting grid 2 ด้านที่เหมือนกัน ซึ่งมีไว้สำหรับการทำซ้ำ และนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยเพื่อให้ค่าที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

ภาคผนวกที่ 6 ผลงานวิจัยที่นำเสนอในการประชุมวิชาการ

- 1) Khongsay, N., Laopaiboon, L. and Laopaiboon, P. (2007) Batch ethanol fermentation from sweet sorghum stem juice under normal and very high gravity conditions by *Saccharomyces cerevisiae*. In : *The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology*, November 1-3, 2007, Nong Khai, Thailand.
- 2) Khongsay, N., Laopaiboon, L. and Laopaiboon, P. (2008) Continuous ethanol production from sweet sorghum stem juice using stirred tank and tubular bioreactors. In : *The 13th International Biotechnology Symposium & Exhibition (IBS-2008)*, October 12-17, 2008, Dalian, China.



BATCH ETHANOL FERMENTATION FROM SWEET SORGHUM STEM JUICE UNDER NORMAL AND VERY HIGH GRAVITY CONDITIONS

Naulchan Khongsay¹, Lakkana Laopaiboon^{2,3} and Pattana Laopaiboon^{2,3*}

¹ Graduate school, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University,
Khon Kaen 40002, Thailand

³ Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products,
Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae NP 01 was grown on sweet sorghum stem juice under normal gravity (total soluble solids of 24 °Bx) and very high gravity (VHG) (total soluble solids of 28 °Bx) conditions. The effects of initial cell concentrations (1×10^6 , 1×10^7 and 1×10^8 cells ml^{-1}) and nitrogen supplementation [0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] on ethanol production were investigated. The experiments were carried out at 30 °C in a 2-L fermenter under an agitation rate of 100 rpm. The results showed that under the normal gravity fermentation, the initial cell concentration of 1×10^7 cells ml^{-1} and sweet sorghum stem juice without nitrogen supplementation gave the maximum ethanol production efficiencies. The concentration, productivity and yield of ethanol were 98.37 ± 0.19 g l^{-1} , 2.05 ± 0.19 g l^{-1} h^{-1} and $96.08 \pm 0.04\%$, respectively at the fermentation time of 48 h. Under the VHG fermentation, the initial cell concentration of 1×10^8 cells ml^{-1} and sweet sorghum stem juice without nitrogen supplementation gave the maximum ethanol production efficiencies with the values of ethanol concentration, productivity and yield being 105.52 ± 0.22 g l^{-1} , 1.76 ± 0.22 g l^{-1} h^{-1} , and $78.43 \pm 0.00\%$ respectively. The results obtained

from this study indicate that $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ may not be a suitable nitrogen source for yeast metabolism resulting in lower ethanol production efficiencies.

KEYWORDS: ethanol fermentation, nitrogen supplementation, sweet sorghum stem juice, normal gravity, very high gravity, *Saccharomyces cerevisiae*

* Corresponding author. Tel: +66 43 362121 Fax: +66 43 362121.

Email: patlao@kku.ac.th

1. INTRODUCTION

Accumulation of carbondioxide in the atmosphere due to large consumption of petroleum and coal has come to be recognized as a major factor of global warming and climate change. Bioethanol used as a replacement for gasoline can reduce vehicle carbondioxide emissions by 90% [1]. Increased use of ethanol as a fuel or as a fuel additive, is therefore, one option to help the global warming.

Typically, ethanol fermentation is carried out under normal gravity (NG) conditions (fermentation of mashes containing 20 – 24 % of dissolved solids). To increase the productivity and cost effectiveness of ethanol production, many process improvements have been studied including very high gravity (VHG) technology. VHG fermentation technology is defined as the preparation and fermentation to completion of mashes containing 270 or more grams of dissolved solids per litre [2]. It has several advantages such as increase both the ethanol concentration and the rate of fermentation by reducing capital costs, energy costs per litre of alcohol and the risk of bacterial contamination [3]

Apart from corn grain (in USA), sugarcane (in Brazil), tapioca starch and sugarcane molasses (in Thailand), other agricultural raw materials rich in fermentable

carbohydrates, including sweet sorghum, have been interested for biological transformation into ethanol for use as fuel or fuel additive [4,5,6]. Sweet sorghum has been promised as a large scale energy crop because it can be cultivated in nearly all temperature and tropical climate areas. It is also often considered to be one of the most drought resistant agricultural crops as it has the capability of remaining dormant during the driest periods [7].

It was reported that under appropriate environment and nutritional conditions, *Saccharomyces cerevisiae* can produce and tolerate high ethanol concentrations [3]. Therefore, the yeast is possibly suitable for VHG fermentation.

