

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
กองทุนวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีงบประมาณ 2553

เรื่อง

สายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อการหมักเอทานอลเชื้อเพลิง

**Microbial Strains for Fuel Ethanol Production**

โดย

รศ.ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา<sup>1</sup> รศ.ดร. สมบูรณ์ ฐานานุวัฒน์<sup>2</sup>

ผศ.ดร. ณัฐชนัน ธิพัฒน์ไพบูลย์<sup>3</sup> นางวาสนา โตเลี้ยง<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ <sup>2</sup>ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์

<sup>3</sup>ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ <sup>4</sup>สถาบันเทคโนโลยีสื่อสารโทรคมนาคมและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทคัดย่อ

จากตัวอย่าง น้ำอ้อย ตะกอนจากระบบการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาล 11 แห่ง และตัวอย่างดิน ในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวม 169 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์หมักเอทานอลได้ที่ 30 และ 40°C จำนวน 521 และ 444 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยยีสต์ที่มีประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดสองอันดับแรกคือ *Saccharomyces cerevisiae* G5-7(2) แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช และ *Kluyveromyces marxianus* G2-3(1) แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม ที่ 40°C สามารถหมักเอทานอลได้ 0.49 และ 0.44 กรัม/กรัม กลูโคส ตามลำดับ ในเวลา 48 ชั่วโมง (*S. cerevisiae* TISTR 5596 ได้ 0.2 กรัม เอทานอล/กรัม กลูโคส) สภาวะเหมาะสม สำหรับการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G5-7(2) คือ 40°C, pH 5.0

ตัวอย่างดินป่าพรุหนองจำรุง อ.แก่ง จ.ระยอง จำนวน 59 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ที่ 30°C โดยวิธี Enrichment culture โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้ยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10 % น้ำหนัก/ปริมาตร (43 ไอโซเลต) น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 24 % น้ำหนัก/ปริมาตร (85 ไอโซเลต) เซลลูโลสเข้มข้น 10% น้ำหนัก/ปริมาตร (73 ไอโซเลต) น้ำตาลไซโลสเข้มข้น 10% น้ำหนัก/ปริมาตร (31 ไอโซเลต)

ไม่พบยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลไซโลสได้มากกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 และ *Pichia stipitis*

*K. marxianus* G2-16(3) ซึ่งแยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม ที่ 40°C เป็นยีสต์ทน แร่งดันออกซิเจนสูง สามารถหมักกลูโคส 38% (กรัม/ปริมาตร) ที่ 40°C เป็นเอทานอลได้เท่ากับ 0.12 กรัม เอทานอล/กรัม กลูโคส (*S. cerevisiae* TISTR 5596 เท่ากับ 0.015 กรัม เอทานอล/กรัม กลูโคส)

## Abstract

521 and 444 ethanolic fermenting yeasts were isolated at 30 and 40°C, respectively from total 169 samples of sugarcane juices, sugar producing process sludges from 11 sugar factories and soil samples collected in Chulalongkorn University. Two highest ethanol producer were *S. cerevisiae* G5-7(2) and *Kluyveromyces marxianus* G2-3(1). Their ethanol yield were 0.49 and 0.44 g/g glucose respectively, *S. cerevisiae* TISTR 5596 (0.2 g ethanol/g glucose) within 48 hours. The *S. cerevisiae* G5-7(2) produced maximum ethanol at 40°C, pH 5.0

59 soil samples collected from Chumrung Peat Swamp forest, Klang district, Rayong province were isolated for ethanolic fermenting yeast by enrichment culture method using various carbon sources at 30°C. The ethanol fermenting yeasts isolated from media containing 10% (w/v) glucose, 24% (w/v) glucose, 10 % (w/v) xylose, 10% (w/v) cellulose; were 43, 85, 73, 31 isolates, respectively. No isolate produced higher ethanol than *S. cerevisiae* TISTR 5596 or *Pichia stipitis*, the control.

*K. marxianus* G2-16(3) which was isolated at 40°C was osmotolerant yeast. Its ethanol yield fermented from 38% (w/v) glucose at 40°C was 0.12 g ethanol/g glucose. (*S. cerevisiae* TISTR 5596 (0.015 g ethanol/g glucose)).

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช หรือ CU-CLUSTER-FUND

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
กิตติกรรมประกาศ	4
สารบัญ	5
สารบัญภาพ	6
สารบัญตาราง	7
บทนำ	8
วิธีการทดลอง	10
ผลการทดลอง	18
สรุปผลการทดลอง	166
การทดลองที่จะทำต่อไป	167
เอกสารอ้างอิง	168
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	169

## สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. Isolation for glucose/xylose fermenting yeast	10
2. การทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์	11
3. วิธีการแยกยีสต์สามารถทนน้ำตาลความเข้มข้นสูง	12
4. วิธีการคัดกรองยีสต์ทนแรงดันออสโมติกที่สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูง	13
5. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลโดย <i>S. cerevisiae</i> (G 5-7 (2))	14
6. การทดสอบความสามารถเจริญของ <i>Kluyveromyces marxianus</i> ที่อุณหภูมิ 48 <sup>o</sup> ซ	15
7. วิธีการสกัด DNA จากเซลล์ยีสต์ (Manitis <i>et al</i> , 1982)	16

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่แยกได้จาก โรงงานน้ำตาลราชบุรี	158
2. ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่แยกได้จาก โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม	159
3. ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่แยกได้จาก โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช	160
4. ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์	161
5. ผลการจำแนกชนิดของยีสต์หมักเอทานอลที่ 40°C ซึ่งแยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช	162
6. ผลการจำแนกชนิดของยีสต์หมักเอทานอลที่ 30°C ซึ่งแยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช	163
7. ผลการจำแนกชนิดของยีสต์หมักเอทานอลที่ 30°C ซึ่งแยกได้จากป่าพรุหนองจำรุง	164

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การวิจัยและพัฒนาพลังงานทางเลือกของประเทศไทย พลังงานทางเลือกที่มีศักยภาพสูงสุดคือ พลังงานจากชีวมวล โครงการวิจัยนี้เลือกที่จะศึกษาเอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานชีวมวลที่ได้จากการนำผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตรมาย่อยให้เป็นน้ำตาล (fermentable sugars; glucose) แล้วหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลโดยจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และ/หรือ แบคทีเรีย)

วัตถุดิบของการหมักเอทานอลสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักตามลักษณะของโครงสร้างคือ น้ำตาลและโพลีเมอร์ของน้ำตาล เช่น แป้ง ลิกโนเซลลูโลส และเพื่อให้อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหาร ปัจจุบันการวิจัยและพัฒนาการผลิตเอทานอลจึงได้มุ่งเน้นไปที่วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์พืชโดยทั่วไป เป็นวัตถุดิบหมุนเวียนที่มีมากที่สุดในโลกและราคาถูกที่สุด เมื่อนับรวมของเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร (Agricultural and Agro-industrial wastes)

ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยองค์ประกอบหลักคือ เซลลูโลส (cellulose) ร่องลงมาคือ (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) แม้ว่าการย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดจะทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสในปริมาณมาก แต่ก็มีข้อเสียคือไฮโดรไลเซส (hydrolysate) ที่ได้มีผลพลอยได้ (byproducts) ซึ่งยับยั้งการหมักเอทานอลของจุลินทรีย์ในขั้นตอนถัดไปในปริมาณมากด้วย และยังก่อให้เกิดน้ำเสียซึ่งมีความเป็นกรดสูงปริมาณมาก ในขณะที่การย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส นั้น จะได้สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีปัญหาการกัดกร่อนถังหมักเนื่องจากความเป็นกรดสูงและปัญหาน้ำเสียดังกล่าว แต่เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสนั้น เซลลูโลสถูกห่อหุ้มด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ทำให้เซลลูเลสย่อยเซลลูโลสได้ยาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดหรือด่าง เพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่อยู่โดยรอบเซลลูโลสออกก่อน วิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสที่นิยมใช้คือ วิธีการใช้กรดเจือจาง เพราะไม่ก่อให้เกิดปัญหาน้ำเสียที่มีความเป็นกรดสูง และมีผลผลิตพลอยได้ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการหมักเอทานอลต่ำมาก

เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสละลายในกรดได้ดี วิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเจือจาง จึงทำให้ไฮโดรไลเซสจากขั้นตอนนี้มีน้ำตาลไซโลสที่ถูกย่อยสลายมาจากไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสปริมาณมาก

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถหมักน้ำตาลไซโลสให้เป็นเอทานอลได้ *Rhizopus oryzae* (Takerzadeh et al., 2003), *Mucor indicus* (Karimi et al., 2006), *Rhizomucor* (Millati et al., 2005), *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis* (Sanchez et al., 2002) ดังนั้นจึงควรมานำน้ำตาลไซโลสจากขั้นตอนการปรับสภาพเหล่านี้มาหมักเป็นเอทานอลด้วย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส

*Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่นิยมนำมาหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลมากที่สุด เพราะให้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) จากน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นและทนต่อผลผลิตพลอยได้ (byproduct) จากการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสได้ดี แต่ *S. cerevisiae* มีข้อเสียคือไม่ทนความร้อน ไม่ทนเอทานอลและความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้นสูง



*Pichia stipitis* เป็นยีสต์ที่นิยมนำมาหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล เพราะให้ผลผลิตเอทานอล จากน้ำตาลไซโลสสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น แต่ *Pichia stipitis* มีข้อเสียคือ ไม่ทนความร้อน ไม่ทนเอทานอลและความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้นสูง เมื่อเทียบกับ *Saccharomyces cerevisiae* (Lebeau et. al., 1995) นอกจากนั้นยังใช้เอทานอลที่ผลิตขึ้นเพื่อการเจริญ (Skoog et. al., 1992)

ดังนั้นการคัดกรองหายีสต์ซึ่งสามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและจากน้ำตาลไซโลส โดยให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าหรือเทียบเท่ากับ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis* ตามลำดับ และมีลักษณะสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์มากกว่า เช่น ไม่สามารถใช้เอทานอลเป็นเพื่อการเจริญ ทนต่อปริมาณเอทานอลสูง ทนความร้อน ทนต่อสารปนเปื้อนชนิดต่างๆ ในไฮโดรไลเซสจากขั้นตอนการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส และทนต่อผลผลิตผลอยได้จากกรหมักเอทานอลของ glucose fermenting organisms อื่น จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงของประเทศ

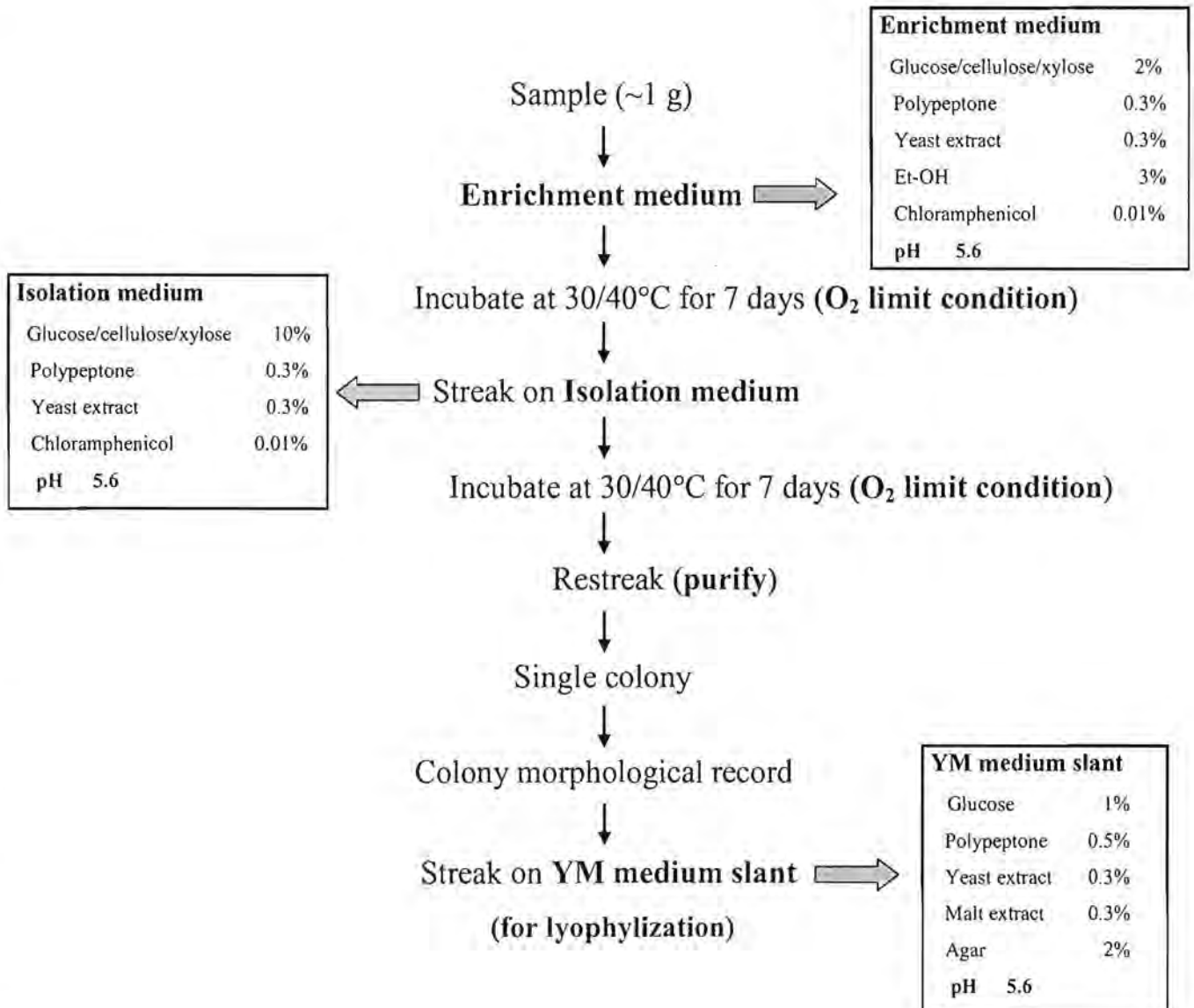
#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

คัดกรองหายีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส และมีลักษณะสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต

## วิธีการทดลอง

### 1. วิธีการแยกยีสต์สามารถหมักเอทานอล

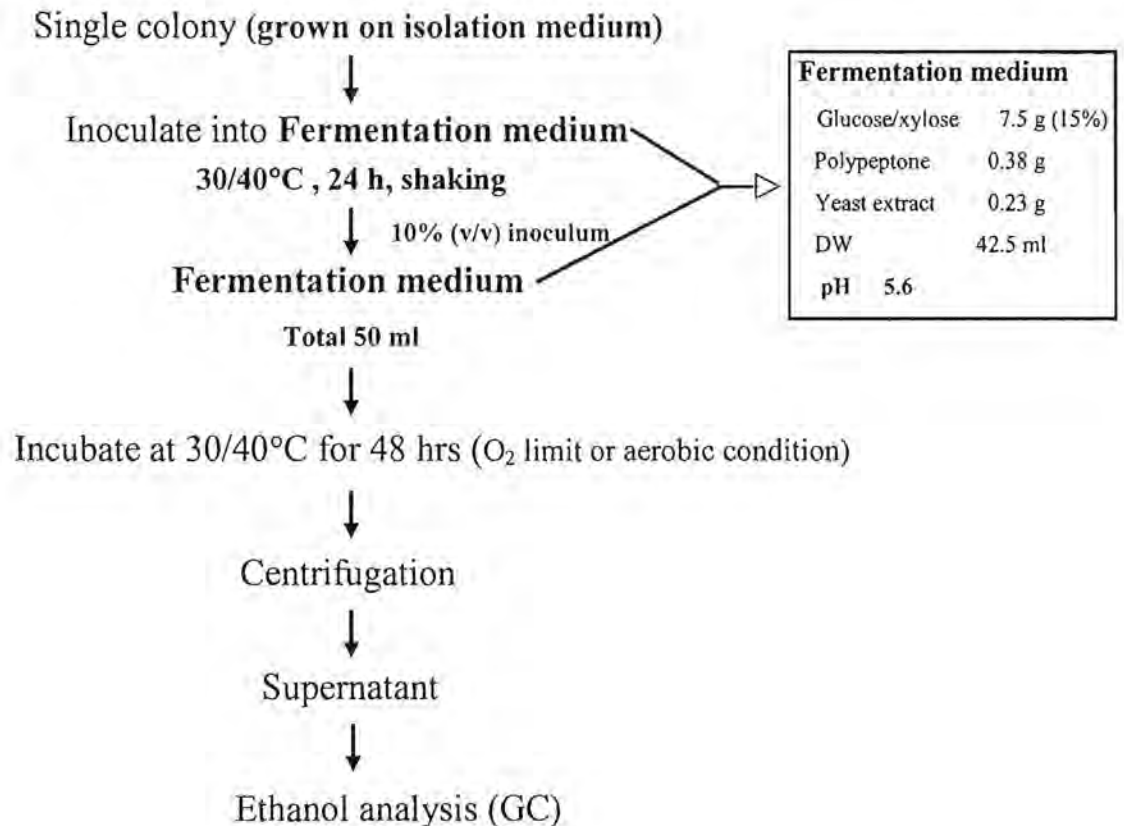
แยกยีสต์ซึ่งสามารถหมักเอทานอลจาก glucose, cellobiose หรือ xylose โดยวิธี selective culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose, cellulose หรือ xylose เป็นแหล่งคาร์บอน เก็บยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้โดยวิธี lyophilization ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Isolation for glucose/xylose fermenting yeast yeast

## 2. ทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอล

ทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจาก glucose และ xylose ของยีสต์ที่แยกได้โดยวิธี enrichment culture โดยใช้อาหารหมักที่มี glucose หรือ xylose เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ตามอุณหภูมิที่แยกได้ดังแสดงในภาพที่ 2

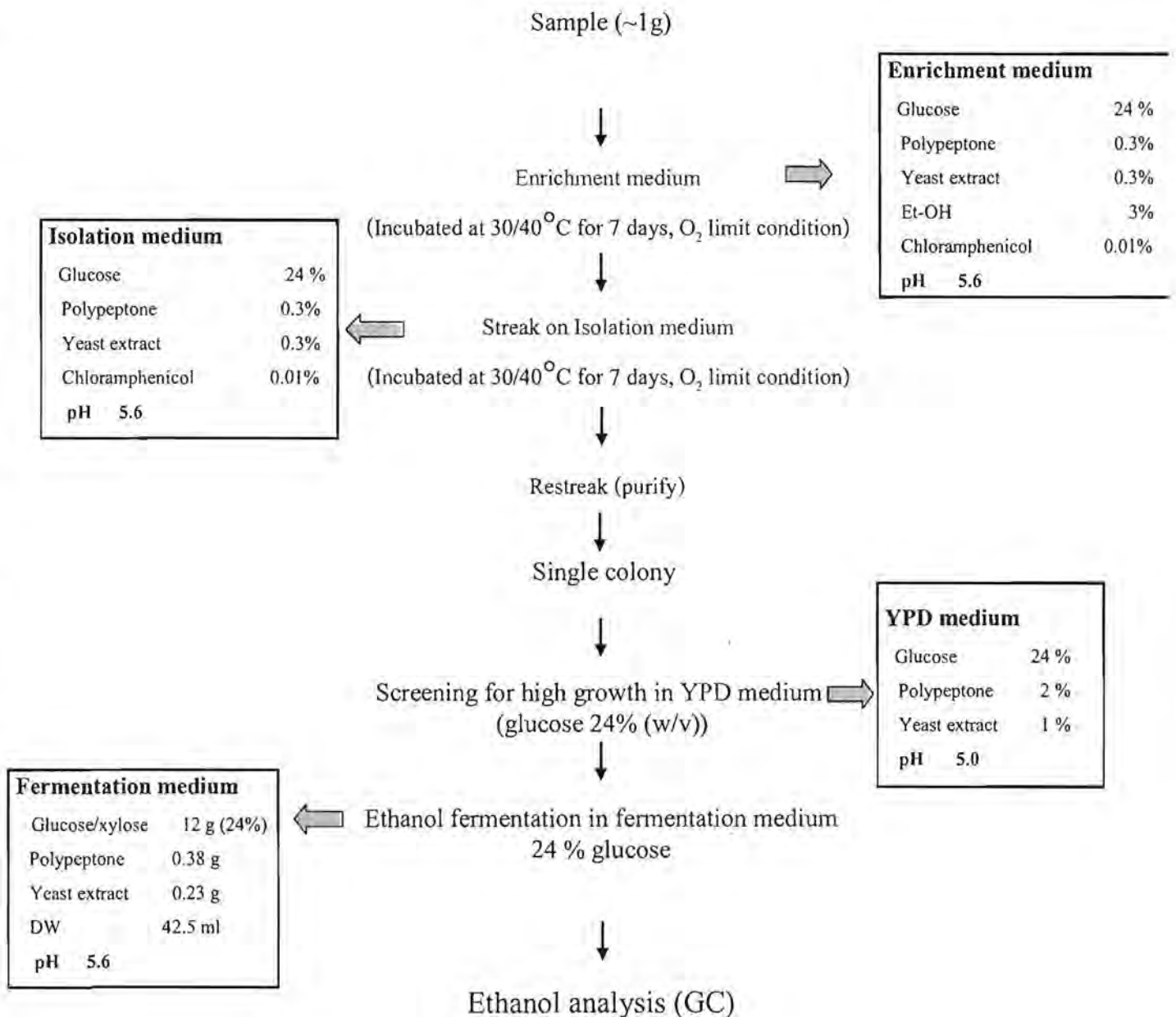


ภาพที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์

### 3. วิธีการคัดแยกยีสต์ทนแรงดันออสโมติกซึ่งสามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นสูง

แยกยีสต์ซึ่งสามารถหมักเอทานอลจาก glucose ความเข้มข้นน้ำตาลสูง โดยวิธี enrichment culture

ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose 24% (w/v)