The aim of this study was to investigate the effects of initial cell concentration and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as a nitrogen supplement on ethanol production from sweet sorghum stem juice. The ethanol production efficiencies under normal gravity (NG) and VGH fermentations were also compared.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Microorganism and inoculum preparation

The fermentative yeast *Saccharomyces cerevisiae* NP 01 isolated from Long-pang (Chinese yeast cake) from Nakhon Phanom province, Thailand was grown on yeast extract malt extract (YM) medium on a rotating shaker at 100 rpm, 30 °C for 18 h. The active cells on the broth were harvested and used as inoculum for ethanol production.

2.2 Raw materials

Sweet sorghum stem juice (strain KKU 40) was obtained from Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Thailand. After the extraction, the juice was kept at -18 °C until use.

2.3 Ethanol production medium

Sweet sorghum stem juice containing total soluble solids of 18 °Bx was adjusted with sucrose to give 24 °Bx (NG conditions) and 28 °Bx (VHG conditions). The juice was then added with 0.5% (NH₄)₂SO₄ [6] to use as an ethanol production (EP) medium. The EP medium was transferred into a 2-L fermenter with a final working volume of 1-L and was autoclaved at 110 °C for 40 min.

2.4 Fermentation conditions

The sterile EP medium was inoculated to give the initial yeast cell concentrations of approximately 1x10⁶, 1x10⁷ and 1x10⁸ cells ml⁻¹. The fermentation was operated in batch system at 100 rpm and temperature was controlled at 30 °C. Samples were withdrawn at time intervals for analysis. The optimum cell concentration (giving the highest ethanol production) under NG and VHG conditions was selected for the following experiments.

To study the effect of (NH₄)₂SO₄ as a nitrogen supplement on ethanol production from sweet sorghum stem juice, 0.5% (NH₄)₂SO₄ was withdrawn from the EP medium under NG and VHG conditions. The fermentation processes were carried out as described above.

2.5 Analytical methods

The viable yeast cell numbers and total soluble solids of the fermentation broth were determined by direct counting method using hemacytometer and hand-held refractometer respectively [8]. The fermentation broth was centrifuged at 13,000 rpm for 15 min. The supernatant was then determined for residual total sugars and reducing sugar by a phenol sulfuric acid method and dinitrosalicylic acid (DNS) method [9]. In addition, ethanol

concentration was analyzed by gas chromatography (Shimadzu GC-14B, Japan, Solid phase: polyethylene glycol (PEG-20M), carrier gas: nitrogen, 90°C isothermal packed column, injection temperature 160 °C, flame ionization detector temperature 230 °C; C-R7 Ae plus Chromatopac Data Processor) and isopropanol was used as an internal standard. The ethanol yield (Y_{ps}) was calculated as the actual ethanol produced and expressed as g ethanol per g sugar utilized (g g^{-1}). The volumetric ethanol productivity (Q_p) and the percentage of conversion efficiency or yield efficiency (E_y) were calculated by the following equations :

$$Q_p = \frac{P}{t} \quad \text{and} \quad E_y = \frac{Y_{ps} \times 100}{0.51}$$

where P is the actual ethanol concentration produced (g l^{-1}), t is the fermentation time (h) giving the highest ethanol concentration for batch and fed-batch fermentations and 0.51 is the maximum theoretical ethanol yield of glucose consumption.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effects of initial cell concentrations on ethanol production from sweet sorghum stem juice by *S. cerevisiae* NP 01 under NG and VHG conditions

Figure 1 shows the time profiles of residual total sugar, reducing sugar and ethanol concentrations during batch fermentation from the sweet sorghum stem juice supplemented with 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at the initial cell concentration of 1×10^6 , 1×10^7 and 1×10^8 cells ml^{-1} under NG and VHG fermentations. No lag phase was observed after yeast cells were inoculated into the sweet sorghum stem juice, indicating that the juice did not contain any substance at a level that was inhibitory to the yeast cells and *S. cerevisiae* NP 01 was a suitable microorganism for ethanol fermentation from the juice. The sugars were almost completely consumed under NG fermentation, while under VHG conditions stuck fermentation was noticed with approximately 30 to 48 g l^{-1} of reducing sugar

remaining in the fermentation broth. Not all reducing sugar in the media under VHG conditions was utilizable by the yeast. This might be due to thermal stress as described by [10]. They reported that the amount of sugar that could be fermented decreased when fermentation temperature increased above 25 °C. However, lower temperature might cause lower ethanol productivity.

Table 1 summarizes the kinetic parameters (P , Q_p and Y_{ps}) of ethanol fermentation under various conditions. Under NG conditions, the initial cell concentration of 1×10^7 cells ml^{-1} gave the highest P and Y_{ps} , while under VHG conditions the initial cell concentration of 1×10^8 cells ml^{-1} gave the maximum ethanol production efficiencies. Therefore, the initial cell concentrations at 1×10^7 and 1×10^8 cells ml^{-1} were used under NG and VHG conditions, respectively in the subsequent experiments. The results also showed that fermentation under higher total soluble solids (VHG conditions) could enhance P when compared to those of the fermentation under lower total soluble solids (NG conditions). However, the fermentation time under VHG conditions was prolonged than that under NG conditions resulting lower Q_p .

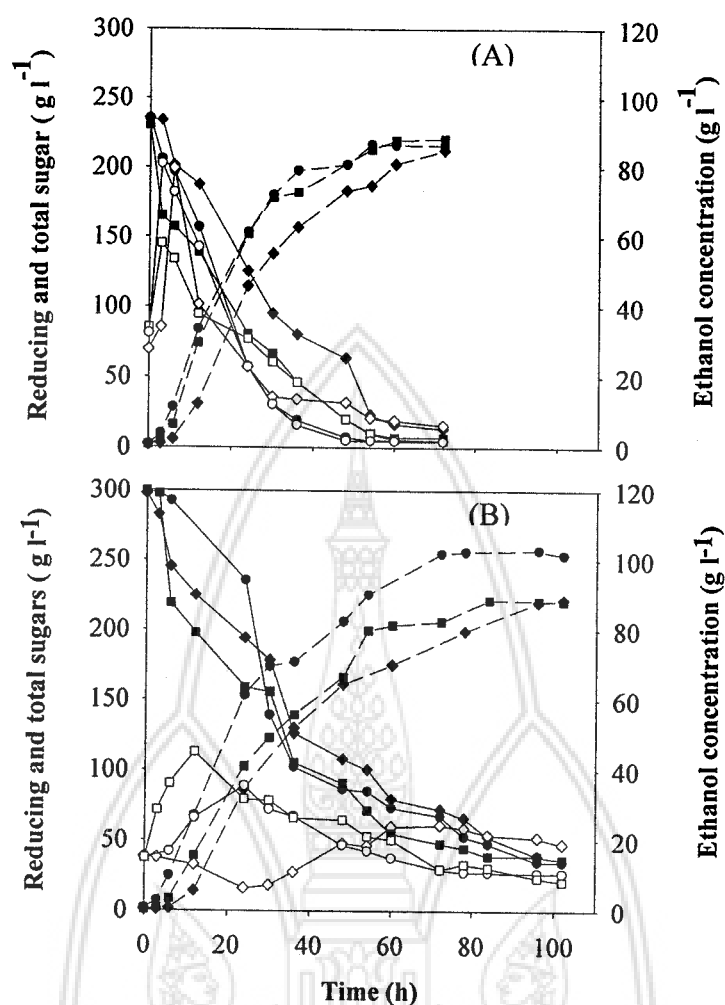


Figure 1 Fermentation kinetics during ethanol production from sweet sorghum stem juice supplemented with 0.5% (NH₄)₂SO₄ under various initial cell concentrations of *S. cerevisiae* NP 01 : 1x10⁶ (♦), 1x10⁷ (■), 1x10⁸ (●) cells ml⁻¹, residual total sugars (close symbol) and reducing sugar (open symbol), sugars (—) and ethanol concentration (----). NG (A) and VH (B) conditions.

Table 1 Kinetics parameters of batch ethanol production from sweet sorghum stem juice supplemented with 0.5% (NH₄)₂SO₄ under NG and VHГ conditions at various initial cell concentrations.

Conditions (NG / VHГ, cells ml ⁻¹)	Parameters (mean ± SD)*				
	<i>P</i> (g l ⁻¹)	<i>Q_p</i> (g l ⁻¹ h ⁻¹)	<i>Y_{ps}</i> (g g ⁻¹)	<i>E_y</i> (%)	<i>t</i> (h)
NG, 1×10 ⁶	85.00 ± 0.01 ^a	1.18 ± 0.01 ^{abc}	0.38 ± 0.01 ^b	76.47 ± 0.01 ^a	72
NG, 1×10 ⁷	87.85 ± 0.59 ^b	1.47 ± 0.59 ^{ce}	0.40 ± 0.01 ^c	78.43 ± 0.01 ^b	60
NG, 1×10 ⁸	86.71 ± 0.01 ^c	1.61 ± 0.01 ^e	0.39 ± 0.01 ^{bc}	74.51 ± 0.01 ^c	54
VHГ, 1×10 ⁶	88.77 ± 0.01 ^d	0.87 ± 0.01 ^a	0.34 ± 0.01 ^a	66.54 ± 0.01 ^d	102
VHГ, 1×10 ⁷	88.54 ± 0.01 ^d	1.05 ± 0.01 ^{ab}	0.34 ± 0.01 ^a	66.67 ± 0.01 ^e	84
VHГ, 1×10 ⁸	101.89 ± 0.16 ^e	1.42 ± 0.16 ^{bce}	0.43 ± 0.01 ^a	84.15 ± 0.01 ^f	72