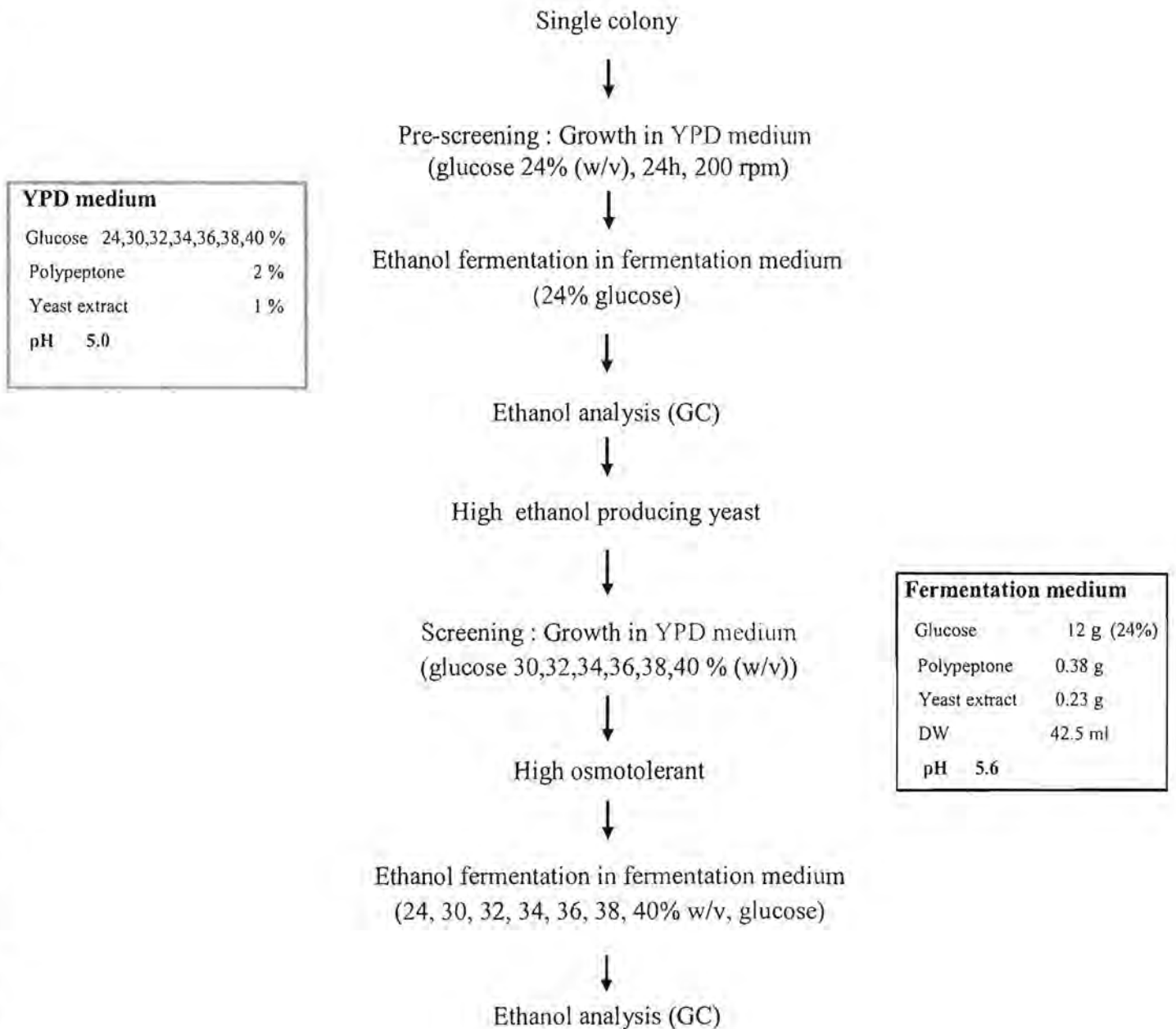
ภาพที่ 3

วิธีการแยกยีสต์สามารถทนน้ำตาลความเข้มข้นสูง

4. วิธีการคัดกรองยีสต์ทนแรงดันออสโมติกที่สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูงได้

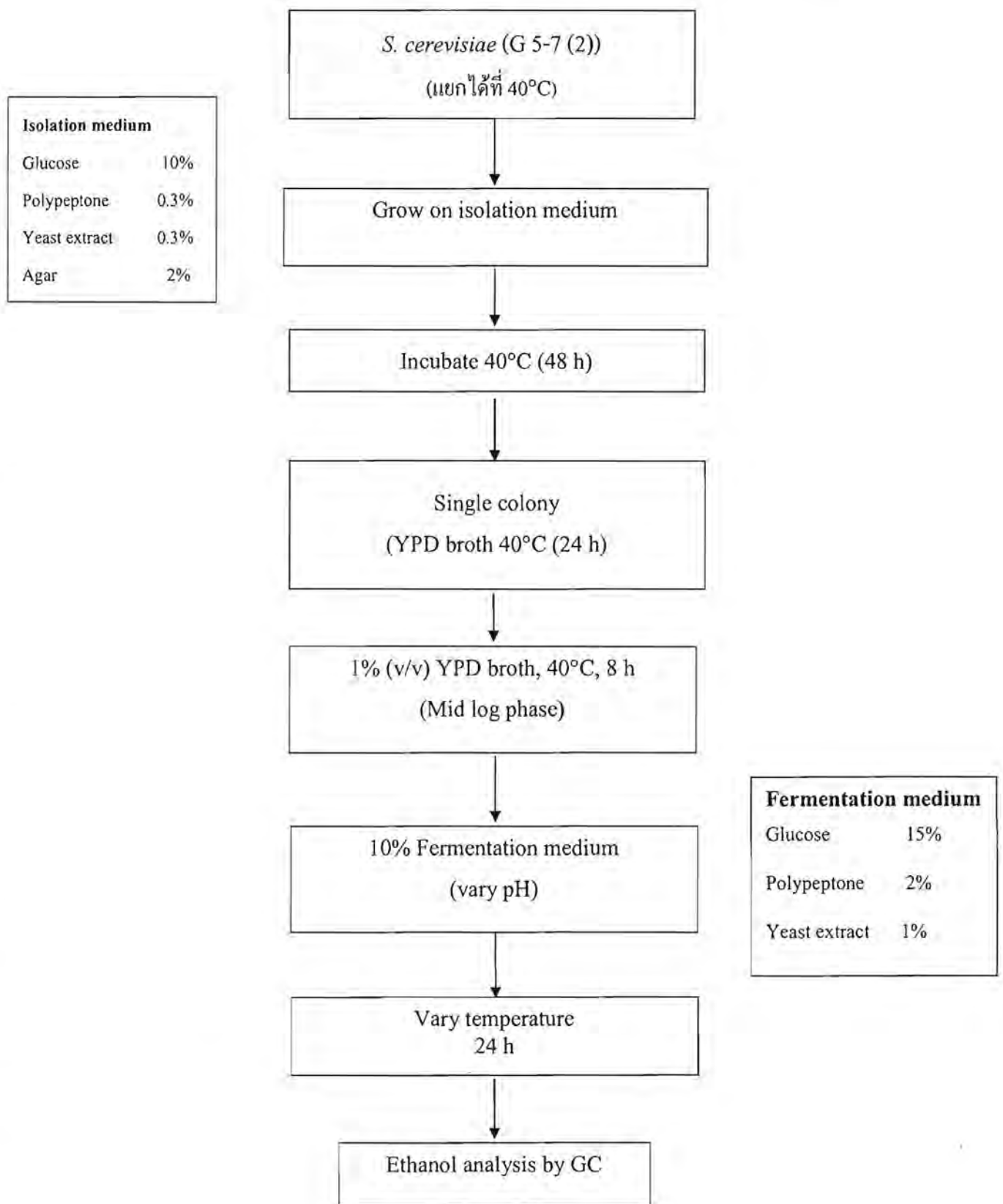
นำยีสต์ที่คัดแยกจากตัวอย่างจากจุฬา ฯ และจากโรงงานน้ำตาล 8 แห่ง ที่มีผลการหมักเอทานอลได้สูงกว่า

*S.cerevisiae* มาทำการคัดกรองยีสต์ทนแรงดันออสโมติกที่สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูง



รูปที่ 4 วิธีการคัดกรองยีสต์ทนแรงดันออสโมติกที่สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูง

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* (G 5-7 (2))



รูปที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอล โดย *S. cerevisiae* (G 5-7 (2))

6. การทดสอบความสามารถเจริญของ *Kluyveromyces marxianus* ที่อุณหภูมิ 48°C

*Kluyveromyces marxianus*

(สายพันธุ์หมักเอทานอลสูง)



Grow on isolation medium



48°C, 72 h



Observed for growth

**Isolation medium**

Glucose 10 %

Bacto peptone 0.3 %

Yeast extract 0.3 %

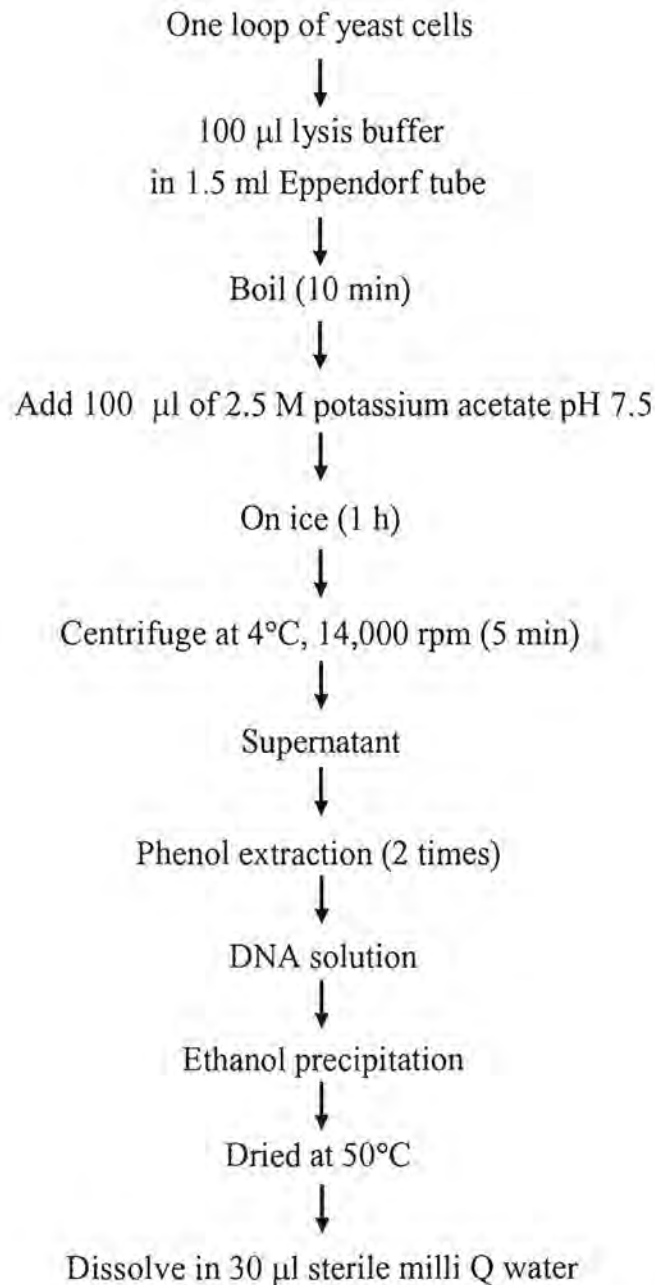
Agar 2.0

pH 5.6

รูปที่ 6 การทดสอบความสามารถเจริญของ *Kluyveromyces marxianus* ที่อุณหภูมิ 48°C

## 7. วิธีการจำแนกชนิดของยีสต์ (Molecular characterization)

จำแนกชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose และ cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนและที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลจาก glucose เปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* TISTR 5596 (control) สายพันธุ์ซึ่งผลิตเอทานอลสูง วิธีการจำแนกดังแสดงในภาพที่ 7





DNA ที่สกัดได้มาทำ PCR ใช้ ABI Prism™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Stafford, USA) เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของ D1/D2 ของ 26S rRNA gene ตามวิธีของ Kurtzman และ Robnett, 1998

ลำดับเบสของ primer ที่ใช้คือ

NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCC GAG, GAA AAG-3')

NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')

นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาทำ BLASTn Homology Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสกับ related species โดย CLUSTALX version 8

## ผลการทดลอง

### 1. ตัวอย่างเพื่อการแยกยีสต์

เก็บตัวอย่างจาก 13 แหล่ง คือ

- 1.1 ภายในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 1.2 โรงงานน้ำตาล 11 โรงงาน
- 1.3 ดินป่าพรุหนองจำรุง อ. แกลง จ. ระยอง

### 2. ผลการแยกยีสต์หมักเอทานอล

ชนิดของตัวอย่าง จำนวนยีสต์ที่แยกได้ โดยวิธี enrichment culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose, cellulose หรือ xylose เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการบ่มที่ 30°C และ 40°C แสดงในตาราง

#### 2.1 ตัวอย่างภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 11 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	เปลือกไม้ (โคนต้นจามจุรี)	-	-	-	-	-
2	เปลือกไม้ (ส่วนลำต้น)	-	-	-	-	-
3	เปลือกไม้ต้นหางนกยูง	-	-	-	-	-
4	เปลือกกล้วยเน่า (หน้าพระ)	6	1	1	4	12
5	เศษดิน+ใบไม้ (บริเวณ)	5	3	1	-	9
6	เปลือกไม้ต้นนนทรี	-	-	-	-	-
7	ดิน+ใบไม้ (หน้าตึกวิศวะ)	-	-	-	-	-
8	เปลือกไม้ (ต้นชงโค)	-	-	-	-	-
9	ขมพู่เน่า (บริเวณหน้าตึก)	5	1	1	1	8
10	Molass (จากโรงงาน)	1	1	-	1	3
11	Molass (โครงการ EM)	1	1	-	-	2
รวม		18	7	3	6	34
รวม Glucose		21	รวม Cellulose			13

## 2.2. ตัวอย่างจากโรงงานน้ำตาล

### 2.2.1 โรงงานน้ำตาลราชบุรี ทั้งหมด 28 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	กากอ้อยที่หลังจากเข้าลูกหีบ	3	2	3	2	10
2	น้ำ + กากอ้อย (ที่ 40°C)	1	1	1	2	5
3	น้ำบริเวณ filter cake	2	1	1	2	6
4	น้ำทิ้งจากระบบ	1	2	2	-	5
5	น้ำอ้อย	1	1	1	1	4
6	น้ำอ้อยชุดแรก	1	1	1	1	4
7	น้ำเชื่อมก่อนเข้า resin	1	1	-	3	5
8	น้ำจาก filter cake	1	-	1	1	3
9	น้ำทิ้งจากบ่อปัม บ่อที่ 1	1	1	1	-	3
10	กาก + น้ำ หลังหีบอ้อยที่ high	2	1	3	2	8
11	กากจากบ่อพักใส ก่อนต้ม	-	-	-	-	-
12	น้ำอ้อยหลังผ่านเครื่องหีบ	1	1	3	-	5
13	น้ำอ้อยที่ผ่านการฟอกขาวที่	1	2	-	-	3
14	กากอ้อย	2	3	3	1	9
15	กองใบอ้อยหน้าโรงงาน	1	1	3	3	8
16	กากอ้อยบริเวณลูกหีบ	3	3	3	2	11
17	ใบอ้อยบริเวณที่มีน้ำ	2	2	1	1	6
18	กากอ้อย	2	1	-	2	5
19	filter cake	-	-	1	2	3
20	ตะกอน filter cake	2	2	2	3	9
21	ดิน + กากอ้อยที่กองทิ้งไว้	1	2	1	-	4
22	น้ำบริเวณบันไดลูกหีบ	2	2	-	2	6
23	กากจากขั้นตอนการล้างปูนขาว	-	-	-	-	-
24	น้ำ + ตะกอนบริเวณลูกหีบ	2	-	1	1	4
25	เศษกากอ้อยหลังจากลูกหีบ	2	2	2	1	7
26	น้ำเสียบริเวณท่อน้ำทิ้ง	-	-	-	-	-
27	น้ำล้างถัง molass	1	2	1	-	4
28	น้ำบริเวณลูกหีบ	1	1	1	-	3
	รวม	37	37	37	34	145

2.2.2 โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	น้ำอ้อย	3	-	2	-	5
2	น้ำอ้อยบริเวณบ่อพัก 2	2	1	5	4	12
3	น้ำอ้อยบริเวณบ่อพัก ชุด 5	2	1	4	1	8
4	น้ำอ้อยบริเวณลูกหีบ ชุด 1	4	1	2	2	9
5	น้ำอ้อยบริเวณบ่อพัก ชุด 4	2	1	1	2	6
6	น้ำเสียบ่อแรก	1	1	1	2	5
7	น้ำอ้อย ที่ 70°C	1	2	1	1	5
8	น้ำโคลนที่มาจากบ่อพักใส	4	2	-	2	8
9	น้ำอ้อยชุดแรก	1	2	2	2	7
10	น้ำล้างบ่อ	1	1	3	3	8
11	C-massequite	1	-	-	-	1
12	กากอ้อย	2	3	3	4	12
13	ส่วนตะกอนที่ 70°C	2	2	-	2	6
14	molass จากบ่อพัก (ที่เดือด)	-	-	-	1	1
15	molass	1	1	1	-	3
16	filter cake	3	3	3	3	12
<b>รวม</b>		<b>30</b>	<b>21</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>108</b>
<b>รวม Glucose</b>		<b>58</b>	<b>รวม Cellulose</b>		<b>50</b>	

2.2.3 โรงงานไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	ตะกอนน้ำทิ้ง	2	2	1	2	7
2	น้ำบริเวณลูกหีบชุด 1	5	2	3	2	12
3	น้ำเชื่อมดิบ	1	2	1	3	7
4	first juice	2	1	3	4	10
5	น้ำทิ้ง	1	1	2	4	8
6	น้ำอ้อยที่มาจากกรสกัด	5	1	2	2	10
7	น้ำอ้อย	4	-	1	-	5
8	C-massequite	1	2	1	-	4
9	กากจากหม้อต้ม 105°C	4	2	2	2	10
10	filter cake	2	3	2	5	12
11	กากน้ำตาล	2	2	-	1	5
12	ตะกอนน้ำทิ้ง	1	1	3	4	9
13	น้ำทิ้งจากบ่อพัก	6	1	5	3	15
14	น้ำอ้อยใต้ลูกหีบด้านใน	2	4	3	3	12
15	น้ำบริเวณลูกหีบ	2	2	-	1	5
16	กากจากหม้อต้มที่ 105°C	4	1	2	3	10
17	กากจากหม้อต้มที่ 105°C	3	3	3	4	13
รวม		47	30	34	43	154
รวม Glucose		81	รวม Cellulose			73

### 2.2.4 โรงงานน้ำตาลสุรินทร์ ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	น้ำทิ้ง บ่อ 1	1	2	2	2	7
2	น้ำทิ้งบริเวณลูกหีบ	1	2	1	1	5
3	น้ำอ้อยบริเวณ ลูกหีบ	3	1	1	1	6
4	กากอ้อย	1	2	2	2	7
5	filter cake	1	2	1	3	7
6	น้ำบริเวณ filter cake	2	2	1	2	7
7	filter cake	2	2	2	2	8
รวม		11	13	10	13	47
รวม Glucose		21	รวม Cellulose			26

### 2.2.5 โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	น้ำอ้อยชุด 1	1	1	2	1	5
2	น้ำบริเวณท่อตรงลูกหีบชุด	-	1	1	1	3
3	น้ำบริเวณหม้อกรอง 80°C	-	1	1	1	3
4	น้ำบ่อน้ำเสีย บ่อที่ 1	1	1	1	1	4
5	น้ำอ้อยบริเวณที่หีบ	1	1	2	1	5
6	น้ำจากท่อน้ำทิ้ง (ร้อน)	1	2	2	1	6
7	กากอ้อยที่ติดฝ้าหม้อกรอง	-	1	1	2	4
8	น้ำใต้ลูกหีบ	-	1	1	1	3
9	น้ำทิ้งหน้าลูกหีบชุด 2	1	1	2	3	7
รวม		5	10	13	12	40
รวม Glucose		18	รวม Cellulose			22

### 2.2.6 โรงงานน้ำตาลครบุรี ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	น้ำอ้อย ชูค 1	1	1	1	2	5
2	น้ำอ้อยจากบ่อ	1	1	3	1	6
3	น้ำทิ้งจากลูกหีบ	2	1	1	1	5
4	น้ำทิ้งจากระบบ	3	1	3	1	8
5	น้ำอ้อยจากลูกหีบ	2	1	1	1	5
6	น้ำอ้อย (ในหม้อต้ม)	1	1	2	1	5
7	น้ำทิ้งบริเวณลูกหีบชูค 4	2	1	2	2	7
8	น้ำชีโคลน	1	3	2	1	7
9	น้ำทิ้งจากหม้อต้ม	-	1	1	1	3
10	น้ำทิ้งจากหม้อเดียว	1	2	2	1	6
11	filter cake	3	1	1	1	6
12	Bagassilo	2	2	2	1	7
13	ทราย (บริเวณถังคักทราย)	3	1	3	1	8
รวม		22	17	24	15	78
รวม Glucose		46	รวม Cellulose			32

### 2.2.7 โรงงานน้ำตาลอีสาน ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	น้ำทิ้งจากระบบ	1	1	1	1	4
2	น้ำอ้อย	2	2	1	1	6
3	น้ำเสียบ่อ 1	1	1	1	2	5
4	ตะกอนบริเวณบ่อน้ำทิ้ง	2	1	1	1	5
5	เศษใบ + กากอ้อย	1	1	1	1	4
6	กากอ้อย	2	1	1	1	5
รวม		9	7	6	7	29
		15	รวม Cellulose			14

### 2.2.8 โรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์ ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	น้ำทิ้งจากร่องน้ำ	1	2	1	2	6
2	น้ำ + กากอ้อย (filter cake)	1	2	1	1	5
3	น้ำทิ้งจากท่อ	1	2	2	1	6
4	น้ำทิ้ง (บริเวณหน้าโรงงาน)	4	2	1	2	9
5	น้ำอ้อย	1	1	1	1	4
6	กากอ้อย	1	1	1	1	4
7	กากอ้อย (บริเวณลูกหีบ)	3	1	1	1	6
8	น้ำจากบ่อน้ำทิ้ง 4	1	2	1	2	6
9	กากอ้อย (บริเวณบ่อพักไส)	1	3	1	1	6
รวม		14	16	10	12	52
รวม Glucose		24	รวม Cellulose			28