* *P*, ethanol concentration produced; *Q_p*, volumetric ethanol productivity; *Y_{ps}*, ethanol yield; *E_y*, yield efficiency and *t*, fermentation time. The experiments were performed in duplicate.

3.2 Effects of (NH₄)₂SO₄ as a nitrogen supplement on ethanol production from sweet sorghum stem juice by *S. cerevisiae* NP 01 under NG and VHГ conditions

Figure 2 shows changes of residual total sugar, reducing sugar and ethanol concentrations during NG and VHГ fermentations from sweet sorghum stem juice in the presence and absence of (NH₄)₂SO₄ as a nitrogen supplement. The results demonstrated that the rates of sugar consumption and ethanol production from the juice without the nitrogen supplement were higher than those of the juice containing the extra nitrogen source in both NG and VHГ conditions although the yeast cell numbers under these conditions were similar ranging from 1.64×10⁸ to 2.36×10⁸ cells ml⁻¹ at the fermentation time as indicated in Table 2. Table 2 summarizes the important kinetic parameters of the ethanol fermentations. It was found that under both NG and VGH conditions, (NH₄)₂SO₄ caused lower in ethanol production efficiencies in terms of *P* and *Q_p*. The presence of (NH₄)₂SO₄ in sweet sorghum stem juice caused lower *Y_{ps}* under NG condition. These findings suggest that (NH₄)₂SO₄ may not be a suitable nitrogen source for yeast metabolism for ethanol fermentation from sweet sorghum stem juice. The results also showed that

ethanol concentrations under VHG fermentation were higher than those under NG fermentation. However, the rate of ethanol fermentation in terms of ethanol productivity under the VHG levels was lower than that under the NG levels due to longer fermentation time. The results obtained in this study implied that *S. cerevisiae* NP 01 was a suitable microorganism for ethanol production under VHG conditions because the yeast could survive and retain its metabolism under very high ethanol concentration up to $105.52 \pm 0.22 \text{ g l}^{-1}$ (13.36 % by volume) with the viable cells remaining approximately $2.04 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ at the fermentation time of 60 h.

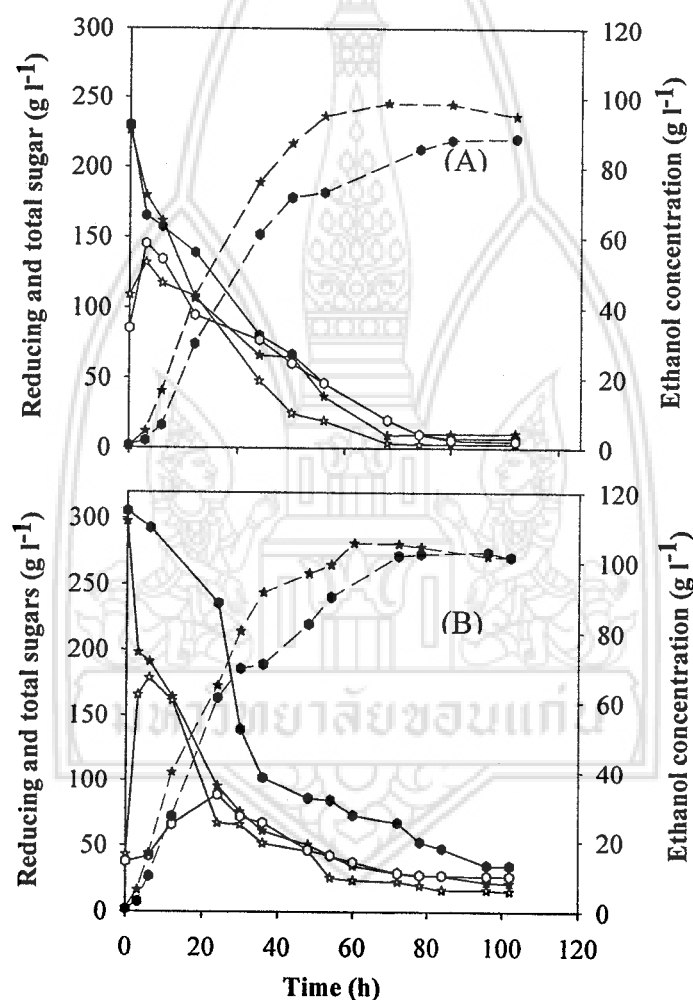


Figure 2 Fermentation kinetics during ethanol production from sweet sorghum stem juice in the presence (●) and absence (★) of 0.5% (NH₄)₂SO₄ by *S. cerevisiae* NP 01 : residual total sugar (close symbol) and reducing sugar (open symbol), sugars (—) and ethanol concentration (----). NG (A) and VHG (B) conditions.

Table 2 Kinetics parameters of batch ethanol production from sweet sorghum stem juice in the presence and absence of 0.5% (NH₄)₂SO₄ under NG and VHG conditions.

Conditions (NG / VH, cells ml ⁻¹ **)	Extra nitrogen source	Parameters (mean ± SD)*				
		<i>P</i> (g l ⁻¹)	<i>Q_p</i> (g l ⁻¹ h ⁻¹)	<i>Y_{ps}</i> (g g ⁻¹)	<i>E_y</i> (%)	<i>t</i> (h)
NG, 1×10 ⁷	None	98.37 ± 0.19 ^a	2.05 ± 0.19 ^a	0.49 ± 0.04 ^b	96.08 ± 0.04 ^a	48
NG, 1×10 ⁷	(NH ₄) ₂ SO ₄	87.85 ± 0.59 ^b	1.47 ± 0.59 ^a	0.40 ± 0.01 ^a	78.43 ± 0.01 ^b	60
VHG, 1×10 ⁸	None	105.52 ± 0.22 ^c	1.76 ± 0.22 ^a	0.40 ± 0.00 ^a	78.28 ± 0.00 ^c	60
VHG, 1×10 ⁸	(NH ₄) ₂ SO ₄	101.89 ± 0.16 ^d	1.42 ± 0.16 ^a	0.43 ± 0.01 ^a	84.15 ± 0.00 ^d	72

*see Table 1. The experiments were performed in duplicate.

** Initial cell concentration.

4. CONCLUSION

The results obtained from this research demonstrated that VHG fermentation could improve ethanol production efficiency. The initial yeast cell concentration affected ethanol production efficiencies and (NH₄)₂SO₄ was not a good nitrogen supplement for ethanol production from sweet sorghum stem juice under both NG and VH levels. Supplementation with other nitrogen sources and/or other nutrients as well as other fermentation processes should be further investigated as they may lead to improve ethanol productivity and complete sugar consumption under VGH conditions.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Research Council of Thailand (NRCT), Thailand for financial support. We also would like to acknowledge the Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FerVAAP) for financial support for Miss Naulchan Khongsay.

REFERENCES

- [1] Ward, O.P. and Singh, A. **2002**. Bioethanol technology: Development and perpectives, *Advances in Applied Microbiology*, 51, 53-80.
- [2] Bayrock, D.P. and Ingledew, W.M. **2001**. Application of multistage continuous fermentation of production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27, 87-93.
- [3] Thomas, K.C., Hynes, S.H. and Ingledew, W.M. **1996**. Practical and theoretical considerations in the production of high concentration of alcohol by fermentation, *Process Biochemistry*, 31, 321-331.
- [4] Schaffert, R.E. **1992**. Sweet sorghum substrate for industrial alcohol. *Proceeding of the international workshop on policy, practice and potential relating to use of sorghum and millets*, ICRISAT Centre, Bulawayo, Zimbabwe. Feb. 8-12, pp. 131-137.
- [5] Gokoungur, Y. and Zorlu, N. **2001**. Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginated immobilized yeast cells in a pack-bed bioreactor, *Turkish Journal of Biotechnology*, 25, 265-275.
- [6] Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Nuanpeng, S., Jaisil, P. and Laopaiboon, P. **2007**. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1497-1501.
- [7] Woods, J. **2000**. *Integrating sweet sorghum and sugarcane for bioenergy: Modeling the potential for electricity and ethanol production in SE Zimbabwe*. Ph.D. Thesis, King's College, London.

- [8] Zoecklien, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. 1995. Laboratory procedures. *In* : *Wine Analysis and Production*. New York, Chapman & Mall, pp. 310-516.
- [9] Mecozzi, M. 2005. Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 79, 84-90.
- [10] Jones, A.M., Thomas, K.C. and Ingledew, W.M. 1994. Ethanol fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1242-1246.