### 2.2.9 โรงงานน้ำตาลราชสีมา ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	น้ำทิ้งจากลูกหีบ ชุด 1	1	1	1	1	4
2	น้ำอ้อยชุด 1	1	2	1	1	5
3	น้ำทิ้งจากระบบ	1	1	1	1	4
4	น้ำอ้อย	1	2	1	1	5
5	น้ำทิ้งจากลูกหีบ ชุด 1 รวง 2	2	1	1	1	5
6	กากอ้อย	1	1	1	3	6
7	กากอ้อยจากหม้อกรอง	2	2	1	2	7
8	กากอ้อยจากลูกหีบ ชุด 1	2	2	1	2	7
9	กากอ้อยจากหม้อพักไส	1	1	1	2	5
10	ทรายบริเวณถังน้ำอ้อย ชุด 1	1	1	3	1	6
รวม		13	14	12	15	54
รวม Glucose		25	รวม Cellulose			29



2.2.10 โรงงานน้ำตาลที่เอ็น ทั้งหมด 21 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	ชี้เค็กเก่า (หมักแล้ว)	1	-	-	1	2
2	ชี้เค็กใหม่	2	2	1	1	6
3	น้ำอ้อย ลูกหีบชุดแรก	3	2	1	3	9
4	น้ำทิ้งบริเวณทางเข้า	2	2	3	2	9
5	น้ำอ้อย	2	2	-	-	4
6	น้ำอ้อยด้านนอก (refine)	1	1	-	-	2
7	ตะกอน ที่ 70 °C	1	-	-	-	1
8	กากอ้อยจากลูกหีบชุด 1	3	1	3	2	9
9	น้ำจากรางบริเวณถัง remelt	4	1	-	-	5
10	น้ำอ้อยที่กรองใส	2	4	3	2	11
11	กากอ้อย (ลูกหีบชุด 1)	1	-	-	-	1
12	น้ำเชื่อม	1	2	2	1	6
13	ตะกอน (63°C ถึง 1)	1	1	1	-	3
14	ตะกอน (63°C ถึง 2)	-	-	-	-	-
15	น้ำจากรางบริเวณถัง remelt	2	1	1	1	5
16	น้ำทิ้ง	-	2	2	1	5
17	น้ำเชื่อม (remelt sugar tank)	2	2	1	1	6
18	กากอ้อยจากลูกหีบชุดแรก	3	1	3	2	9
19	น้ำจากลูกหีบชุดแรก	4	2	4	2	12
20	น้ำอ้อย	3	1	3	2	9
21	กากอ้อยจากลูกหีบ	-	-	-	-	-
รวม		38	27	28	21	114
รวม Glucose		66	รวม Cellulose		48	

2.2.11 โรงงานน้ำตาลสระบุรี ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C		จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 40°C		รวม
		Glucose	Cellulose	Glucose	Cellulose	
1	น้ำทิ้งจากร่องน้ำ	1	3	-	1	5
2	โคลนบริเวณร่องน้ำ	2	2	1	1	6
3	first molass	3	2	-	1	6
4	กากอ้อย	2	1	-	-	3
5	แอ่งน้ำเน่าบริเวณ โรงงาน	4	2	1	2	9
6	final molass	-	2	1	3	6
7	final molass	1	1	1	1	4
8	น้ำวนในระบบ	1	2	3	3	9
9	น้ำทิ้งบริเวณท่อระบายน้ำ	1	2	2	1	6
10	น้ำทิ้งบริเวณท่อระบายน้ำ	3	3	2	2	10
11	น้ำทิ้งจากร่องน้ำ	-	2	1	2	5
12	น้ำอ้อย	-	1	1	2	4
13	ท่อระบายน้ำจากหม้อป่น	-	1	-	1	2
14	น้ำอ้อย	2	2	2	2	8
15	ท่อระบายน้ำจากหม้อป่น	-	1	2	1	4
16	final molass (real)	3	1	2	-	6
17	น้ำอ้อยจากลูกหีบ	3	1	1	1	6
18	น้ำบริเวณร่องน้ำ (ร้อน)	-	-	-	-	-
19	น้ำอ้อยจากลูกหีบ 2	1	1	2	1	5
20	น้ำทิ้งบริเวณลูกหีบ 1	5	2	2	3	12
21	น้ำบริเวณพื้นใน โรงงาน	3	2	1	1	7
22	น้ำในร่องน้ำร้อน	2	1	1	3	7
23	โคลนที่พื้นใน โรงงาน	1	1	1	1	4
รวม		38	36	27	33	134
รวม Glucose		65	รวม Cellulose		69	

2.3 ตัวอย่างดินป่าพรุหนองจำรุง อ. แกลง จ. ระยอง ทั้งหมด 59 ตัวอย่าง

โซนที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C				รวม	
		Glucose	Cellulose	Xylose	24% Glucose		
1	บ่อ วว. 4	2	2	1	1	6	
	บ่อ วว. 5	2	2	1	-	5	
	บ่อ วว. 6	1	3	-	2	6	
	ไต้ดินกระโคน	-	1	1	4	6	
	ในหนองน้ำ	1	2	1	1	5	
	ไต้ดินไม้	1	1	1	1	4	
	ข้างเกาะกลางบึง	1	1	1	2	5	
	ริมบ่อ วว.1	1	1	1	2	5	
	ดินริมทางเดิน	1	1	-	1	3	
	บ่อ วว. 3	2	3	-	1	6	
	บนเกาะกลางบึง	1	2	-	2	5	
	ไต้คอไม้	1	-	-	2	3	
	ก้นบ่อป่าเสม็ด	-	1	-	2	3	
	บ่อ วว. 2	-	2	-	1	3	
	2	บ่อ วว.7	1	1	2	3	7
		บ่อ วว.8	1	2	1	3	7
บ่อธรรมชาติ		1	1	2	1	5	
บ่อน้ำธรรมชาติ		1	1	1	1	4	
บ่อน้ำธรรมชาติ		1	1	1	2	5	
บ่อ วว.9		1	2	1	-	4	
ดินขอบบ่อ		1	1	2	2	6	
ดินไต้กอไม้		2	1	2	1	6	
3		บ่อธรรมชาติ ป่าเสม็ดคึกค้ำ	-	-	3	1	4
	บ่อ วว.10	1	1	-	3	5	
	บ่อ วว.11	1	2	1	-	4	
	บ่อ วว.12	1	1	1	1	4	
	บึงธรรมชาติ	-	1	-	-	1	
	ดินและเศษหญ้าริมทางเดิน	-	-	-	3	3	
4	ไต้ดินหวาย	-	2	1	1	4	

โซนที่	รวมชนิดตัวอย่าง	43	จำนวนเชื้อที่แยกได้ที่ 30°C			85	232 รวม
		Glucose	Cellulose	Xylose	24% Glucose		
4	ได้พุ่มเฟิร์น	-	1	1	2	4	
	ได้กอไม้	1	4	1	2	8	
	ได้ต้นไม้	-	2	-	1	3	
	ได้ต้นนนทรี	-	2	-	2	4	
	ได้ต้นเฟิร์น	2	2	-	2	6	
	ได้ต้นไม้	-	-	-	2	2	
	ดินริมทางเดิน	-	2	-	2	4	
	5	บ่อ วว.13	1	1	1	2	5
บ่อ วว.14	-	3	-	1	4		
บ่อ วว.15	1	1	1	1	4		
เวียง	-	1	1	1	3		
บ่อธรรมชาติ	-	2	-	-	2		
ก้นบ่อ	-	1	-	2	3		
เวียง	1	-	-	1	2		
ดินและเศษหญ้า	-	1	-	1	2		
จุดแวะพัก	1	1	-	2	4		
ก้นบ่อ	1	1	-	1	3		
บ่อน้ำเค็ม	1	-	-	1	2		
ดินเค็ม	-	1	-	-	1		
ดินเค็ม	-	3	-	2	5		
บ่อธรรมชาติ	1	1	-	2	4		
กอหญ้าริมน้ำ	1	1	-	2	4		
บ่อ วว.16	-	1	-	1	2		
ดินเค็ม	-	1	-	-	1		
ดินเค็ม	1	1	-	1	3		
บ่อธรรมชาติ	3	1	-	1	5		
6	ริมบึง	-	1	-	2	3	
7	บ่อ วว.17	-	1	-	1	2	
	ดินได้ต้นพยอม	1	3	-	1	5	
8	ในป่า	-	-	1	2	3	

ตัวอย่างจาก 13 แหล่ง รวม 228 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 1,175 เชื้อ สามารถเจริญบน glucose medium รวมทั้งหมด 681 เชื้อ เจริญบน cellulose medium รวมทั้งหมด 494 เชื้อ และเจริญบน xylose medium รวมทั้งหมด 31 เชื้อ สามารถแยกเชื้อโดยรวมจากแต่ละแหล่งได้ดังนี้

แหล่ง	Glucose	Cellulose	Xylose
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	21	13	-
โรงงานน้ำตาลราชบุรี	58	64	-
โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม	56	36	-
โรงงานไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล	87	55	-
โรงงานน้ำตาลสุรินทร์	33	26	-
โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช	28	22	-
โรงงานน้ำตาลนครบุรี	45	29	-
โรงงานน้ำตาลอีสาน	14	13	-
โรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์	24	26	-
โรงงานน้ำตาลราชสีมา	33	26	-
โรงงานน้ำตาลที่อื่น	62	44	-
โรงงานน้ำตาลสระบุรี	75	65	-
ป่าพรุหนองจี่รุง อ.แกลง จ.ระยอง	128	73	31
รวม	681	494	31

เชื้อที่ได้จากแต่ละแหล่ง แยกตามการเจริญบนอาหารกลูโคส เซลลูโลส และไซโลสที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ซึ่งมีลักษณะ โคโลนี และ โค้ดดังนี้

จุฬาฯ : C อาหารกลูโคส: G ตัวอย่างที่: 1 เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1 = CG1(1)

โรงงานน้ำตาลโรงที่: 1 อาหารกลูโคส: G ตัวอย่างที่: 1 เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1 = G1-1(1)

จุฬาฯ : C อาหารเซลลูโลส: C ตัวอย่างที่: 1 เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1 = CC1(1)

โรงงานน้ำตาลโรงที่: 1 อาหารเซลลูโลส: C ตัวอย่างที่: 1 เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1 = C1-1(1)

อาหารกลูโคส: KG โชนที่: 1 ตัวอย่างที่: 1 เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1 = KG1-1(1)

อาหารเซลลูโลส: KC โชนที่: 1 ตัวอย่างที่: 1 เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1 = KC1-1(1)

ตัวอย่างบริเวณเก็บตัวอย่างที่: Z 1 จุดเก็บที่: 1 เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1 = Z 1-1-1

ป่าพรุหนองจี่รุง: N บริเวณที่: 1 ตัวอย่างที่: 1 เชื้อที่แยกได้ตัวที่: (1) = NI-1(1)

2. การคัดแยกยีสต์ทนแรงดันออสโมติกที่สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส 24% (w/v)

นำยีสต์ซึ่งหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 ซึ่งแยกได้จาก 2 แหล่ง คือ

1. ตัวอย่างที่มาจากจุฬาฯ
2. ตัวอย่างที่มาจากโรงงานน้ำตาล 8 โรงงาน

มาคัดกรองหายีสต์ทนแรงดันออสโมติกสูงซึ่งสามารถหมักเอทานอล โดยเชื้อที่คัดแยกจาก 9 แหล่งพบว่า มีเชื้อที่แยกได้บน glucose medium ซึ่งสามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h จำนวน 22 เชื้อ และมีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h จำนวน 42 เชื้อ ตามรายละเอียดดังนี้

แหล่ง	Glucose	
	30°C	40°C
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	-	2
โรงงานที่ 1 โรงงานน้ำตาลราชบุรี	7	10
โรงงานที่ 2 โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม	7	8
โรงงานที่ 3 โรงงานไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล	1	5
โรงงานที่ 4 โรงงานน้ำตาลสุรินทร์	-	1
โรงงานที่ 5 โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช	-	2
โรงงานที่ 6 โรงงานน้ำตาลครบุรี	4	10
โรงงานที่ 7 โรงงานน้ำตาลอีสาน	1	-
โรงงานที่ 8 โรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์	2	4
<b>รวม</b>	<b>22</b>	<b>42</b>
<b>รวมทั้งหมด</b>	<b>64</b>	

เชื้อที่ได้จากแต่ละแหล่ง แยกตามการเจริญบนอาหารกลูโคส ที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ซึ่งมีลักษณะโคโลนี และโค็ดดังนี้

จุฬาฯ: C    อาหารกลูโคส: G    ตัวอย่างที่: 1    เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1    =    CG1(1)

โรงงานน้ำตาลโรงที่1: 1    อาหารกลูโคส: G    ตัวอย่างที่: 1    เชื้อที่แยกได้ตัวที่: 1    =    G1-1(1)

## ลักษณะเชื้อ

### 2.1 เชื้อที่แยกได้จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
CG4(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
CG4(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ
CG4(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
CG4(4)	กลม นูน สีขาวออกเหลืองๆ ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
CG4(5)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
CG4(6)	กลม แบน สีครีม ขอบหัก โคโลนีด้าน
CG5(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
CG5(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน บริเวณขอบนูน ตรงกลางโคโลนีปุ่ม
CG5(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมีลักษณะเป็นจิบหักๆ
CG5(4)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
CG5(5)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมีลักษณะเป็นจิบหักๆ
CG9(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
CG9(2)	กลม นูน สีครีม ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
CG9(3)	กลม นูน สีขาว ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
CG9(4)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
CG9(5)	กลม นูน สีขาวออกครีม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
CG10(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ
CG11(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
CG4(1)	กลม นูน สีครีม ขอบหัก โคโลนีด้าน
CG5(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
CG9(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
CC4(1)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน
CC5(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
CC5(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
CC5(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
CC9(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
CC10(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็กมาก
CC11(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
CC4(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
CC4(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ
CC4(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
CC4(4)	กลม สีครีม ขอบเรียบตรงกลางนูน
CC9(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
CC10(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน



## 2.2 ตัวอย่างจากโรงงานน้ำตาล

### 2.2.1 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชบุรี ทั้งหมด 28 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G1-1(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G1-1(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-1(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-2	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G1-3(1)	กลม นูน สีครีม ขอบหัก โคโลนีมัน
G1-3(2)	กลม นูน สีครีมกลางโคโลนีนูนเป็นสันน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-4	กลม นูน สีครีม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G1-5	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-6	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G1-7	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-8	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-9	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีเล็ก ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-10(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-10(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-12(1)	กลม นูน สีส้ม ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-13(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-14(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-14(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-15	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-16(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-16(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-16(3)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-17(1)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-17(2)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-18(1)	กลม แบน สีครีมอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-18(2)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-20(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-20(2)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-21	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G1-22(0)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-22(2)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-24(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ทึบแสง
G1-24(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน โปร่งแสง
G1-25(1)	กลม นูน สีครีม ขอบหยัก โคโลนีด้าน
G1-25(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-27	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-28	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G1-1(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบหยัก โคโลนีด้าน
G1-1(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-1(3)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-2(2)	กลม นูน สีครีม ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-3(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-4(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-4(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-5	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-6	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-8	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-9	กลม นูน สีครีม โคโลนีเป็นจิบ ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-10(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-10(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G1-10(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-12(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-12(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-12(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G1-14(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-14(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-14(3)	กลม นูน สีขาวออกครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-15(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-15(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-15(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-16(1)	กลม นูน สีเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-16(2)	กลม นูน สีเหลือง โคโลนีใหญ่ ด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-16(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-17	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-19	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-20(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-20(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-21	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-24	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-25(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-25(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-27	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-28	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C1-1(1)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-1(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-2	กลม แบน บริเวณกลางโคโลนีนูนแหลม สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ
C1-3(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-4(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-4(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-5	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีด้าน
C1-6	กลม แบน สีขาว โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-7	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-9	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-12	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-13	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-14(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-14(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-14(3)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-15	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-16(1)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีม โคโลนีด้าน
C1-16(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ
C1-16(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
C1-17(1)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-17(2)	กลม แบนกลางโคโลนีนูน สีครีมอมส้ม โคโลนีเข้ม
C1-18	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-20(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C1-20(2)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-21(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-21(2)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-22(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-22(2)	กลม แบนกลางโคโลนีนูนสีน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-25(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-25(2)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-27(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C1-27(2)	กลม แบนกลางโคโลนีนูนสีครีมอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C1-1(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-1(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-2(1)	กลม แบน สีขาว ขอบหยัก โคโลนีด้าน
C1-2(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-3(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-3(3)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-4(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-4(2)	กลม นูน สีครีม ขอบหยัก โคโลนีมัน
C1-5	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-6	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-7(1)	กลม แบน สีครีม ขอบหยัก ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-7(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-7(3)	กลม แบน สีขาว ขอบหยัก โคโลนีด้าน
C1-8	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-10(1)	กลม แบน สีขาว ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-10(2)	กลม แบน สีขาวออกครีม ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-14	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-15(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-15(2)	กลม แบน สีครีม ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C1-15(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-16(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-16(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-17	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-18(1)	กลม แบน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-18(2)	กลม แบน สีครีมออกน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-19(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-19(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-20(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-20(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C1-20(3)	กลม นูน สีขาวออกครีม โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C1-22(2)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-22(3)	กลม แบน สีขาว ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบ โคโลนี
C1-24	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-25	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

2.2.2 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G2-1(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G2-1(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-1(3)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-2	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-3(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-3(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-4(1)	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-4(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-4(3)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-5(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-5(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-6	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-7	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-8(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-8(2)	กลม นูน กลางโคโลนีเป็นหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-8(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-8(4)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-9	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-10	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-11	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-12(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-12(2)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-13(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-13(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-15	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-16(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-16(2)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-16(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G2-1(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-1(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-2(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-2(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-2(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-2(4)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-2(5)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-3(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-3(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-3(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-3(4)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-4(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-4(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-5	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
G2-6	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-7	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-8(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-8(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-9(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-9(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-10(1)	กลม นูน สีเหลืองทอง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-10(2)	กลม นูน สีส้มอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-10(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-12(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-12(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-12(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-15	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-16(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ มัน
G2-16(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G2-16(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน



ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C2-2	กลม นูน สีส้มอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-3	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-4	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-5	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-6	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-7(1)	กลม แบนกลาง โคโลนีนูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-7(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-8(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-8(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-9(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-9(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-10	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-12(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C1-12(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C1-12(3)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-13(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-13(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-15	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-16(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-16(2)	กลม แบน สีครีมอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C2-16(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C2-2(1)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C2-2(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-3	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-4	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C2-5	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-6(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-6(2)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-7	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C2-8(2)	กลม แบน สีขาว ขอบหยัก โคโลนีด้าน
C2-9(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-9(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-10(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C2-10(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-12(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C2-12(2)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-13(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C2-13(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C2-16	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

2.2.3 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G3-1(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-1(2)	กลม นูนกลางโคโลนีหัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-1(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-1(4)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-2(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-2(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเข้ม
G3-2(3)	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-2(4)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-2(5)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-3(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-3(2)	กลม แบน สีครีม ขอบหัก โคโลนีด้าน
G3-4(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-4(2)	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-5	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G3-6(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-6(2)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-6(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-6(4)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-6(5)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-6(6)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
G3-6(7)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-7(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-7(2)	กลม นูน สีครีมอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-7(3)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-7(4)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-8	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-9(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-9(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเข้ม
G3-9(4)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G3-10(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-10(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-10(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-11(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-11(2)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-12	กลม นูน สีครีม ขอบโคโลนีโปร่งตรงกลางทึบแสง
G3-13(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-13(2)	กลม นูน สีครีมออกน้ำตาล ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-13(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-13(4)	กลม นูน สีครีม ขอบโคโลนีโปร่งตรงกลางทึบแสง โคโลนีด้าน
G3-13(5)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-13(6)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-14(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-14(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-15(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-15(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-16(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
G3-16(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G3-16(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ มัน
G3-16(4)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
G3-17(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-17(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-17(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G3-1	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-2(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-2(2)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-2(3)	กลม นูน สีครีมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-3	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-4(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-4(2)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-4(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-4(4)	กลม แบน สีขาวออกครีม โคโลนีด้าน
G3-5(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G3-6(1)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-6(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-7	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-8	กลม นูน สีเหลือง ขอบหยัก โคโลนีด้าน
G3-9(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G3-9(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ มัน
G3-10(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-10(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-10(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-12(1)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-12(2)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-13(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-13(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีมัน
G3-13(3)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-13(4)	กลม นูน สีขาว โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G3-13(5)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-14(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-14(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-16(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-16(2)	กลม นูน ขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-16(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-17(1)	กลม แบน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G3-17(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-17(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C3-1(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-1(2)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-2(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-2(2)	กลม แบน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-3(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-3(2)	กลม แบน สีครีมอมส้ม ขอบหยัก โคโลนีด้าน
C3-4	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกลมารอบโคโลนี
C3-5	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-6	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-8(1)	กลม แบน สีครีมอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-8(2)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-9(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-9(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-10(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-10(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-10(3)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-11(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-11(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-12	กลม แบน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-13	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-14(1)	กลม แบน สีเหลืองอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-14(2)	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-14(3)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-14(4)	กลม นูน ใส โปร่งแสง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C1-15(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเข้ม
C1-15(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-16	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-17(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-17(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-17(3)	กลม นูน สีครีม ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกลมารอบโคโลนี

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C3-1(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-1(2)	กลม แบน กลางโคโลนีนูน สีครีม โคโลนีมัน
C3-2(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-2(2)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-3(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C3-3(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C3-3(3)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีขาว โคโลนีมัน
C3-4(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-4(2)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-4(3)	กลม นูนกลางโคโลนีปุ่ม สีครีมอมส้ม ขอบหยัก โคโลนีมัน
C3-4(4)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบโคโลนีมัน
C3-4(5)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบโคโลนีด้าน
C3-5(1)	กลม นูนกลางโคโลนีปุ่ม สีครีมอมส้ม โคโลนีใหญ่ ด้าน
C3-5(2)	กลม แบน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C3-5(3)	กลม แบนกลางโคโลนีนูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-5(4)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-6(1)	กลม แบน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน
C3-6(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมีลักษณะเป็นจีบหยักๆ
C3-9(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-9(2)	กลม นูนกลางโคโลนีปุ่ม สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-10(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-10(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
C3-10(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-10(4)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-10(5)	กลม แบน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่
C3-11	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C3-12(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีเล็ก มัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-12(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีเล็ก มัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-12(3)	กลม นูน สีขาว ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
C3-12(4)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C3-13(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-13(2)	กลม แบน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-13(3)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-14(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-14(2)	กลม แบน สีครีม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-14(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-15	กลม แบน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-16(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C3-16(2)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-16(3)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-17(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-17(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C3-17(3)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C3-17(4)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน



2.2.4 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลสุรินทร์ ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G4-1(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-1(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-2(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-2(2)	กลม นูน สี ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-2(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-3(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-3(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-3(3)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-4(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-4(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-4(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-5(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-5(2)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-5(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-6(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-6(2)	กลม นูน สีเหลืองอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-7(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G4-7(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G4-1(1)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-1(2)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-2	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-3(1)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-3(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-4(1)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-4(2)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-4(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-5(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-5(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-5(3)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-6(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G4-6(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G4-7(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G4-7(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G4-7(3)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G4-7(4)	กลม นูน สีครีม ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C4-1(1)	กลม นูน สีเขียวเข้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-1(2)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-2(1)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-2(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-3	กลม แบน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C4-4(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-4(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C4-5(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-5(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-6(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-6(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-7(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-7(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C4-1(1)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-1 (2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-2	กลม แบน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-3	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-4(1)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-4(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-5(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C4-5(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-5(3)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-6(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C4-6(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C4-7(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C4-7(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

2.2.5 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G5-1(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-1(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G5-1(3)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-4(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G5-4(2)	กลม แบน สีครีม ขอบหัก โคโลนีด้าน
G5-5(1)	กลม นูนกลางโคโลนีหัก สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-5(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G5-5(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-6(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G5-6(2)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-7(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-7(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมีลักษณะเป็นจิบหักๆ
G5-9(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-9(2)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G5-9(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G5-9(4)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน

เชื้อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G5-1	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-5(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-5(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G5-6(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-6(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-7(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G5-7(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-7(3)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-9(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G5-9(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-9(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C5-1	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C5-4	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C5-5	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C5-6(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ
C5-6(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C5-7	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C5-8	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C5-9	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C5-1(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C5-4	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C5-5	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C5-6	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C5-7(1)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C5-7(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C5-8	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C5-9(1)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C5-9(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C5-9(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

2.2.6 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลนครบุรี ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G6-1	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-2	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-3(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-3(2)	กลม นูน สีครีมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-4(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-4(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G6-4(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-5(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-5(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-6	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-7(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G6-7(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-8(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-8(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-9(1)	กลม นูน สีขาวออกเหลืองๆ ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-9(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-10	กลม นูน สีครีมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-11(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
G6-11(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-11(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-12(1)	กลม นูน สีครีมเหลือง ขอบเรียบ
G6-12(2)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-13(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-13(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-13(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G6-2(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G6-2(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-2(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-3	กลม นูน สีเหลืองอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-4(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-4(2)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน
G6-4(3)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-5	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-6(1)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-6(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-7	กลม นูน สีครีมอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-8(1)	กลม แบนกลางโคโลนีนูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-8(2)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
G6-9(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-10(1)	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-10(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G6-11	กลม นูน สีเหลืองอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-12	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-13(1)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-13(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C6-1	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-2	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-3(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-3(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ
C6-4	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-5	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C6-6	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-7	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-8(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-8(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-8(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C6-9	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-10(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-10(2)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-11	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-12(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C6-12(2)	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-13	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน



ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C6-1(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
C6-1 (2)	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-2	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-3	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-4	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ม้วน
C6-5	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-6	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-7(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-7(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-8	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-9	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-10	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ม้วน
C6-11	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C6-12	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C6-13	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

2.2.7 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอีสาน ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G7-1	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G7-2(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G7-2(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G7-3(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G7-3(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G7-4(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G7-4(2)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G7-4(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G7-6(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G7-6(2)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

เชื้อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G7-1	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G7-2	กลม แบนกลาง โคโลนีนูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G7-3(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G7-3(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G7-6	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C7-1	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C7-2(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C7-2(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C7-3	กลม นูน สีขาวออกเหลืองๆ ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C7-4	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C7-5	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C7-6	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C7-1	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C7-2	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C7-3(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C7-3(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C7-4	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C7-5	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C7-6	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน

2.2.8 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์ ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G8-1	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-2	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-3	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-4(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-4(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-4(4)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-5	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-6	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-7(1)	กลม นูน สีเหลืองอมน้ำตาล ขอบ
G8-7(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-8	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-9	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

เชื้อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G8-1	กลม แบนกลางโคโลนีนูน สีส้มอมน้ำตาล โคโลนีด้าน
G8-2	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-3(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-3(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-4	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-5(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-5(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-6	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-7	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-8	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-9(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-9(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C8-1(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C8-1(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C8-2(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C8-2(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C8-3(1)	กลม นูน สีขาวออกเหลืองๆ ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C8-3(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C8-4(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C8-4(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C8-5	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C8-6	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C8-7	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C8-8(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C8-8(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ ด้าน
C8-9(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C8-9(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C8-9(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C8-1(1)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C8-1(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C8-2	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C8-3	กลม นูน สีขาวออกเหลืองๆ ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C8-4(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C8-4(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ ขอบเรียบ
C8-5	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C8-6	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C8-7	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C8-8(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C8-8(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C8-9	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน

2.2.9 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชสีมา ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G9-1	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-2(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-2(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-3(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G9-3(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-4	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-5(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-5(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-5(3)	กลม นูนกลาง โคโลนีนุ่ม สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-5(4)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
G9-6(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-6(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-7(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-7(2)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-8(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-8(2)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-9	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-10	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G9-1	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G9-2	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-3	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-4	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-5(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-5(2)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-6	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-7(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-7(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G9-8	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-9(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-9(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-10(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G9-10(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G9-10(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C9-1	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-2(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-2(2)	กลม นูน สีส้มอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-3	กลม นูน สีขาวออกเหลืองๆ ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-4(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-4(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-5	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-6	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
C9-7(1)	กลม แบน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-7(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-8(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-8(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-9	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C9-1	กลม แบน สีเหลืองครีม โคโลนีเล็ก ด้าน
C9-2	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-3	กลม นูน สีขาวออกเหลืองๆ ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-4	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-5	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-6(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-6(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-6(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-7(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C9-7(2)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-8(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-8(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-9(1)	กลม นูน สีขาวขอบเรียบ โคโลนีมัน
C9-9(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C9-10	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน



2.2.10 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลที่เอ็น ทั้งหมด 21 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G10-2(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G10-2(2)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
G10-3(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-3(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-3(3)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-4(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-4(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-5(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-5(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-5(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G1-6	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-8(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
G10-8(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-8(3)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-9(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้านเล็ก มั่น
G10-9(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-9(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-9(4)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-10(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-10(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-11	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-12	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-13	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-15(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-15(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
G10-17(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G10-17(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-18(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G10-18(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-18(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G10-19(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-19(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-19(3)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-19(4)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-20(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-20(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-20(3)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G10-2	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-3	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-4(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-4(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-4(3)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-8(1)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-8(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-10(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-10(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-10(3)	กลม นูน สีขาว โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G10-12	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-13(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-13(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G10-15	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ
G10-16(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-16(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-16(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-17	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ มัน
G10-18(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G10-19(1)	กลม นูนกลาง โคโลนีหยัก สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-19(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G10-19(3)	กลม แบน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G10-19(4)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-20(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G10-20(3)	กลม แบน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C10-2(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-2(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C10-3(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-3(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-4(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-4(2)	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-5(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-5(2)	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-6	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-8	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-9	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C10-10(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-10(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-10(3)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-10(4)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C10-12(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-12(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C10-13	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C10-15	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C10-16(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-16(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C10-17(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-17(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C10-18	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-19(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-19(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-20	กลม แบน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C10-1	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C10-2	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C10-3(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-3(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-3(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-4(1)	กลม แบน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-4(2)	กลม นูน สีเหลืองครีมขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C10-8(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-8(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-10(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-10(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-12	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-15	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-16	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C10-17	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมีเล็ก มั่น
C10-18(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมีมัน
C10-18(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-19(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมีมัน
C10-19(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C10-20(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมีมัน
C10-20(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

2.2.11 เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลสระบุรี ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G11-1	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-2(1)	กลม แบน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-2(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
G11-3(1)	กลม นูน สีขาวออกเหลืองๆ ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-3(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-3(3)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-4(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-4(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-5(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G11-5(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-5(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-6(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-6(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-7	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-8	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-9	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-10(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-10(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-10(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-11	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-12(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G11-12(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-13	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-14(1)	กลม นูน สีขาว ออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-14(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-15(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-15(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-16(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-16(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลืองขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-16(3)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
G11-17(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-17(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-17(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลืองขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-19	กลม แบนกลางโคโลนีนูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-20(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-20(2)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-20(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-20(4)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-21(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-21(2)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-21(3)	กลม แบน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-22(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-22(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-23	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G11-2	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G11-5	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-6	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
G11-6	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ มัน
G11-7	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G11-8(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-8(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G11-8(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-9(1)	กลม นูน สีขาวออกเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-9(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-10(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G11-10(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G11-11(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G11-11(2)	กลม นูน สีขาวออกครีม โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G11-12	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G11-14(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-14(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-15(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-15(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-15(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G11-16(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-16(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-17	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-19(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-19(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-20(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-20(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G11-21(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G11-21(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G11-21(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G11-22	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-23(1)	กลม นูน สีขาวออกครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
G1-23(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C11-1(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-1(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-1(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-2(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-2(2)	กลม แบน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-3(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-3(2)	กลม แบน สีครีมขอบเรียบ อมเหลือง โคโลนีด้าน
C11-4	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-5(1)	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเข้ม ใส
C11-5(2)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-6(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C11-6(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-7	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-8(1)	กลม นูน ขอบเรียบ สีเหลืองครีม โคโลนีเล็ก มัน
C11-8(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C11-9(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-9(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C11-10(1)	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ เข้ม
C11-10(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-10(3)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-11(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-11(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-12	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-13	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-14(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C11-14(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-15	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-16	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C11-17	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-19	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-20(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก ด้าน
C11-20(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน



ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
C1-21(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-21(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-22	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C1-23	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C11-2	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C11-3	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-5(1)	กลม แบน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-5(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-6(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-6(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-6(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-7	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C11-8(1)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-8(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C11-8(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-9	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-10(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-10(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-11(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C11-11(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C11-12(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-12(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-13	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-14(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-14(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
C11-15	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
C11-17	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
C11-19	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-20(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C11-20(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-20(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
C11-21	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-22(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-22(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
C11-22(3)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
C11-23	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

## 2.3 เชื้อที่แยกได้จากป่าพรุหนองจำรุง

### 2.3.1 เชื้อที่เจริญบนอาหารกลูโคสและเซเลกูโลส (10% w/v)

#### 2.3.1.1 โซนที่ 1

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KG1-1(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีมัน
KG1-1(2)	กลม นูน สีครีม โคโลนีมัน
KG1-2(1)	กลม แบน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KG1-2(2)	กลม นูน สีขาว โคโลนีมัน
KG1-3(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบใส โคโลนีมัน
KG1-5(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
KG1-6(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบสีขาว โคโลนีเล็ก มัน
KG1-7(1)	กลม นูน สีขาวอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
KG1-8(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KG1-9(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
KG1-10(1)	กลม นูน สีขาว ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
KG1-10(2)	กลม นูน สีเหลือง โคโลนีมัน สร้างรงควัตถุสีเขียว
KG1-11(1)	กลม เข้ม สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KG1-12(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีมัน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KCI-1(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มั่น
KCI-1(2)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีด้าน
KCI-2(1)	กลม นูน สีม่วงเข้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KCI-2(2)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
KCI-3(1)	กลม นูน สีเขียว โคโลนีมัน
KCI-3(2)	กลม นูน สีครีม โคโลนีมัน
KCI-3(3)	กลม นูน สีครีม ขอบหยัก โคโลนีด้าน
KCI-4(1)	กลม นูน สีเหลือง โคโลนีมัน
KCI-5(1)	กลม นูน สีขาว ขอบหยัก ตรงกลางปุ่มเป็นชั้นๆ โคโลนีด้าน
KCI-5(1)	กลม นูน สีเขียวสะท้อนแสง โคโลนีด้าน
KCI-6(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีมัน
KCI-7(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีมัน
KCI-8(1)	กลม แบน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KCI-9(1)	กลม นูน สีม่วง ขอบสีขาว โคโลนีมัน
KCI-10(1)	กลม แบน สีครีม โคโลนีมัน
KCI-10(2)	กลม นูน สีเขียว โคโลนีมัน
KCI-10(3)	กลม นูน สีขาวใส โคโลนีมัน
KCI-11(1)	กลม นูน สีครีม ผิวหน้าเป็นชั้นๆ โคโลนีมัน
KCI-11(2)	กลม เข้ม สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KCI-13(1)	กลม นูน สีม่วง โคโลนีมัน
KCI-14(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีมัน
KCI-14(2)	กลม นูน สีเขียวอ่อน โคโลนีด้าน

2.3.1.2 โชนที่ 2

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโกลน
KG2-1(1)	กลม นูน สีขาว โกลนมัน
KG2-2(1)	กลม นูน สีขาว โกลนมัน
KG2-3(1)	กลม นูน สีขาวครีมอมเหลือง โกลนมัน
KG2-4(1)	กลมรี นูน สีขาวครีม ผิวหน้าเรียบ โกลนด้าน
KG2-5(1)	กลม นูน สีครีม โกลนเล็ก มัน
KG2-6(1)	กลม นูน สีขาวครีม โกลนเล็ก มัน
KG2-7(1)	กลมรี นูน สีครีม โกลนด้าน
KG2-8(1)	กลม นูน สีขาว ขอบโกลนหัก ผิวหน้าด้านมีรอยหัก
KG2-8(2)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบหัก โกลนด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโกลน
KC2-1(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ ตรงกลางปุ่ม โกลนมัน
KC2-2(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โกลนมัน
KC2-2(2)	กลม นูน สีครีม โกลนด้าน อยู่เป็นคู่
KC2-3(1)	กลม นูน สีขาว โกลนด้าน
KC2-4(1)	กลม นูน สีครีม โกลนด้าน
KC2-5(1)	กลม นูน สีครีม โกลนเล็ก มัน
KC2-6(1)	กลม นูน สีขาว โกลนมัน
KC2-6(2)	กลม นูน สีครีม โกลนด้าน
KC2-7(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โกลนเล็ก ด้าน
KC2-8(1)	กลม นูน สีครีม โกลนมัน

### 2.3.1.3 โชนที่ 3

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KG3-2(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบโคโลนีใส โคโลนีมันอยู่กันเป็นคู่
KG3-3(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีมัน
KG3-4(1)	กลม นูน สีเหลือง โคโลนีเล็ก มัน

### 2.3.1.3 โชนที่ 3

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KC3-2(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีมัน
KC3-3(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีด้าน
KC3-3(2)	กลม นูน สีครีม โคโลนีเล็ก มัน
KC3-4(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีมัน
KC3-5(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบหยัก โคโลนีมัน

### 2.3.1.4 โชนที่ 4

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KG4-3(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีมัน
KG4-6(1)	กลม สีขาว โคโลนีด้าน ตรงกลางนูน
KG4-6(2)	กลม สีขาวครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KC4-1(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KC4-1(2)	กลม นูน สีเขียว ขอบใส โคโลนีมัน
KC4-2(1)	กลม นูน สีเขียว ขอบใส โคโลนีมัน
KC4-3(1)	กลม นูน สีม่วง ขอบสีขาว โคโลนีมัน
KC4-3(2)	กลม นูน สีครีม ขอบขาว โคโลนีมัน
KC4-3(3)	กลม นูน สีครีมอมเขียว โคโลนีมัน
KC4-3(4)	กลม นูน สีขาว ตรงกลางปุ่ม ผิวหน้าขรุขระ โคโลนีด้าน
KC4-4(1)	กลม นูน สีครีมอมเขียว โคโลนีมัน
KC4-4(2)	กลม แบน สีครีมอมเหลือง โคโลนีมัน
KC4-5(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม ขอบนูน โคโลนีด้าน
KC4-5(2)	กลม นูน สีครีมอมเขียว ขอบด้าน โคโลนีมัน
KC4-6(1)	กลม แบน สีน้ำตาลอมส้ม โคโลนีมัน ขอบนูนมัน ตรงกลางปุ่ม
KC4-6(2)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีเล็ก มัน
KC4-8(1)	กลม นูน สีครีม ขอบบางเรียบ โคโลนีมัน
KC4-8(2)	กลม แบน สีเขียวอ่อน โคโลนีมัน

2.3.1.5 โซนที่ 5

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KG5-1(1)	กลมรี สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KG5-3(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีมัน
KG5-7(1)	กลมรี นูน สีขาวครีม โคโลนีด้าน
KG5-9(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีด้าน
KG5-10(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีมัน
KG5-11(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีเล็ก มัน
KG5-14(1)	กลม นูน สีขาวครีม ผิวน้ำเรียบ
KG5-15(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบหยัก โคโลนีด้าน
KG5-18(1)	กลม สีขาว โคโลนีตรงกลางนูน
KG5-19(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน
KG5-19(2)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน
KG5-19(3)	กลม นูน สีขาว ขอบหยัก โคโลนีด้าน



ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KC5-1(1)	กลม นูน สีขาวอมเขียว โคโลนีมัน
KC5-2(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบด้าน
KC5-2(2)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบด้าน
KC5-2(3)	กลม นูน สีขาวครีม ผิวหน้านุ่ม โคโลนีมัน
KC5-3 (1)	กลม นูน สีม่วง โคโลนีมัน
KC5-4(1)	กลม นูน สีม่วง ขอบสีขาวอมส้ม โคโลนีมัน
KC5-5(1)	กลม นูน สีครีมอมเขียว โคโลนีมัน
KC5-5(2)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีมัน
KC5-6(1)	กลม นูน สีม่วง โคโลนี มัน
KC5-8(1)	กลม นูน สีขาว ขอบหยัก โคโลนีด้าน
KC5-9(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีมัน
KC5-10(1)	กลม นูน สีครีมอมเขียว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
KC5-12(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีมัน
KC5-13(1)	กลม นูน สีม่วง โคโลนีมัน
KC5-13(2)	กลม นูน สีครีมอมเขียว ขอบเรียบด้าน โคโลนีมัน
KC5-13(3)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีด้าน
KC5-14(1)	กลม นูน สีขาวครีม ตรงกลางโคโลนีด้าน โคโลนีมัน
KC5-15(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบด้าน โคโลนีมัน
KC5-16(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ ตรงกลางนูนด้าน โคโลนีมัน
KC5-17(1)	กลม นูน สีน้ำตาล ขอบใส โคโลนีมัน
KC5-18(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบด้าน โคโลนีมัน
KC5-19(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบด้าน โคโลนีด้าน

### 2.3.1.6 โชนที่ 6

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KC6-1(1)	กลม นูน สีขาวครีม ขอบด้าน โคโลนีด้าน

2.3.1.7 โจนที่ 7

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KG7-2(1)	กลม แบน สีขาวเหลือง ขอบหยัก โคโลนีด้าน

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
KC7-1(1)	กลม นูน สีเขียวอ่อน ขอบบางสีขาว โคโลนีมัน
KC7-2(1)	กลม นูน สีขาวครีม โคโลนีมัน
KC7-2(2)	กลม นูน สีขาว ขอบหยัก ผิวหน้าด้าน โคโลนีด้าน
KC7-2(3)	กลม นูน สีครีมอมเขียว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน

2.3.2 เชื้อที่เจริญบนอาหารกลูโคส (24% w/v)

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
Z1-1(1)	กลม นูนเล็กน้อย สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้ำมันวาว
Z1-3(1)	กลม ขอบหยัก ผิวหน้าขุ่น สีครีมอมเหลือง
Z1-3(2)	กลม ขอบหยัก ผิวหน้าไม่เรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-4(1)	กลม ขอบเรียบ สีเหลือง
Z1-4(2)	กลม ผิวหน้าเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-4(3)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-4(4)	กลม นูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-5(1)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-6(1)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-7(1)	กลม ขนาดเล็ก สีครีมอมเหลือง
Z1-7(2)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-8(1)	กลม นูน ขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-8(2)	กลม ผิวหน้าเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-9(1)	กลม ขอบหยักเล็กน้อย สีครีมอมเหลือง
Z1-10(1)	กลม ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-11(1)	กลม ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-11(2)	กลม นูน ผิวหน้ำมันวาว ขอบเรียบ สีครีม
Z1-12(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง
Z1-12(2)	กลม ผิวหน้าเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-13(1)	กลม ผิวหน้าเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-13(2)	กลม ผิวหน้าเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z1-14(1)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
Z2-1(1)	กลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น
Z2-1(2)	กลม ขอบหยัก ผิวหน้าขุ่น สีครีมอมเหลือง
Z2-1(3)	กลม ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z2-2(1)	กลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z2-2(2)	กลม สีครีมอมเหลือง ขอบคล้ายเส้นใย
Z2-2(3)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z2-3(1)	กลม นูน สีเหลือง
Z2-4(1)	กลม ขอบหยัก สีครีมอมเหลือง
Z2-5(1)	กลม ผิวหน้าขุ่น สีครีมอมเหลือง
Z2-5(2)	กลม ขนาดเล็ก ผิวหน้ามันวาว
Z2-7(1)	กลม สีเหลืองขุ่น ขอบคล้ายเส้นใย
Z2-7(2)	กลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น
Z2-8(1)	กลม นูน สีขาวขุ่น
Z3-1(1)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีม
Z3-2(1)	กลม ขอบเรียบ สีครีม
Z3-2(2)	กลม สีเหลือง ขอบคล้ายเส้นใย
Z3-2(3)	กลม นูน ขอบเรียบ สีขาว
Z3-4(1)	กลม ขอบหยัก สีครีมขุ่นมาก
Z3-6(1)	กลม ขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีครีม
Z3-6(2)	กลม กลาง โคลิโคนี้นูนมาก ขอบเรียบ สีเหลือง
Z3-6(3)	กลม ผิวหน้าขุ่น สีครีมอมเหลือง
Z4-1(1)	กลม กลาง โคลิโคนี้นูนมาก สีครีม
Z4-2(1)	ไม่เป็นรูปทรง ขอบหยัก ผิวหน้าขุ่นนูน สีครีม
Z4-2(2)	กลม ขอบเรียบ นูน สีครีม