CONTINUOUS ETHANOL PRODUCTION FROM SWEET SORGHUM STEM JUICE USING STIRRED TANK AND TUBULAR BIOREACTORS

Naulchan Khongsay¹, Lakkana Laopaiboon^{2,3} and Pattana Laopaiboon^{2,3*}

¹ Graduate school, Khon Kaen University, ² Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, ³ Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*Corresponding author. Tel: +66-43-362121 Fax: +66-43-362121 Email: patlao@kku.ac.th

Abstract

Continuous ethanol production from sweet sorghum stem juice was compared between using a continuous stirred tank bioreactor (CSTR) and a combined bioreactor. The combined bioreactor composed of a CSTR and a three-tubular bioreactor in series with a total working volume of 3320 ml. The fermentation was carried out at 30°C by *Saccharomyces cerevisiae* NP 01. The sweet sorghum stem juice containing total sugar of 250 g l⁻¹ was introduced to the systems at the total dilution rate of 0.007 h⁻¹. The results clearly showed that the combined bioreactor could improve ethanol production efficiency. The yeasts in the combined bioreactor system utilized sugar and produced ethanol more than those in the CSTR system. Low sugar consumption and ethanol production in the CSTR system may be due to substrate inhibition. In the combined bioreactor, the amount of ethanol production depended on the retention time in the system. The final concentration, productivity and yield of ethanol were 98.47 ± 0.70 g l⁻¹, 0.69 ± 0.00 g l⁻¹ h⁻¹ and 83.33 ± 0.01%, respectively.

Key words: continuous ethanol production, continuous stirred tank bioreactor (CSTR), *Saccharomyces*, sweet sorghum stem juice, tubular bioreactor

1. Introduction

Since the oil crisis of the 1970s, a strong need has been existing for efficient ethanol production with low cost in raw material and production process. Sweet sorghum has been promised as a large scale energy crop because its stalks contain high fermentable sugar and it can be cultivated in nearly all temperatures [1].

The primary disadvantage of batch and fed-batch ethanol fermentation is that significant downtime (cleaning, sanitizing, filling) between runs is necessary [2]. This represents a major loss of overall productivity. In this study, we are interested in continuous fermentation because it has several advantages over batch fermentations such as: long-term continuous productivity, higher volumetric productivity, reduced labor costs once reaching steady state, reduced vessel downtime for cleaning, filling and sanitizing and easier process control and operation [3].

The aim of this study was to compare the efficiency of continuous ethanol production from sweet sorghum stem juice by a continuous stirred tank bioreactor (CSTR) and a combined bioreactor, CSTR and tubular bioreactor.

2. Materials and methods

2.1 Microorganism and inoculum preparation

The fermentative yeast *Saccharomyces cerevisiae* NP 01 was grown on yeast extract malt extract (YM) medium on a rotating shaker at 100 rpm, 30°C for 18 h. The active cells were harvested and used as inoculum for ethanol production.

2.2 Raw material and ethanol production medium

Sweet sorghum stem juice (18°Bx) extracted from its stalks (cv. KKU 40) was concentrated to obtain total soluble solids of 75°Bx. The concentrated juice was diluted with distilled water to give total soluble solids of 28°Bx and used as an ethanol production (EP) medium.

2.3 Fermentation conditions

In the CSTR system, the EP medium was transferred into a 5-L stirred tank bioreactor with a final working volume of 3320 ml and autoclaved at 110 °C for 60 min. The sterile EP medium was inoculated to give the initial yeast cell concentrations of 1×10^8 cells ml^{-1} . The fermentation was operated in batch mode at 100 rpm, 30°C. When the total soluble solids of the medium in the bioreactor were about 15°Bx, the system was switched to continuous mode by feeding fresh EP medium at the dilution rates of 0.007 h^{-1} . Samples were withdrawn at time intervals for analysis.

In the combined bioreactor system modified from Bai et al. [4], it composed of a 2-L stirred tank bioreactor and a three-tubular bioreactor in series with a total working volume of 3320 ml. The working volume of the stirred tank and the three tubular bioreactor were 1000, 770, 770 and 780 ml, respectively. The yeasts were inoculated to the system and then processed as previous described.

2.4 Analysis

The viable yeast cell numbers, total soluble solids, residual total sugars and ethanol concentration of the fermentation broth were determined [5]. The ethanol yield (Y_{ps} , g ethanol per g sugar utilized), volumetric ethanol productivity (Q_p , $\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and ethanol yield efficiency (E_p) were calculated [5].

3. Results and discussion

3.1 Continuous ethanol production using CSTR (System I)

Fig. 1 illustrated the profiles of main fermentation parameters during ethanol production by CSTR. Kinetic parameters of ethanol production by CSTR are shown in Table 1. Even through, yeast cell concentration in the broth was relatively high at log 7.8 to log 8.0 cells ml^{-1} during steady state, only approximately 30% of total sugar was utilized by the system. However, most sugar utilized was converted to ethanol with the yield efficiency of 94%. Low sugar consumption of the CSTR system may be due to substrate inhibition.

3.2 Continuous ethanol production using the combined bioreactor (System II)

Fig. 2 and Table 1 indicated that retention time of the fermentation broth in the system had significant effects on the main kinetic parameters. The longer retention time was, the higher the values of sugar consumption and ethanol production. The total sugar utilized was about 32, 51, 76 and 85% at the end of the stirred tank, tubular bioreactor 1, 2 and 3, respectively. The maximum ethanol concentration (99 g l^{-1}) was detected at the end of the system, however, the conversion efficiency or yield efficiency was decreased along the cascade system with the values of 83% of the theoretical yield at the end of the system. This implied that more by-products were occurred at the latter stages.

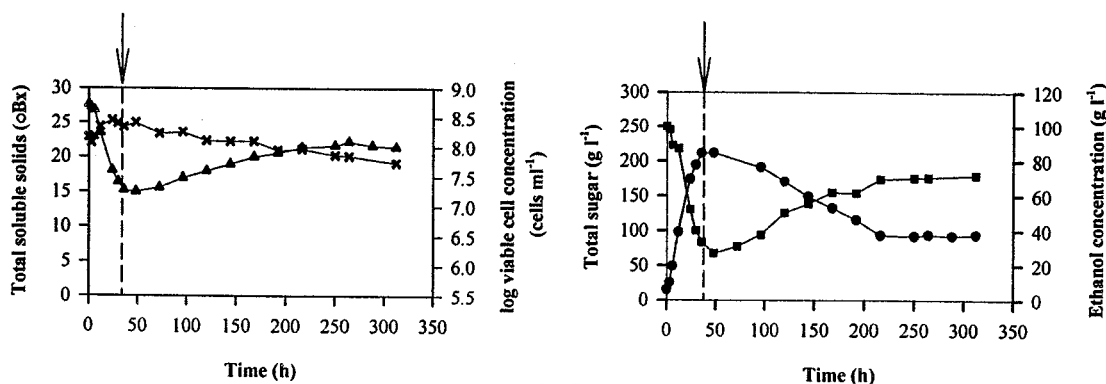


Fig. 1 Fermentation parameters against time of ethanol production using CSTR: total soluble solids (▲), yeast cells (×), total sugar (■), ethanol (●). The arrows indicate the start time of continuous mode.

Table 1 Continuous ethanol production from sweet sorghum stem juice under steady state conditions.

Parameters	System I : CSTR	System II : The combined bioreactor			
		CSTR	CSTR to TB1*	CSTR to TB2*	CSTR to TB3*
Dilution rate (h ⁻¹)	0.007	0.023	0.013	0.009	0.007
Working volume (ml)	3320	1000	1770	2540	3320
Total sugar (g l ⁻¹)	176.68 ± 2.34	175.3 ± 1.05	88.38 ± 5.17	54.18 ± 1.92	35.60 ± 1.52
P** (g l ⁻¹)	37.27 ± 0.32	42.27 ± 1.08	81.02 ± 3.44	92.94 ± 1.10	98.47 ± 0.70
Q _p (g l ⁻¹ h ⁻¹)	0.26 ± 0.00	0.97 ± 0.02	1.05 ± 0.10	0.84 ± 0.01	0.69 ± 0.004
Y _{ps} (g g ⁻¹)	0.51 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.04	0.46 ± 0.01	0.45 ± 0.01
E _y (%)	93.52 ± 2.39	98.15 ± 0.02	87.04 ± 0.04	85.19 ± 0.01	83.33 ± 0.01

* TB1, TB2 and TB3 = First, second and third tubular bioreactors, respectively.