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
Z4-3(1)	กลม ผิวน้ำมัน สีเหลืองส้มขุ่น
Z4-3(2)	ไม่มีรูปทรง ขอบหยักและมีเส้นใยรอบขอบ
Z4-4(1)	กลม นูน ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น
Z4-5(1)	รูปทรงรี ผิวน้ำมัน สีเหลือง
Z4-5(2)	กลม ขอบเรียบ สีเหลืองครีม
Z4-6(1)	กลม ขอบเรียบ ผิวน้ำมัน สีครีม
Z4-6(2)	กลม นูน ผิวหน้าด้าน สีครีม
Z4-7(1)	กลม ผิวหน้าเรียบ ของเรียบ สีขาวครีม
Z4-7(2)	กลม ขนาดใหญ่ ขอบเรียบ ผิวน้ำมัน สีเหลือง
Z4-8(1)	กลม ผิวหน้าด้าน สีขาวขุ่น
Z4-8(2)	กลม ขอบหยัก สีครีม
Z5-1(1)	ไม่มีรูปทรง รอบขอบคล้ายเส้นใย สีขาวด้าน
Z5-1(2)	กลม ขอบหยัก สีครีม
Z5-2(1)	กลม ขนาดเล็ก ผิวน้ำมันวาว สีครีม
Z5-3(1)	กลม ขอบหยัก สีครีมอมเหลือง
Z5-4(1)	กลม ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z5-6(1)	กลม ขอบหยัก สีครีม
Z5-6(2)	กลม ขอบหยัก สีครีมอมเหลือง
Z5-7(1)	กลม ขอบเรียบ สีเหลือง
Z5-8(1)	กลม ขอบเรียบ สีครีม
Z5-9(1)	กลม นูน ผิวน้ำมัน สีครีม
Z5-9(2)	กลม ผิวหน้าขุ่น สีครีม
Z5-10(1)	กลม นูน สีครีม
Z5-11(1)	กลม นูน สีครีม

ชื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
Z5-13(1)	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ำมันวาว สีครีม
Z5-13(2)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z5-14(1)	กลม นูน ผิวหน้ำมัน สีครีมอมเหลือง
Z5-14(2)	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวหน้ำมัน สีครีมอมเหลือง
Z5-15(1)	กลม เรียบ สีขาวขุ่น
Z5-15(2)	กลม นูน สีครีม
Z5-16(1)	กลม ขอบหยัก ผิวหน้าเรียบ สีครีมอมเหลือง
Z5-18(1)	กลม นูน สีครีม
Z5-19(1)	กลม นูน ผิวหน้าขุ่น สีขาวขุ่น
Z6-1(1)	กลม นูน ขอบเรียบ สีครีม
Z6-1(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง
Z7-1(1)	กลม เรียบ สีเหลือง
Z7-2(1)	กลม ผิวหน้าค้ำย่นนูนสีครีมอมเหลือง ขุ่นมาก
Z8-1(1)	กลม กลาง โคโลนีนูน ขอบหยัก สีขาว
Z8-1(2)	กลม นูน สีขาว

### 2.3.3 เซื่อที่เจริญบนอาหารไซโลส (10% w/v)

เซื่อ (อุณหภูมิ 30°C)	ลักษณะโคโลนี
N1-1	กลม นูน สีขาว ขอบหัก โคโลนีมัน ทึบแสง
N1-2	กลม นูน สีขาว ขอบหัก โคโลนีด้าน ทึบแสง
N1-4	กลม สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน ทึบแสง
N1-5	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ทึบแสง
N1-6	กลม สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน ขอบโคโลนีโปร่งแสง กลางโคโลนีทึบแสง
N1-7	กลม นูน สีเหลือง ขอบหัก โคโลนีมัน ทึบแสง
N1-8	กลม นูน สีเหลือง ขอบหัก โคโลนีมัน ขอบโคโลนีโปร่งแสง กลางโคโลนีทึบแสง
N2-1	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน ทึบแสง
N2-1(3)	กลม นูนเป็นยอดแหลม สีขาว ขอบหัก โคโลนีด้าน ทึบแสง
N2-2	กลม นูน สีขาว ขอบหัก โคโลนีด้าน ขอบโคโลนีโปร่งแสง กลางโคโลนีทึบแสง
N2-3(1)	กลม สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน โปร่งแสง
N2-4(2)	กลม นูน สีเหลืองอ่อน ขอบหัก โคโลนีด้าน ผิวหน้าขรุขระ ทึบแสง
N2-5	กลม นูน สีขาว ขอบหัก โคโลนีด้าน ผิวหน้าขรุขระ ทึบแสง
N2-6	กลม นูน สีเหลือง ขอบหัก โคโลนีด้าน ทึบแสง
N2-7	กลม สีเหลือง ขอบหัก โคโลนีมัน ขอบโคโลนีโปร่งแสง กลางโคโลนีทึบแสง
N2-7(3)	กลม นูน สีเหลืองอ่อน ขอบหัก โคโลนีด้าน ผิวหน้าขรุขระ ทึบแสง
N2-8(1)	กลม นูน สีขาว ขอบหัก โคโลนีด้าน ผิวหน้าขรุขระ ทึบแสง
N2-8(5)	กลม นูน สีขาว ขอบหัก โคโลนีด้าน ทึบแสง
N3-1	กลม สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน ทึบแสง
N3-1(1)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน ทึบแสง
N3-1(2)	กลม สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน ทึบแสง
N3-3	กลม สีเหลือง ขอบหัก โคโลนีมัน ทึบแสง
N3-4	กลม สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน ทึบแสง
N4-2	กลม สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
N5-1	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน ทึบแสง
N5-3	กลม นูน สีขาว ขอบหัก โคโลนีด้าน ทึบแสง
N5-4	กลม สีขาว ขอบหัก โคโลนีมัน ทึบแสง
N6-1	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน ทึบแสง
N6-2	กลม สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน ทึบแสง
N6-3	กลม สีขาว ขอบหัก โคโลนีด้าน ทึบแสง

2.3 การคัดแยกยีสต์ทนแรงดันออสโมติกซึ่งที่สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส

เชื้อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
CG4(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
CG5(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก
G1-1(3)	กลม นูน สีครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-4(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-4(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-6(1)	กลม แบน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-9(1)	กลม นูน สีครีม โคโลนีเป็นจีบ ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี
G1-12(3)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G1-14(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง โคโลนีมัน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-15(1)	กลม นูน สีขาว โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-17(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G1-27(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-1(1)	กลม นูน สีครีมอมส้ม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกมารอบโคโลนี
G2-3(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-3(4)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-10(1)	กลม นูน สีเหลืองทอง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G2-10(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-15(1)	กลม นูน สีส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G2-16(1)	กลม แบน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีใหญ่ มัน
G2-16(3)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-3(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G3-9(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีเล็ก มัน
G3-10(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G3-13(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีมัน
G3-13(5)	กลม นูน สีเหลืองครีม โคโลนีด้าน ขอบมีลักษณะคล้ายเส้นใยแตกออกรอบโคโลนี



ชื่อ (อุณหภูมิ 40°C)	ลักษณะโคโลนี
G4-5(2)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G5-7(1)	กลม นูน สีครีมอมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G5-7(2)	กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีมีลักษณะเป็นจีบหยักๆ
G6-2(1)	กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ โคโลนีลึกลับมัน
G6-2(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-2(3)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-2(5)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ
G6-3(2)	กลม นูน สีครีมเหลือง ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-5(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-6(2)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-11(1)	กลม นูน สีเหลืองอมน้ำตาล ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G6-12(1)	กลม นูน สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G6-13(1)	กลม นูนกลางโคโลนีหยัก สีเหลืองครีม ขอบเรียบ โคโลนีด้าน
G8-3(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-5(1)	กลม นูน สีเหลืองอมส้ม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-5(2)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน
G8-8(1)	กลม นูน สีครีม ขอบเรียบ โคโลนีมัน

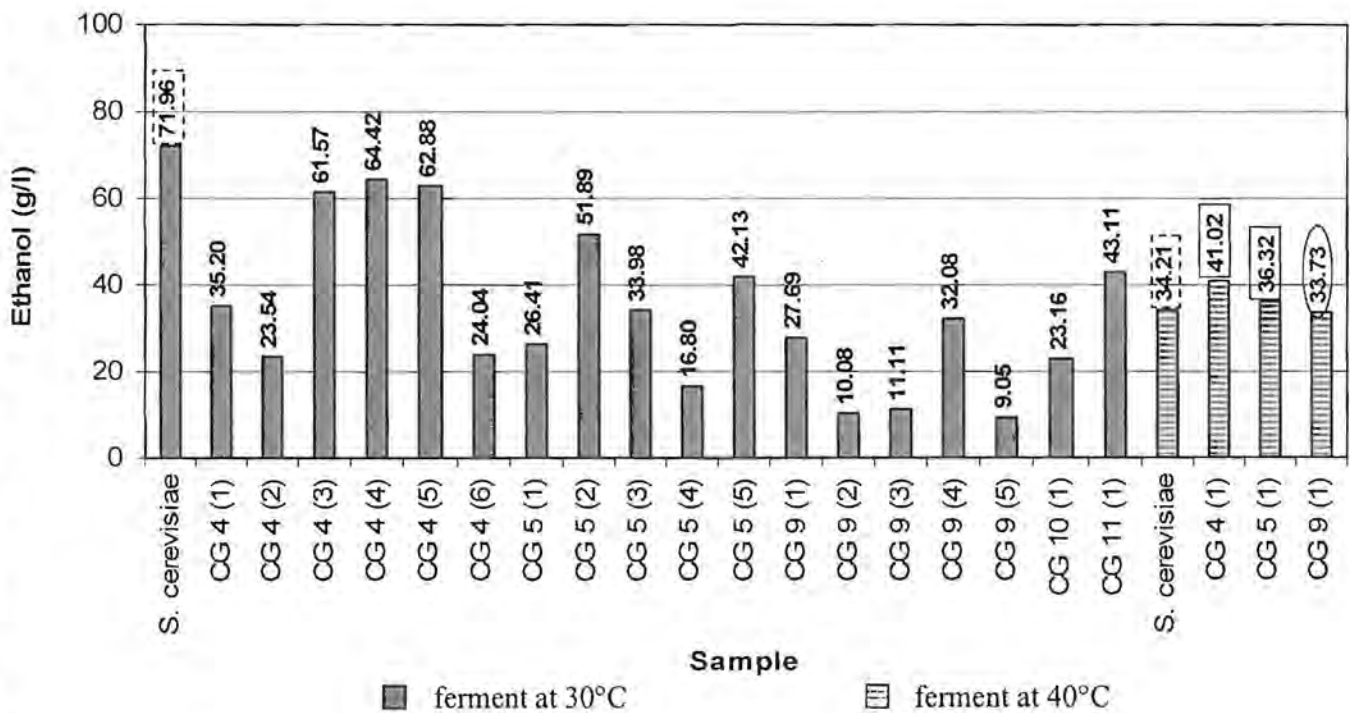
### 3. ผลการหมักเอทานอลจากยีสต์ที่แยกได้

#### 3.1 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสโดยยีสต์ที่แยกได้

นำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส ที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ตามอุณหภูมิที่แยกเชื้อได้ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์หมักเอทานอลระดับอุตสาหกรรม

#### เชื้อที่เจริญบนอาหารกลูโคส

#### 1 เชื้อที่แยกได้จากจุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จากผลพบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างในจุพาล ไม่มีเชื้อตัวใดหมักได้ดีกว่าหรือใกล้เคียง *S. cerevisiae* TISTR 5596 (control) ที่อุณหภูมิ 30°C และมี 2 เชื้อที่หมักได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (34.21 g/l) และมี 1 เชื้อที่หมักได้ใกล้เคียง *S. cerevisiae* ที่ 40°C คือ

1.	CG4 (1)	EtOH	41.02 g/l
2.	CG 9(1)	"	36.32 g/l

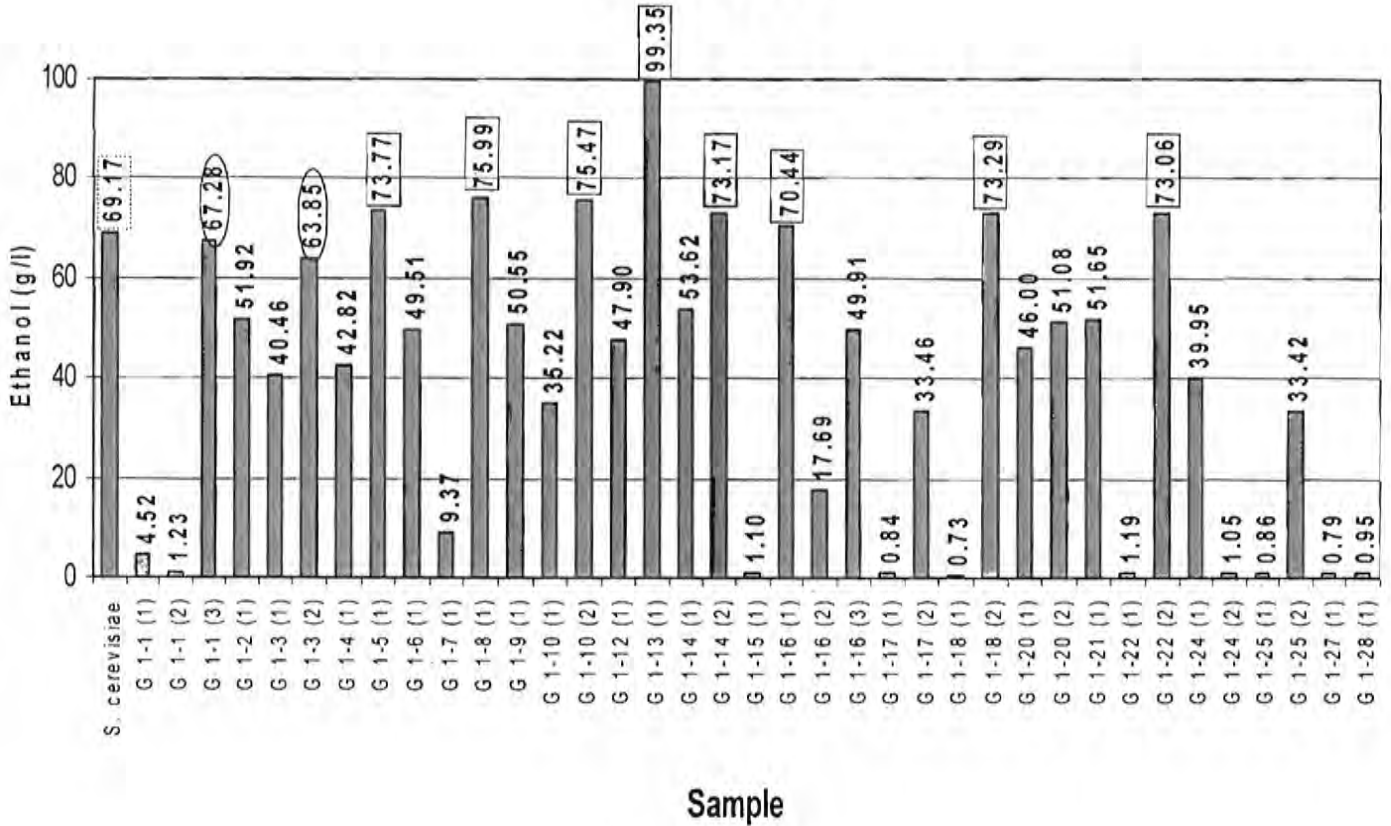
หมายเหตุ :

- ☐ EtOH ที่ได้จาก (control)
- ▨ EtOH ที่ได้สูงกว่า (control)
- EtOH ที่ได้ใกล้เคียง (control)

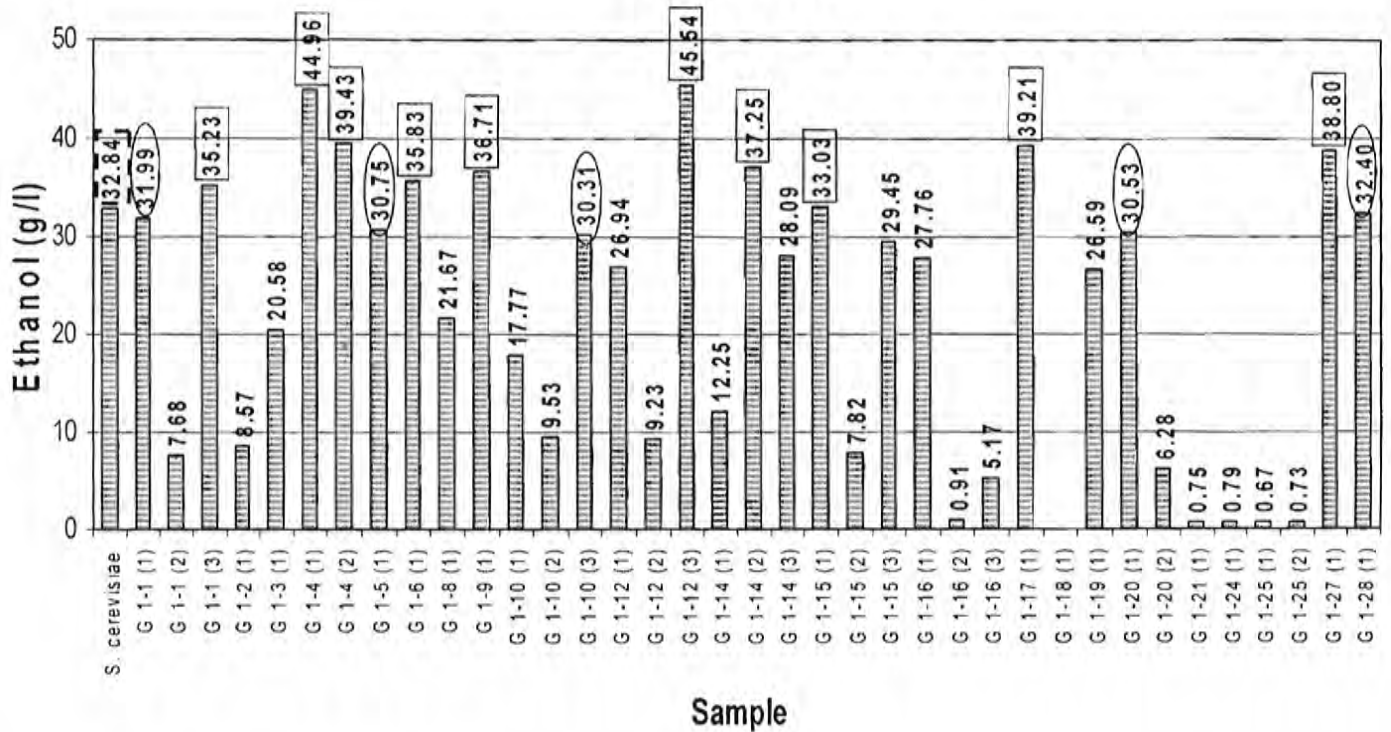
2. กลุ่มโรงงานน้ำตาล (บนอาหารกลูโคส)

2.1 โรงงานราชบุรีน้ำตาล

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชบุรี พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(control) (69.17 g/l) นาน 48 h ทั้งหมด 8 เชื้อ ดังนี้

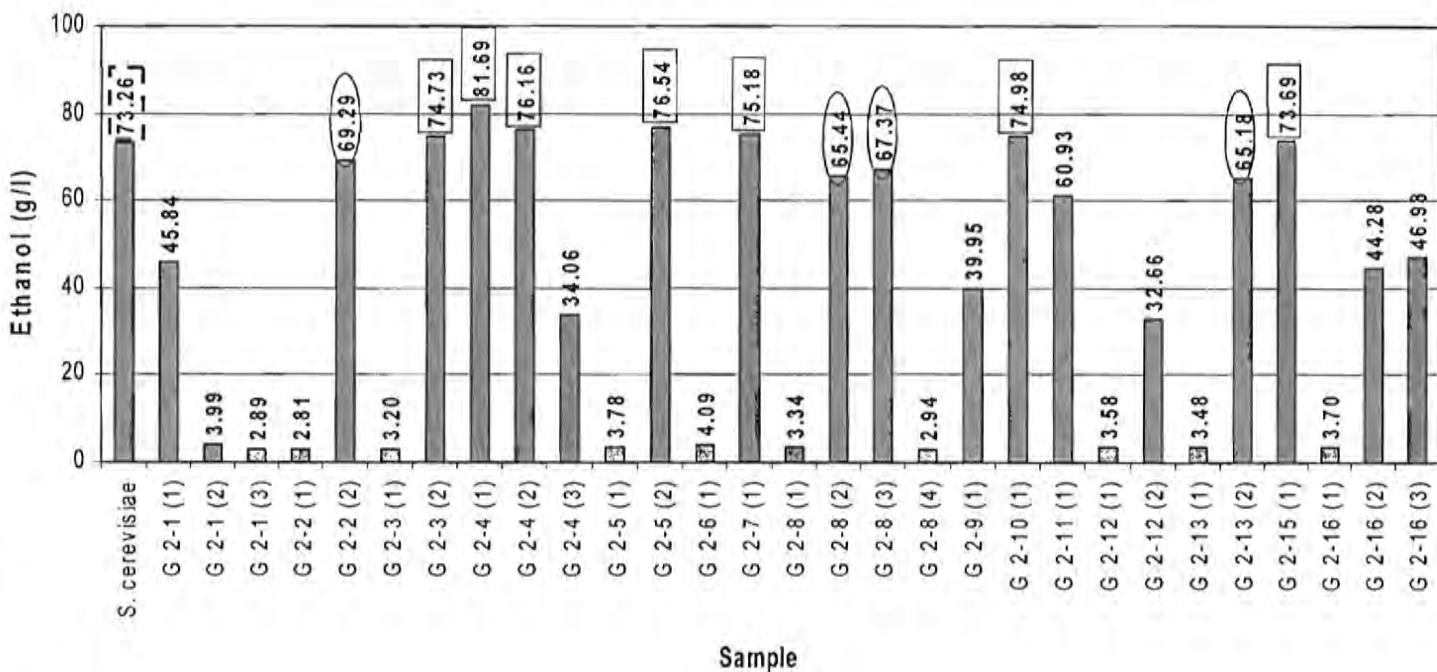
1.	G 1-5	EtOH	73.77 g/l
2.	G 1-8	"	75.99 g/l
3.	G 1-10	"	75.47 g/l
4.	<b>G 1-13 (1)</b>	"	<b>99.35 g/l</b>
5.	G 1-14 (2)	"	73.17 g/l
6.	G 1-16 (1)	"	70.44 g/l
7.	G 1-18 (2)	"	73.29 g/l
8.	G 1-22 (2)	"	73.06 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (32.84 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h

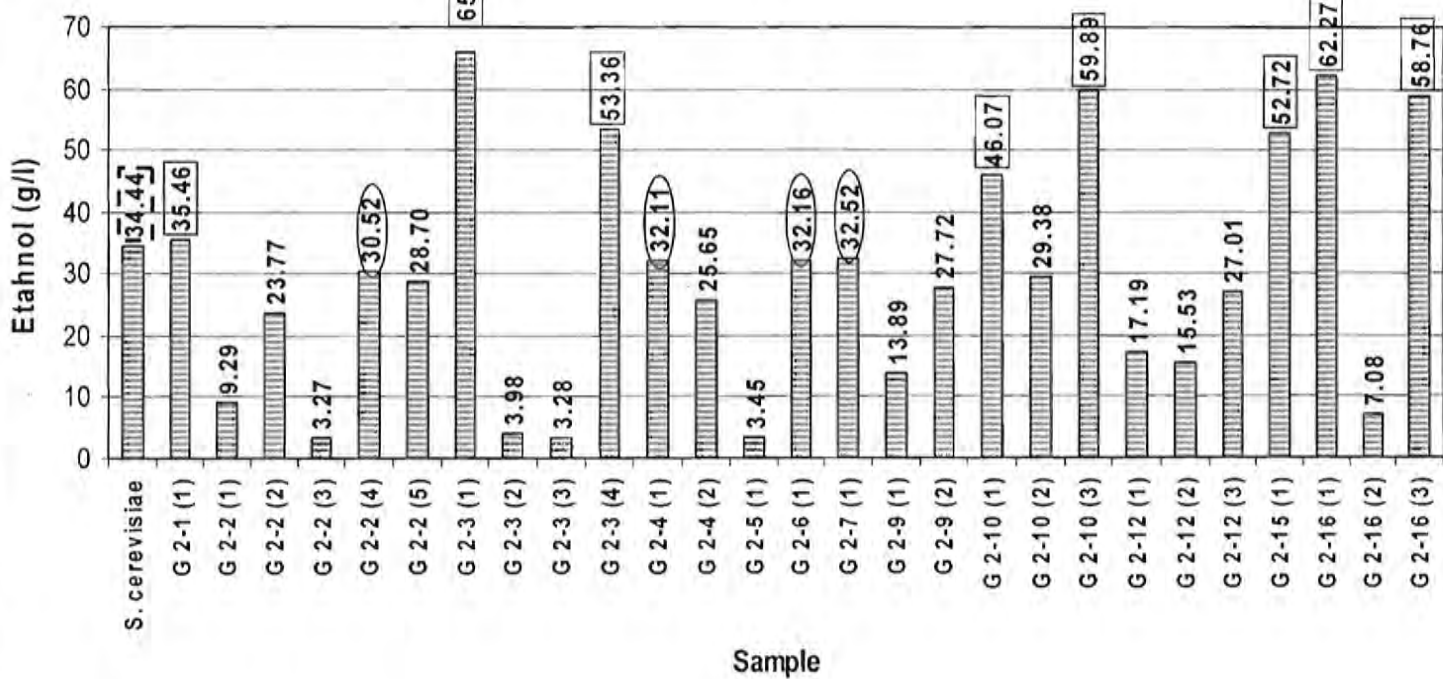
ทั้งหมด 10 เชื้อ ดังนี้

1.	G 1-1 (3)	EtOH	35.23 g/l
2.	G 1-4 (1)	"	44.96 g/l
3.	G 1-4 (2)	"	39.43 g/l
4.	G 1-6 (1)	"	35.83 g/l
5.	G 1-9 (1)	"	36.71 g/l
6.	<b>G 1-12 (3)</b>	"	<b>45.54 g/l</b>
7.	G 1-14 (2)	"	37.25 g/l
8.	G 1-15 (1)	"	33.03 g/l
9.	G 1-17 (1)	"	39.21 g/l
10.	G 1-27 (1)	"	38.80 g/l

Ferment at 30 C



Ferment at 40 C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า

*S. cerevisiae* (control) (73.26 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 7 เชื้อ ดังนี้

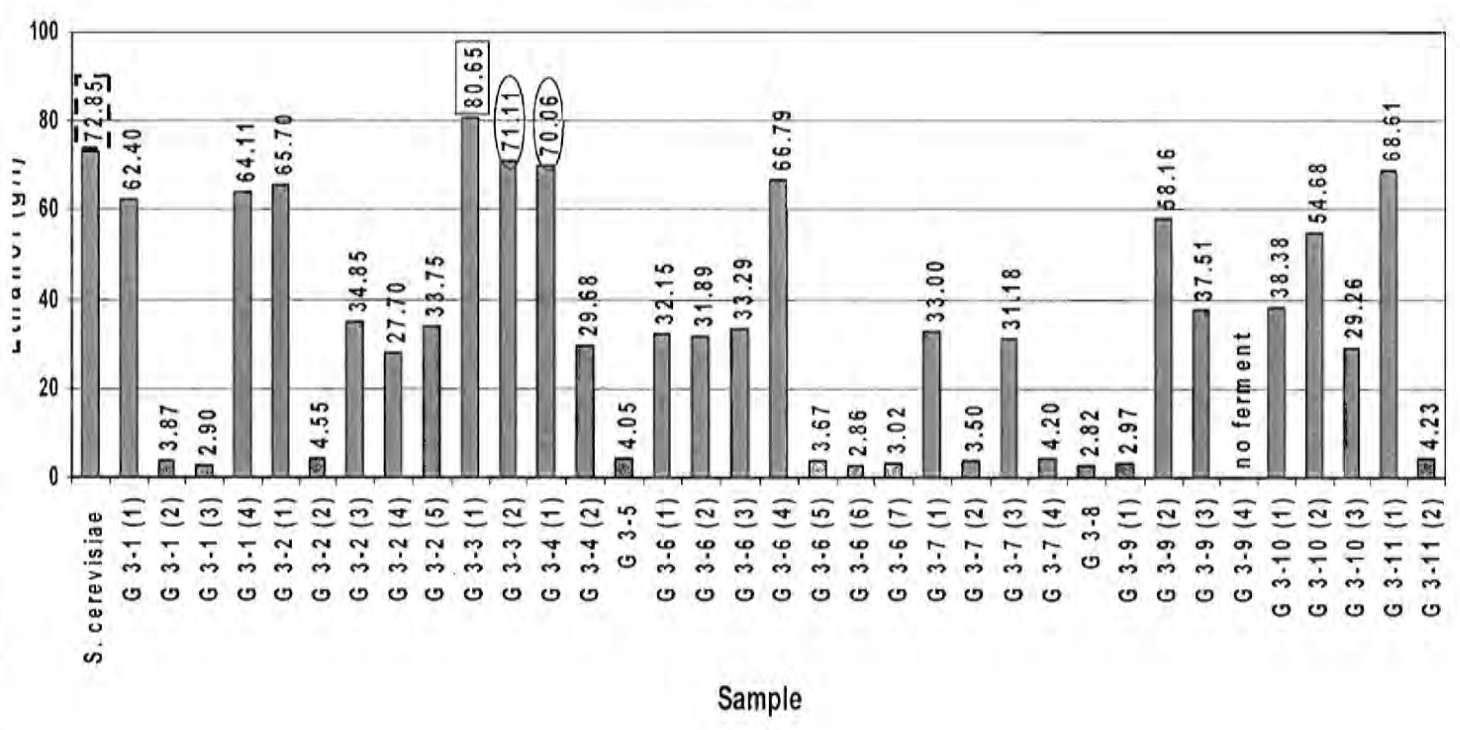
1.	G 2-3 (2)	EtOH	74.73 g/l
2.	G 2-4 (1)	"	81.69 g/l
3.	G 2-4 (2)	"	76.16 g/l
4.	G 2-5 (2)	"	76.54 g/l
5.	G 2-7 (1)	"	75.18 g/l
6.	G 2-10 (1)	"	74.58 g/l
7.	G 2-15 (1)	"	73.69 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (34.44 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h ทั้งหมด

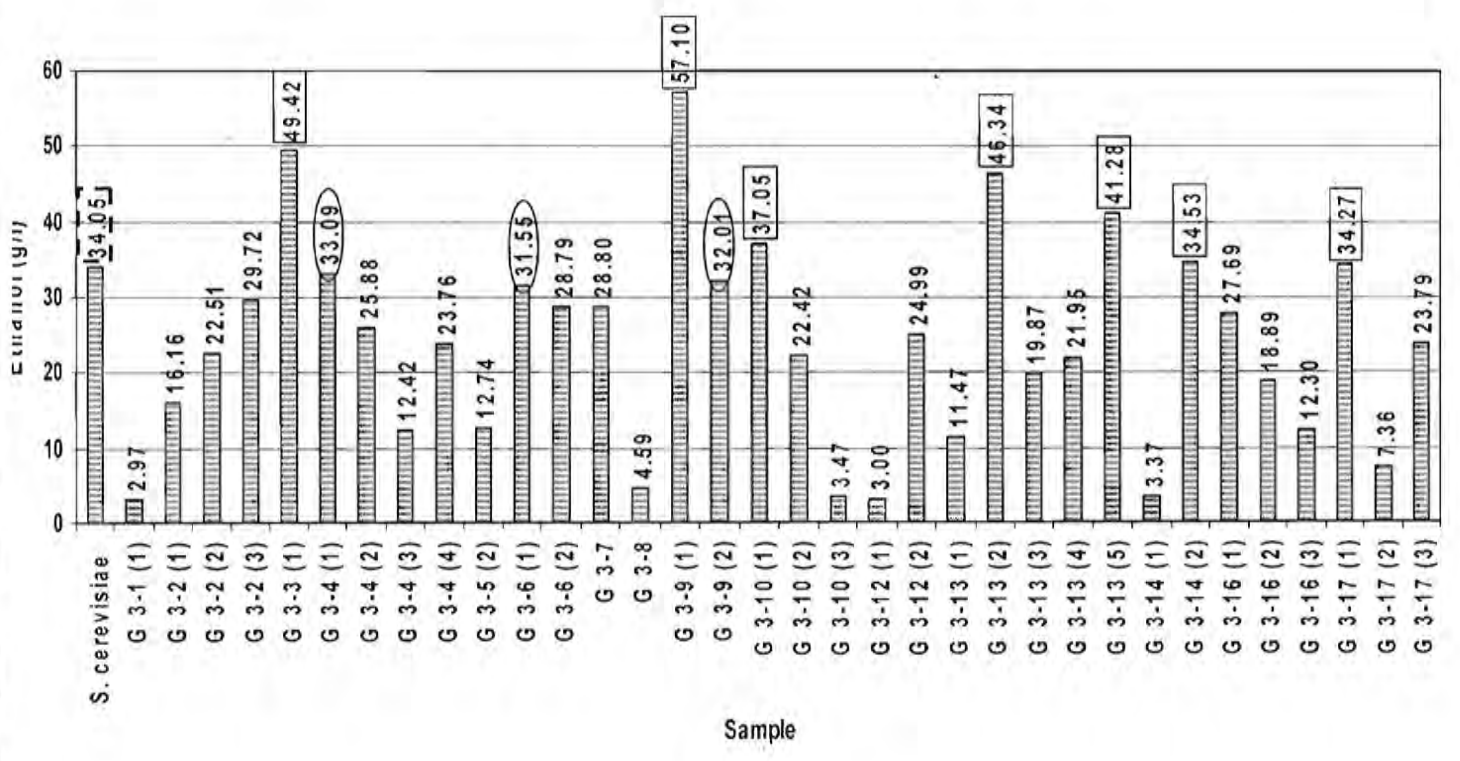
8 เชื้อ ดังนี้

1.	G 2-1 (1)	EtOH	35.46 g/l
2.	G 2-3 (1)	"	65.88 g/l
3.	G2-3 (4)	"	53.36 g/l
4.	G 2-10 (1)	"	46.07 g/l
5.	G 2-10 (3)	"	59.89 g/l
6.	G 2-15 (1)	"	52.72 g/l
7.	G 2-16 (1)	"	62.27 g/l
8.	G 2-16 (3)	"	58.76 g/l

Ferment at 30 C



Ferment at 40 C



เชื้อที่แยกได้จาก โรงงานน้ำตาล ไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า

*S. cerevisiae* (control) (72.85 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h มี 1 เชื้อ ดังนี้

1.	G 3-3 (1)	EtOH	80.65 g/l
----	-----------	------	-----------

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (34.05 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h

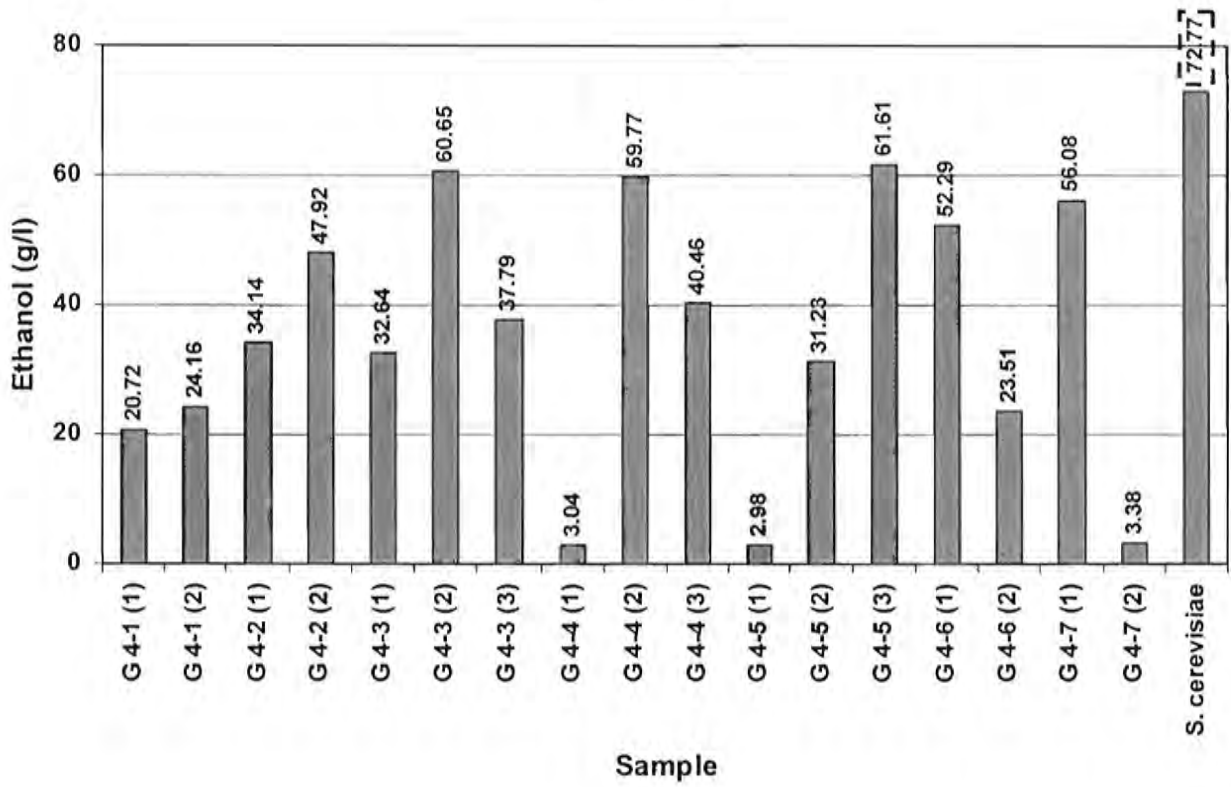
ทั้งหมด 5 เชื้อ ดังนี้

1.	G 3-3 (1)	EtOH	49.42 g/l
2.	G 3-9 (1)	"	57.10 g/l
3.	G 3-10 (1)	"	37.05 g/l
4.	G 3-13 (2)	"	46.34 g/l
5.	G 3-13 (5)	"	41.28 g/l

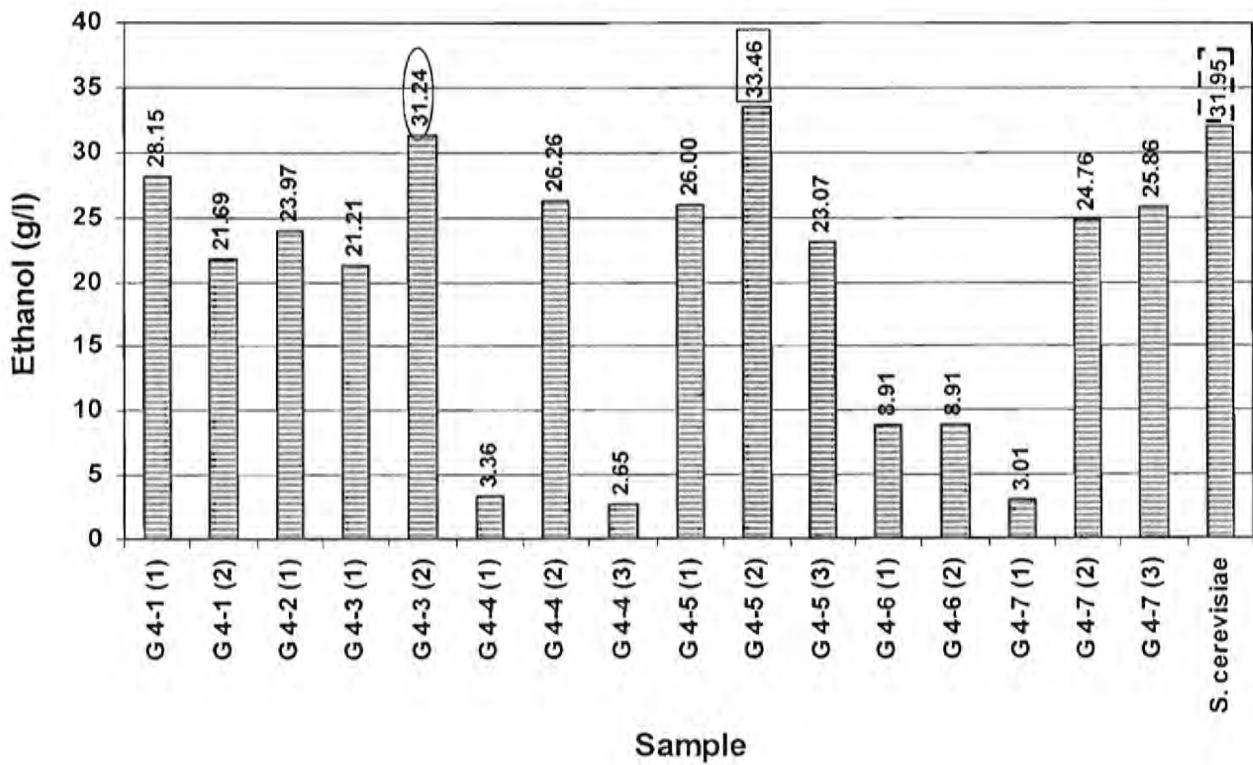


2.4 โรงงานน้ำตาลสุรินทร์

Ferment at 30 °C



Ferment at 40 °C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลสุรินทร์ ไม่มีเชื้อตัวใดที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

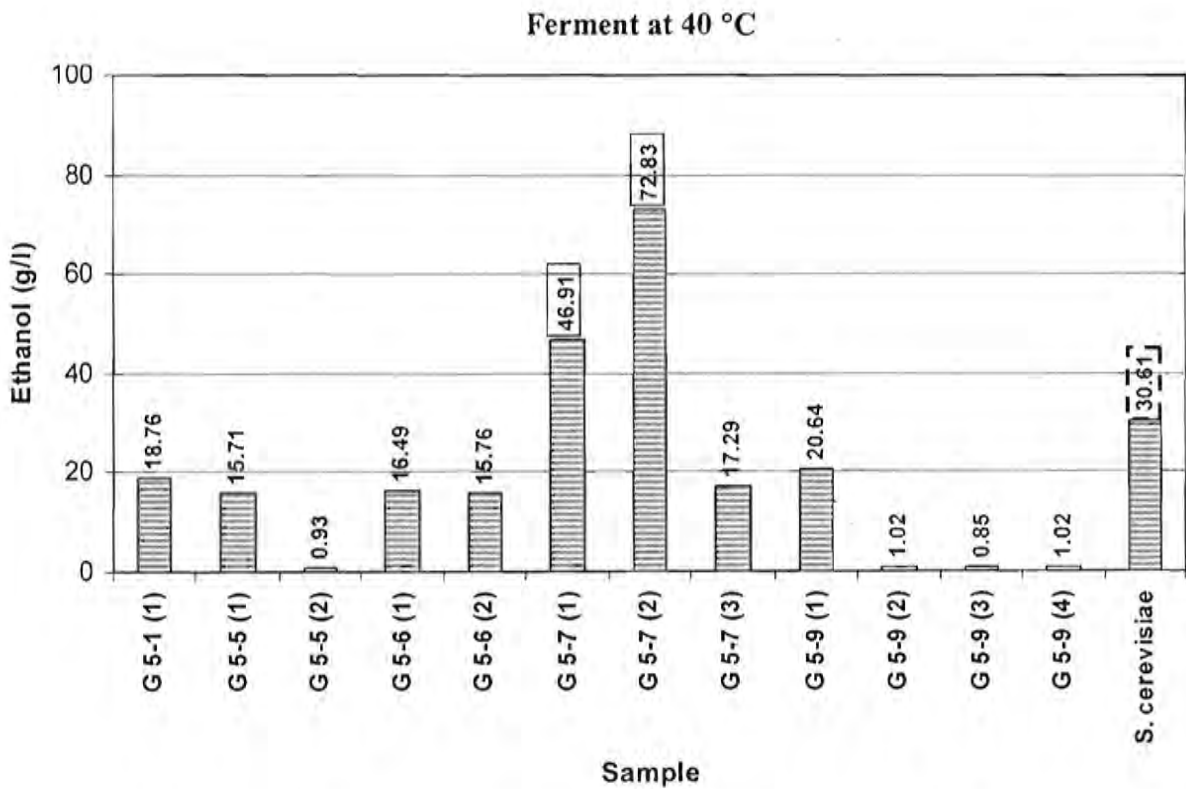
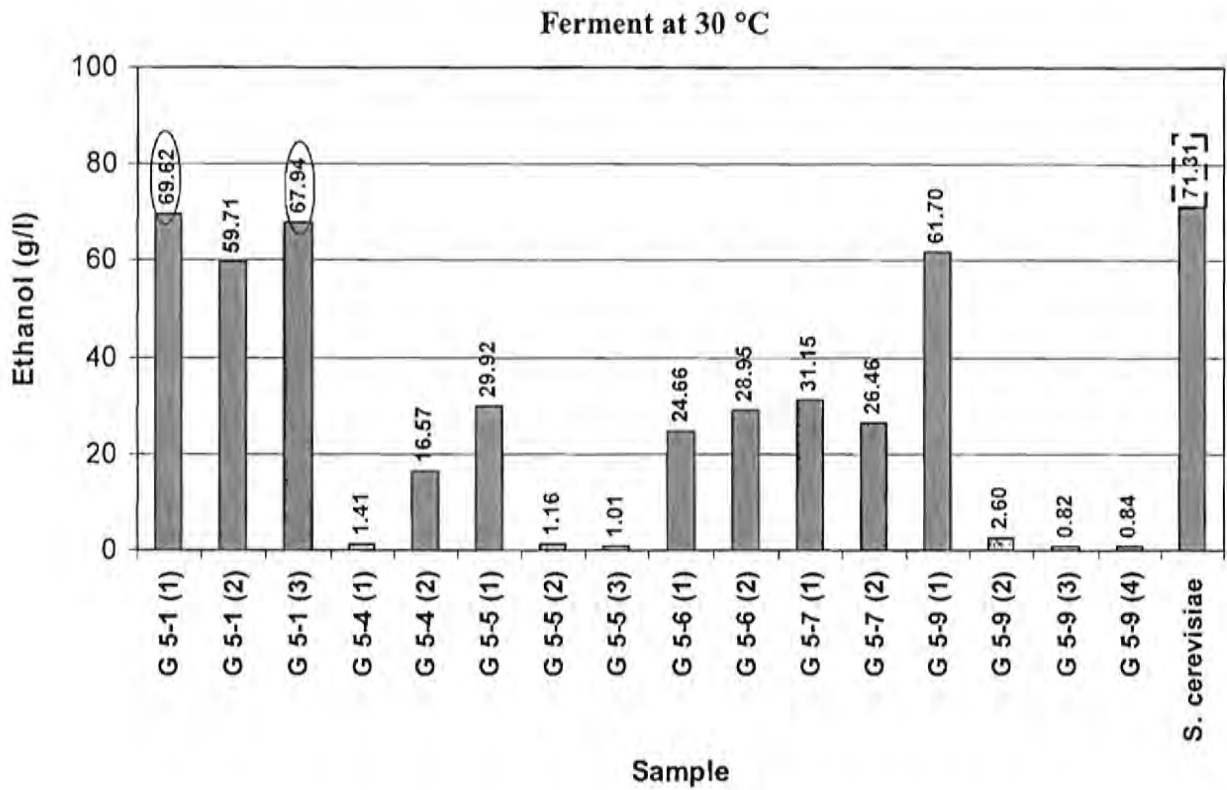
(control) (72.77 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h

และเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (31.95 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี

1 เชื้อ ดังนี้

1.	G 4-5 (2)	EtOH	33.46 g/l
----	-----------	------	-----------

2.5 โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช ไม่มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า

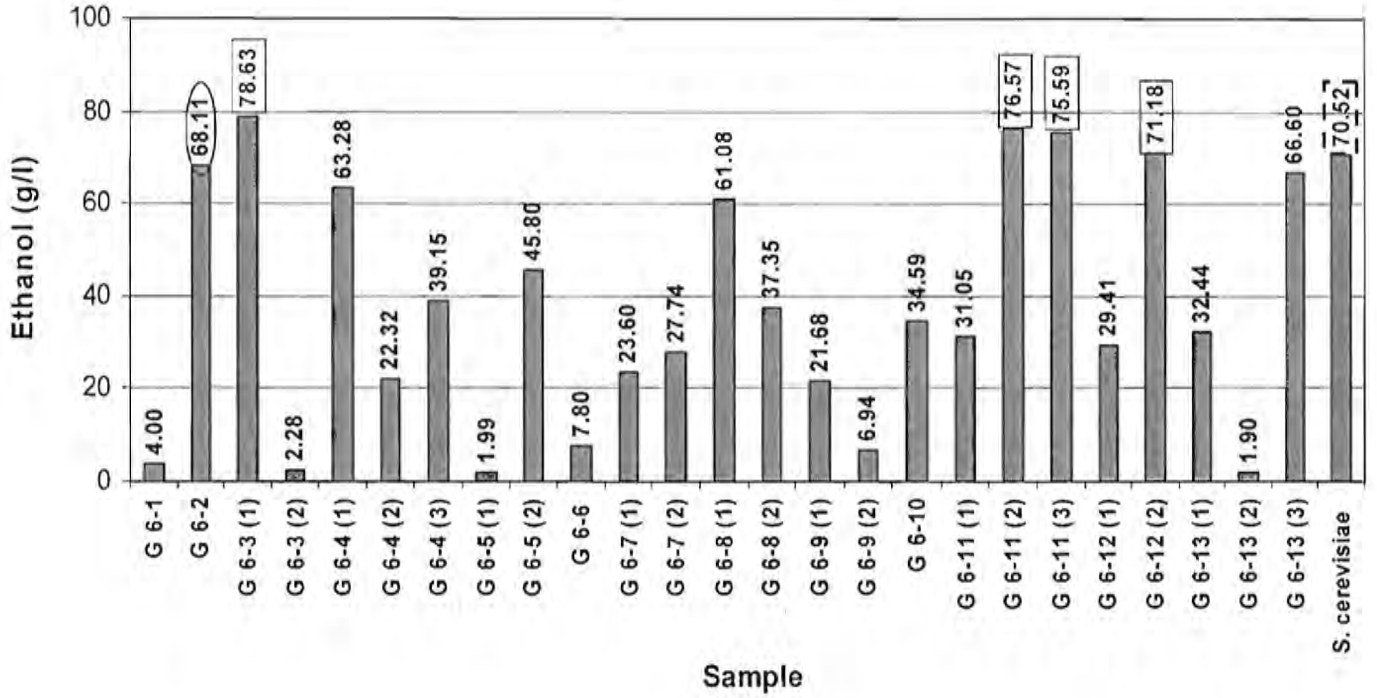
*S. cerevisiae* (control) (71.31 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h เลย

และเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (30.61 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h

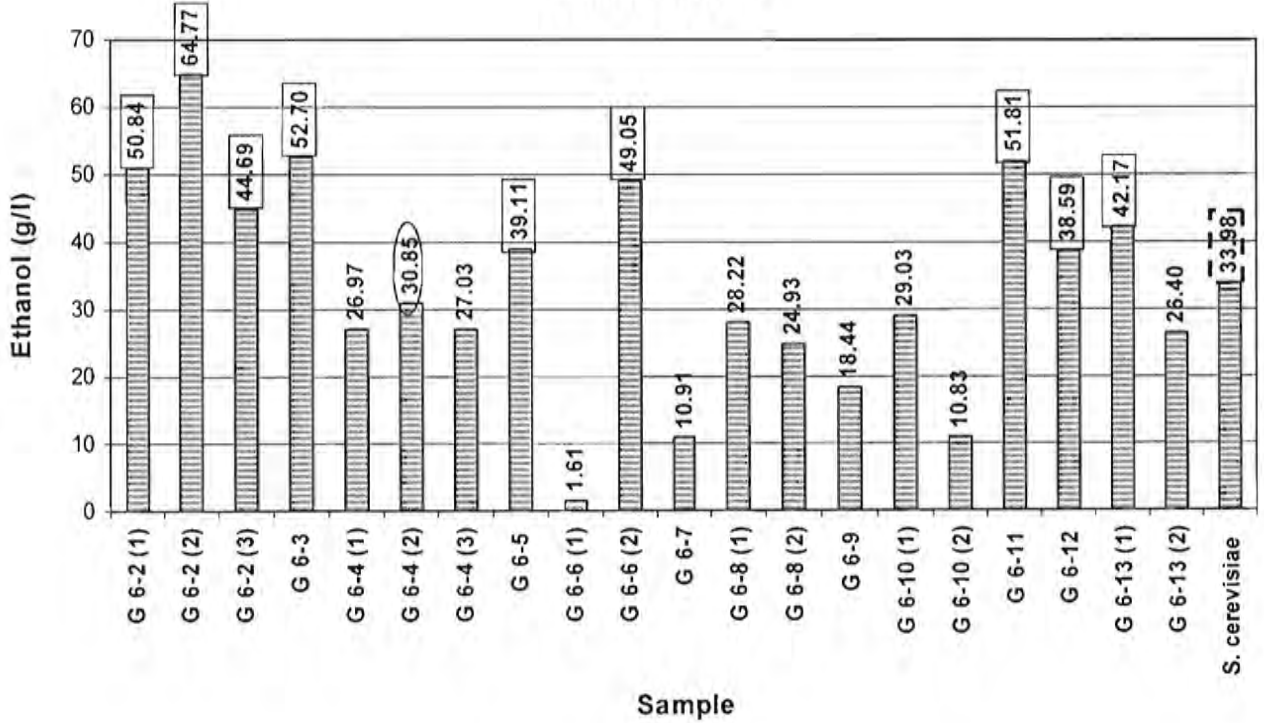
ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

1.	G 5-7(1)	EtOH	46.91 g/l
2.	G 5-7 (2)	"	72.83 g/l

Ferment at 30 °C



Ferment at 40 °C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลครบุรี พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(control) (70.52 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 4 เชื้อ ดังนี้

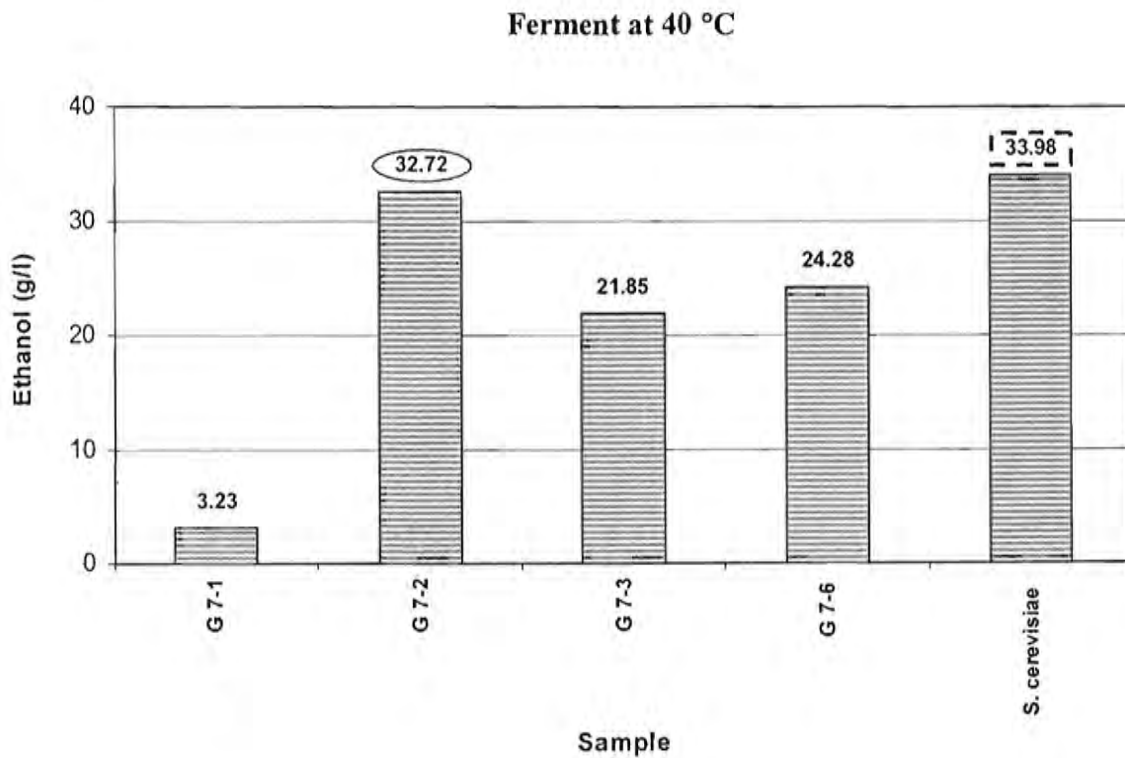
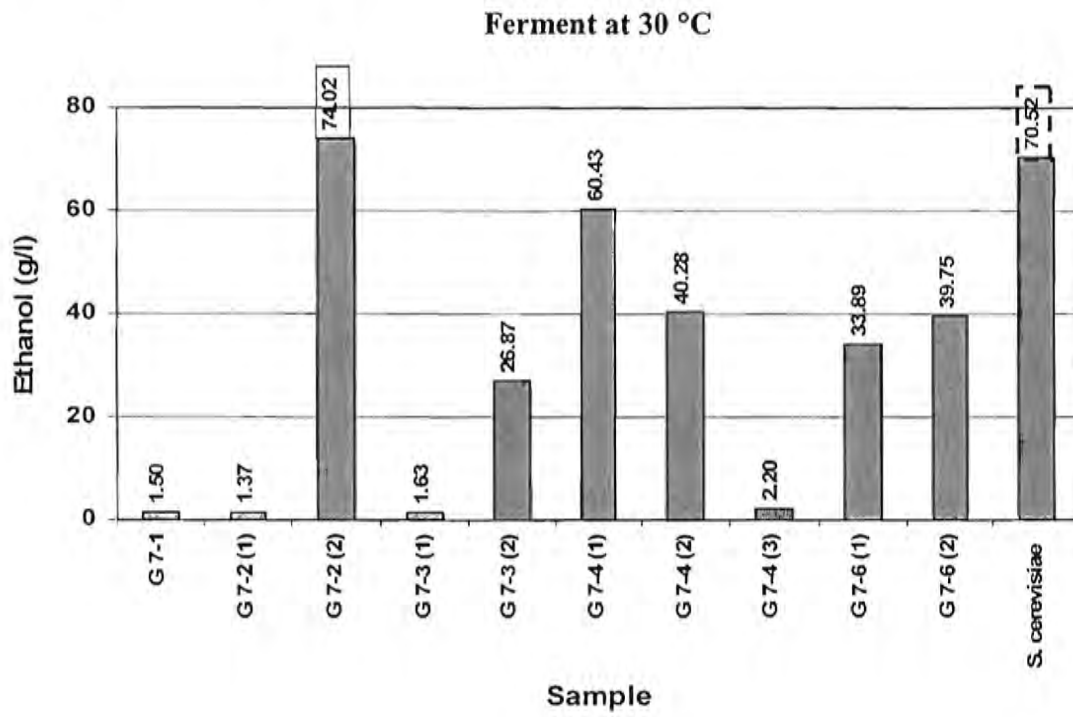
1.	G 6-3 (1)	EtOH	78.63 g/l
2.	G 6-11 (2)	"	76.57 g/l
3.	G 6-11 (3)	"	75.59 g/l
4.	G 6-12 (2)	"	71.18 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (33.98 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h

ทั้งหมด 9 เชื้อ ดังนี้

1.	G 6-2 (1)	EtOH	50.84 g/l
2.	G 6-2 (2)	"	64.77 g/l
3.	G 6-2 (3)	"	44.69 g/l
4.	G 6-3	"	52.70 g/l
5.	G 6-5	"	39.11 g/l
6.	G 6-6 (2)	"	49.05 g/l
7.	G 6-11	"	51.81 g/l
8.	G 6-12	"	38.59 g/l
9.	G 6-13 (1)	"	42.17 g/l

2.7 โรงงานน้ำตาลอีสาน



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอิสาน พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(control) (70.52 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h 1 เชื้อ ดังนี้

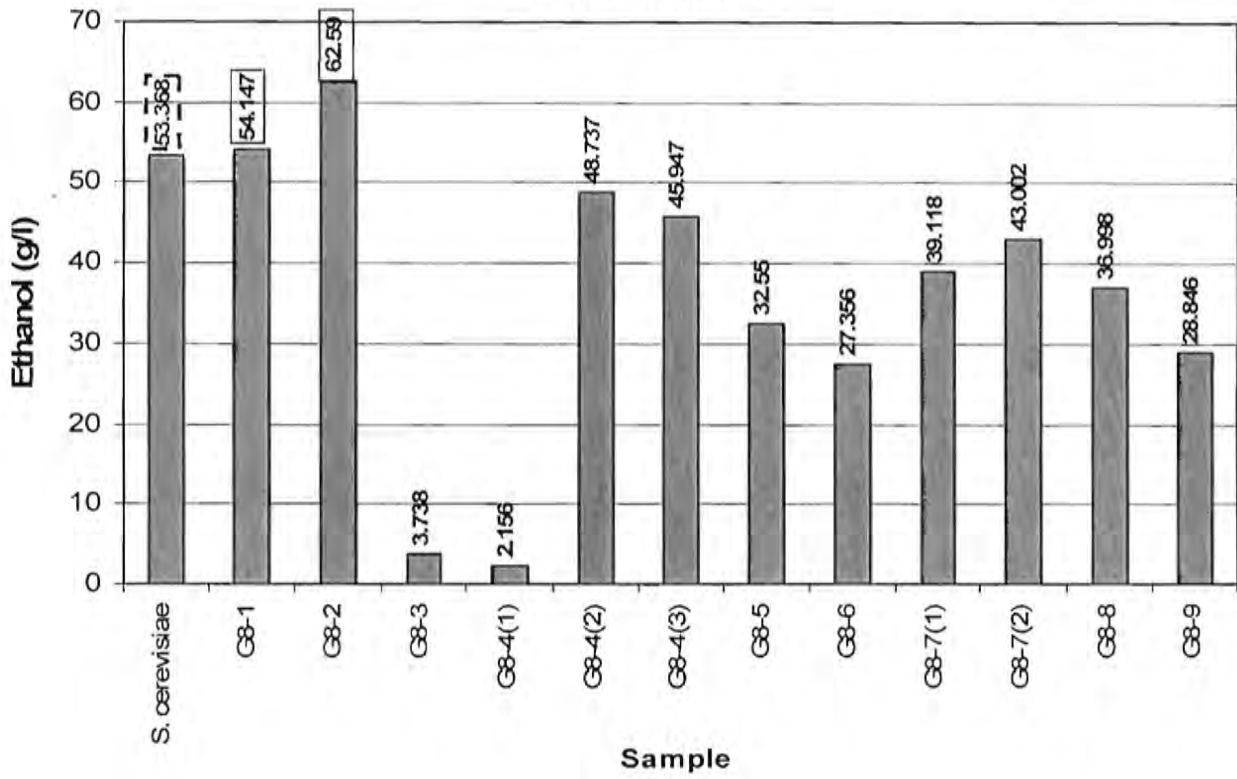
1. G 7-2 (2) EtOH 74.02 g/l

และไม่มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (33.98 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน

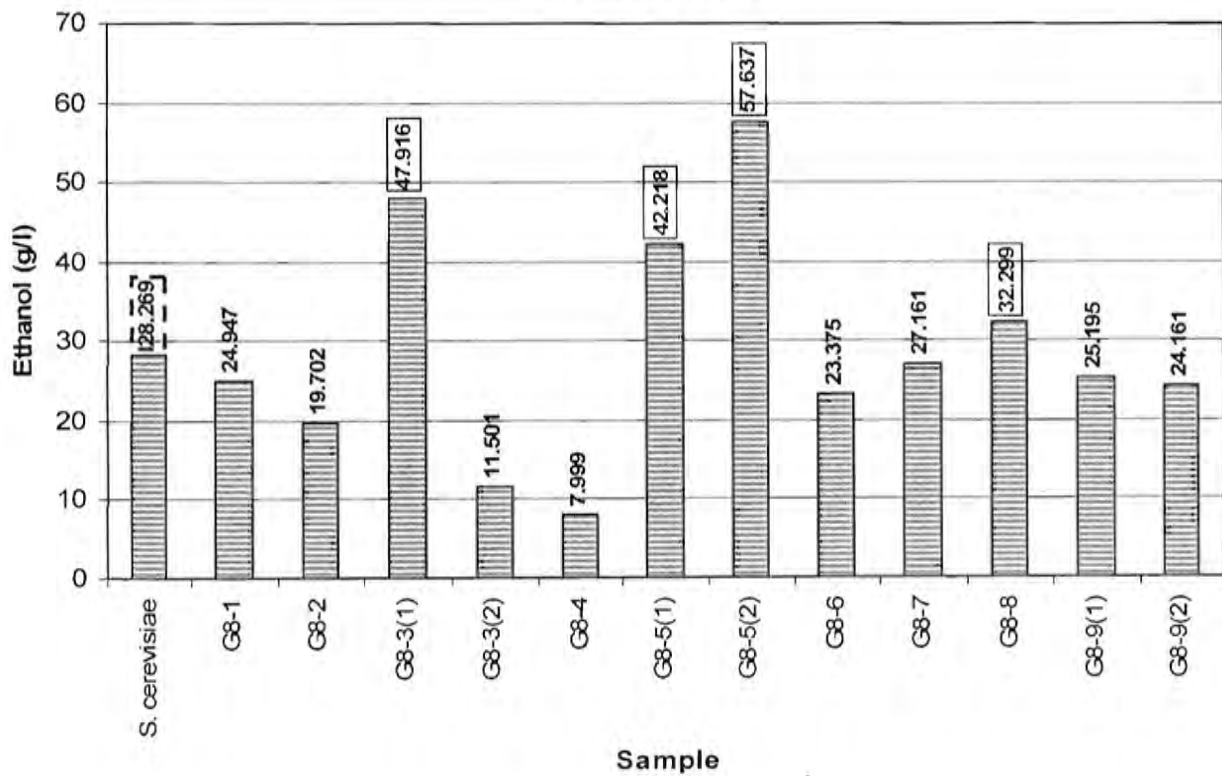
48 h



Ferment at 30 °C



Ferment at 40 °C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาล พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(control) (53.37 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