** P, ethanol concentration; Q_p, ethanol productivity; Y_{ps}, ethanol yield and E_y, yield efficiency.

3.3 Comparison of ethanol production by CSTR and the combined bioreactor

The time to reach steady state of the combined bioreactor system was about 60 h faster than that in the CSTR only. This might be due to high substrate concentration remaining in the broth of the CSTR system. The dilution rate of the stirred tank in the combined system was 3.3 times higher than that of the stirred tank in the CSTR system, however, the amount of sugar utilization in the stirred tank of the both systems was similar with about 30%. This indicated the maximum capacity of yeast for sugar consumption in the stirred tank bioreactor under the conditions studied. At the same dilution rate, the combined system significantly improved ethanol production. Sugar utilization and ethanol concentration of the combined system were about 2.6 to 2.9 times higher than those of the CSTR only. However, ethanol yield of the combined system was lower than that of the CSTR system.

4. Conclusions

The experimental data clearly demonstrated that the combined bioreactor, CSTR coupled with tubular bioreactors, significantly increased in ethanol production in terms of ethanol concentration and productivity. Low sugar consumption and ethanol production in the CSTR system may be due to substrate inhibition. However, lower ethanol yield of in the combined bioreactor should be improved.

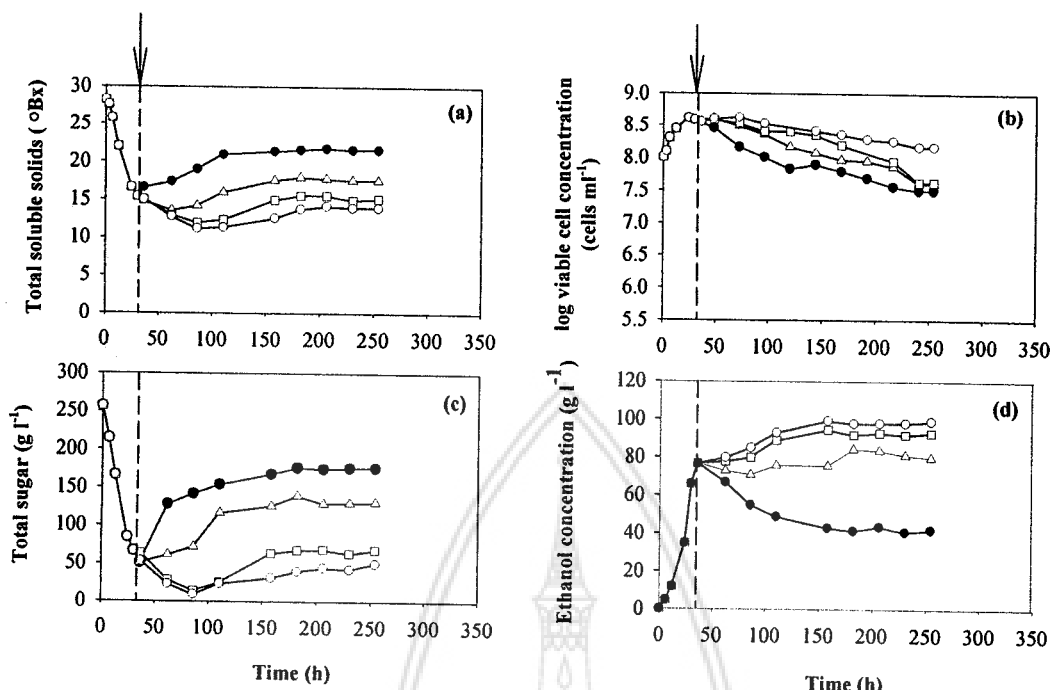


Fig. 2 Fermentation parameters against time of ethanol production using the combined bioreactor: stirred tank (●), column 1 (△), column 2 (□) and column 3 (○); (a): total soluble solids, (b): yeast cells, (c): total sugar and (d): ethanol. The arrows indicate the start time of continuous system.

5. Acknowledgments

The authors would like to thank the National Research Council of Thailand (NRCT), Thailand for financial support. We also would like to acknowledge the Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FerVAAP) for financial support for Miss. Naulchan Khongsay.

6. References

- [1] Sree, N.K., Sridhar, M., Rao, L.V. and Pandey, A. 1999. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. *Process Biochem.* 34: 115-119.
- [2] Bayrock, D.P. and Ingledew W.M. 2001. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 27: 87-93.
- [3] Sinclair CG and D Cantero. 1990. Fermentation modeling. In: *Fermentation: A Practical Approach* (Mcneil, B. and Harvey, L.M. Eds.), pp. 65-112. Oxford University Press, UK.
- [4] Bai, F.W., Chen, L.J., Zhang, Z., Anderson, W.A. and Moo-Young, M. 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J. Biotechnol.* 110: 287-293.
- [5] Laopaiboon, L., Thanonkeo, S., Jaisil, P. and Laopaiboon, P. 2007. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol.* 23: 1497-1501.