1.	G 8-1	EtOH	54.15 g/l
2.	G 8-2	"	62.59 g/l

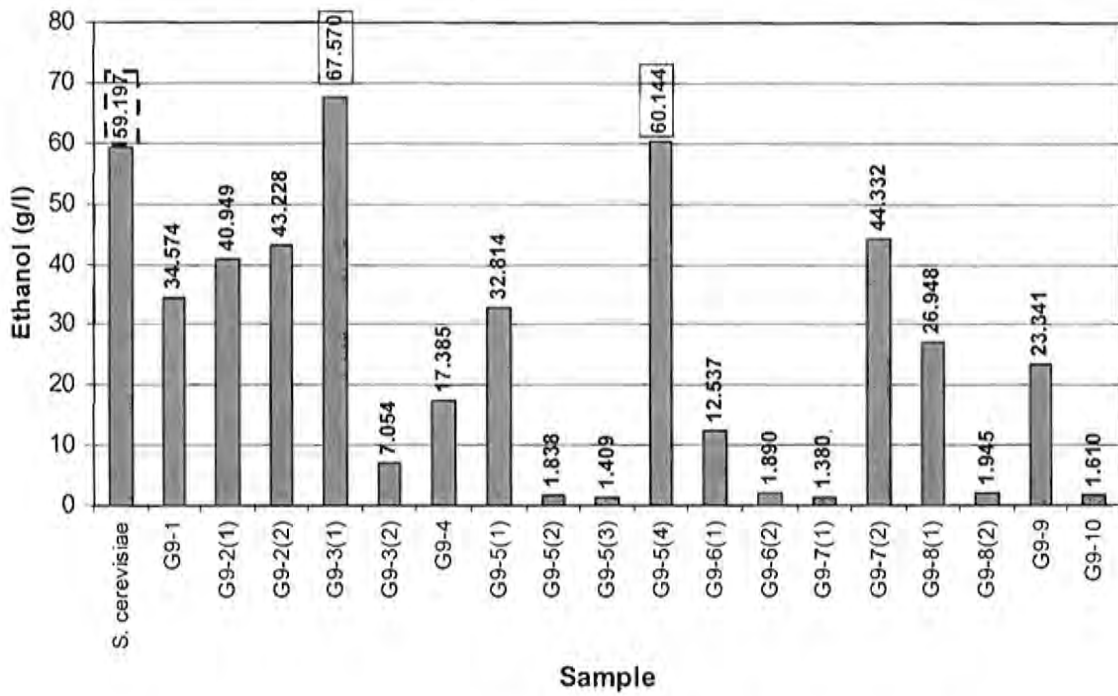
เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (28.27 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h ทั้งหมด

4 เชื้อ ดังนี้

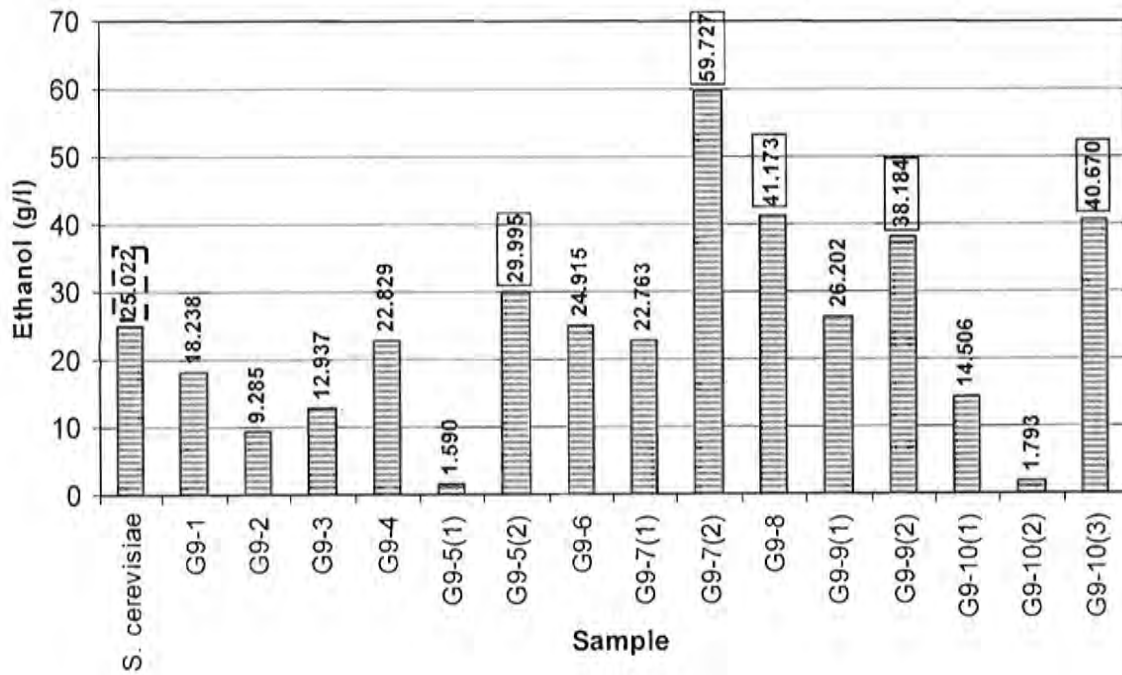
1.	G 8-3 (1)	EtOH	47.92 g/l
2.	G 8-5 (1)	"	42.22 g/l
3.	G 8-5 (2)	"	57.64 g/l
4.	G 8-8	"	32.30 g/l

2.9 โรงงานน้ำตาลราชสีห์

Ferment at 30 °C



Ferment at 40 °C



เชื้อที่แยกได้จาก โรงงานน้ำตาลราชสีมา พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(control) (59.197 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

1.	G 9-3 (1)	EtOH	67.57 g/l
2.	G 9-5 (4)	"	60.14 g/l

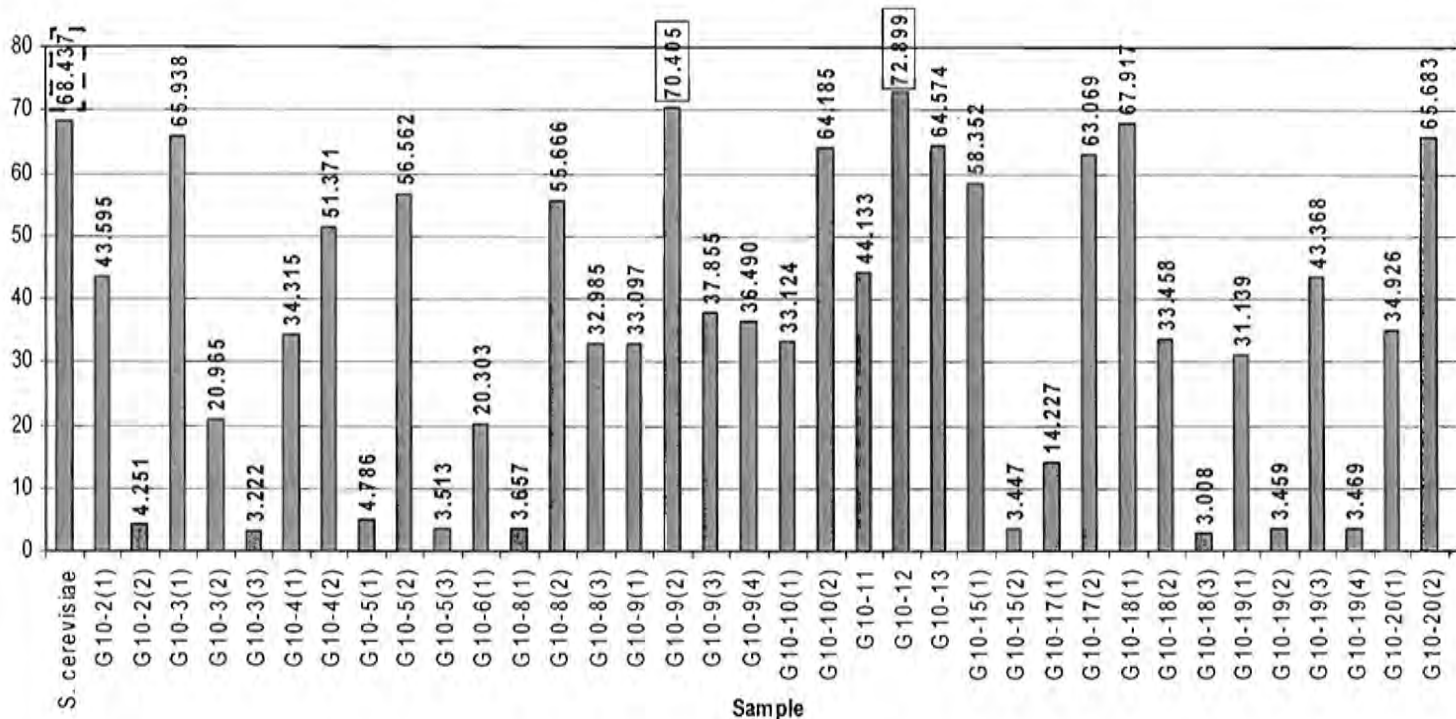
เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (25.02 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h ทั้งหมด

5 เชื้อ ดังนี้

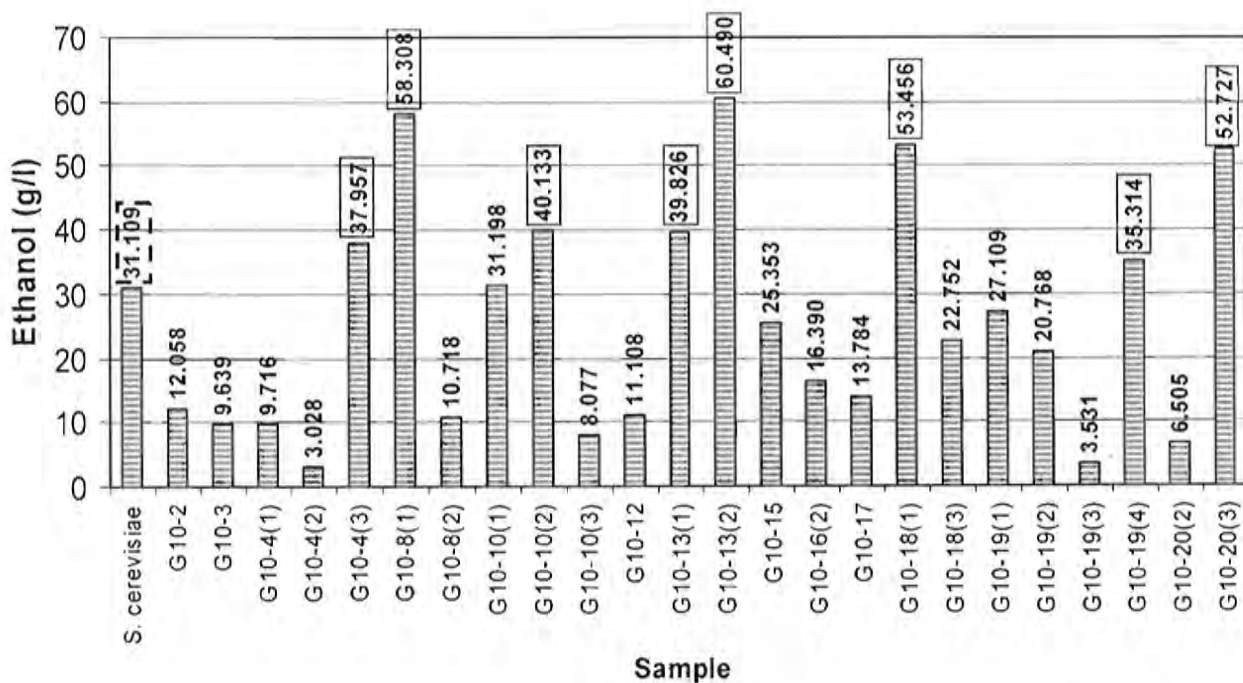
1.	G 9-5 (2)	EtOH	29.995 g/l
2.	G 9-7 (2)	"	59.73 g/l
3.	G 9-8	"	41.17 g/l
4.	G 9-9 (1)	"	26.20 g/l
5.	G 9-9 (2)	"	38.18 g/l
6.	G 9-10 (3)	"	40.67 g/l

2.10 โรงงานน้ำตาลที่อื่น

Ferment at 30 °C



Ferment at 40 °C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลที่อื่น พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(control) (68.44 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

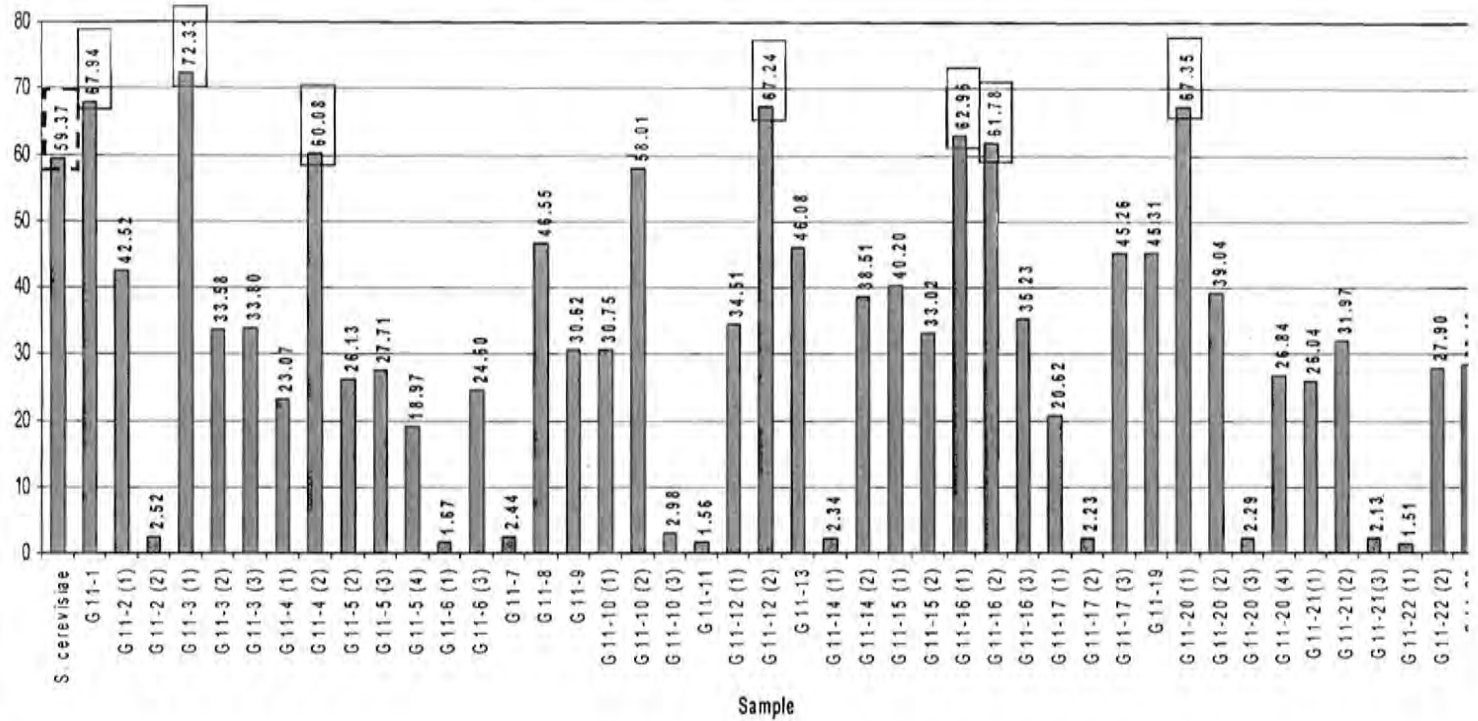
1.	G 10-9 (2)	EtOH	70.41 g/l
2.	G 10-12	"	72.899 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (31.11 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h ทั้งหมด

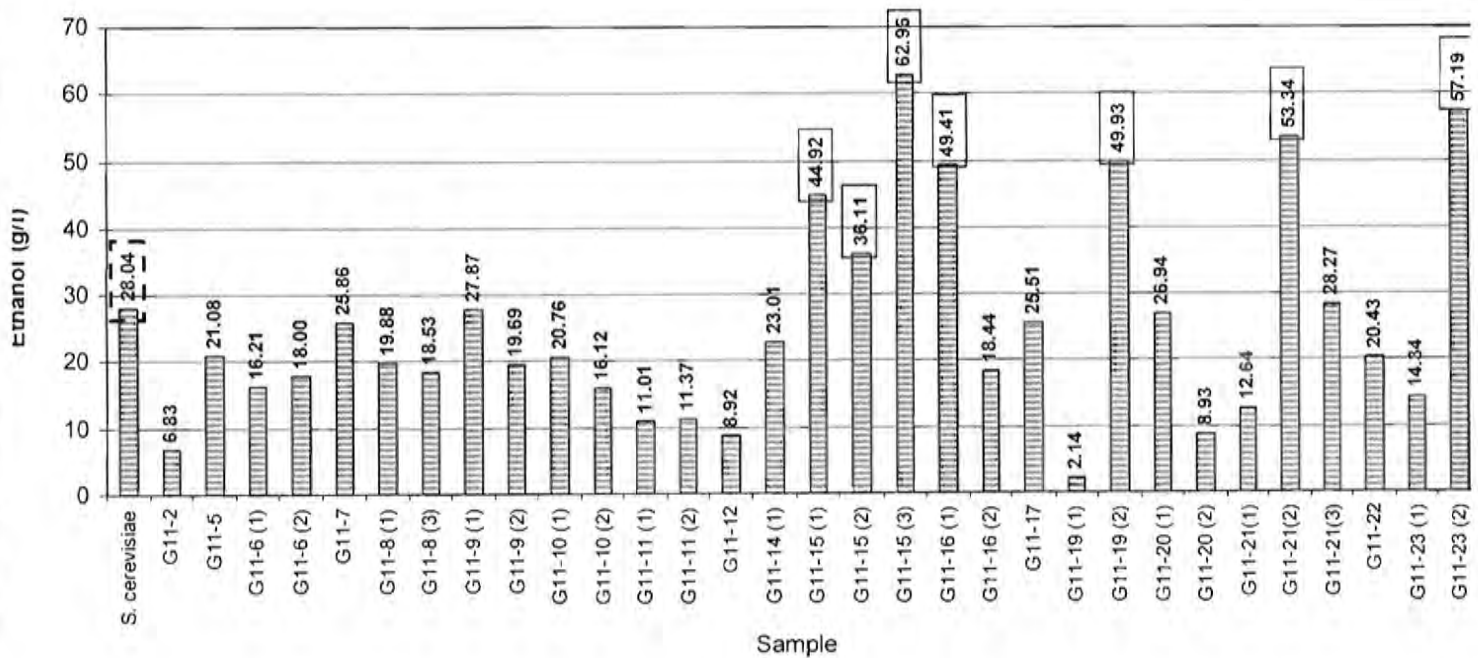
8 เชื้อ ดังนี้

1.	G 10-4 (3)	EtOH	37.96 g/l
2.	G 10-8 (1)	"	58.31 g/l
3.	G 10-10(2)	"	40.13 g/l
4.	G 10-13 (1)	"	39.83 g/l
5.	G 10-13(2)	"	60.49 g/l
6.	G 10-18 (1)	"	53.46 g/l
7.	G 10-19 (4)	"	35.31 g/l
8.	G 10-20 (3)	"	52.73 g/l

Ferment at 30 °C



Ferment at 40 °C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลสระบุรี พบว่ามีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(control) (59.38 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 7 เชื้อ ดังนี้

1.	G11-1	EtOH	67.94 g/l
2.	G11-3 (1)	"	72.33 g/l
3.	G11-4 (2)	"	60.08 g/l
4.	G11-12 (2)	"	67.24 g/l
5.	G11-16 (1)	"	62.96 g/l
6.	G11-16 (2)	"	61.78 g/l
7.	G11-20 (1)	"	67.35 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (28.05 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h

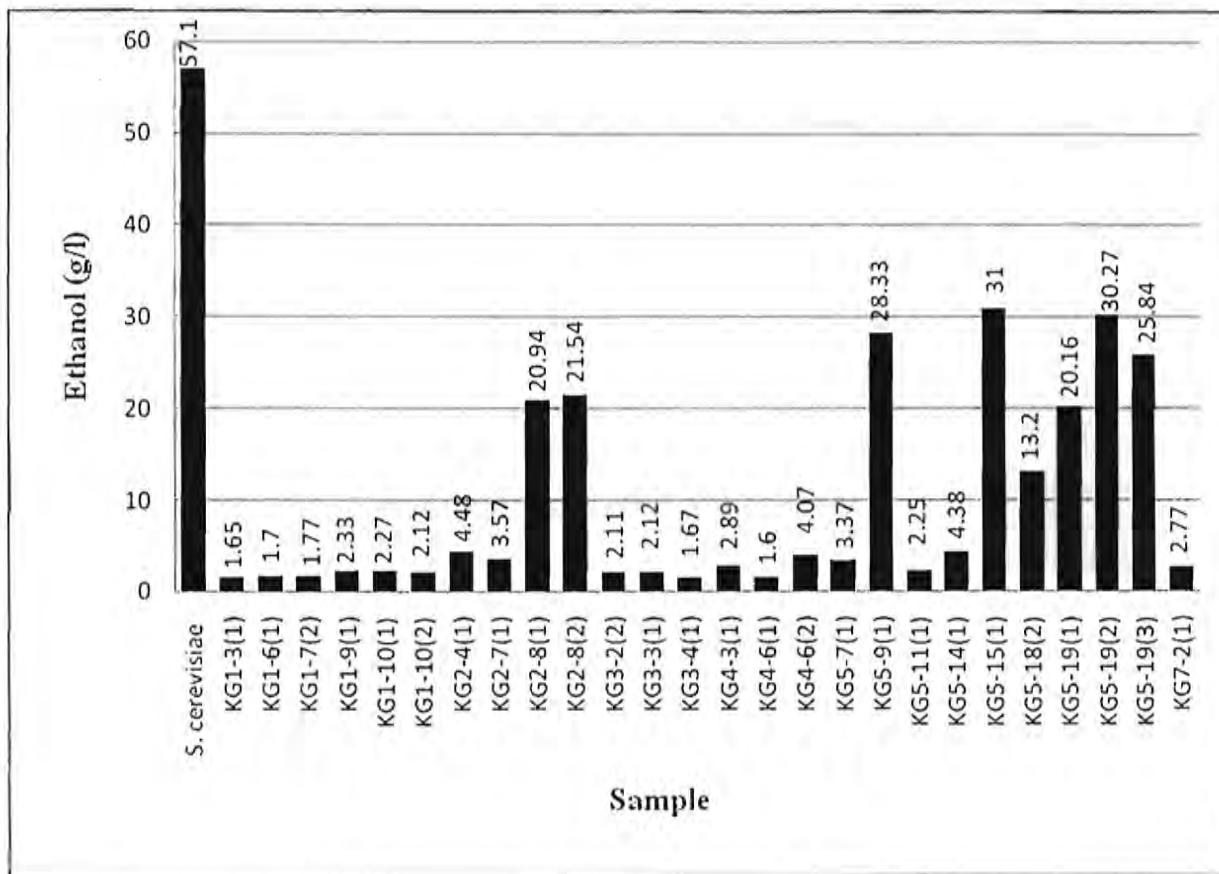
ทั้งหมด 7 เชื้อ ดังนี้

1.	G 11-15 (1)	EtOH	44.92 g/l
2.	G 11-15 (2)	"	36.11 g/l
3.	G 11-15 (3)	"	62.96 g/l
4.	G 11-16 (1)	"	49.41 g/l
5.	G 11-19(2)	"	49.93 g/l
6.	G 11-21(2)	"	53.34 g/l
7.	G 11-23(2)	"	57.19 g/l



3. ป่าพรุหนองจำรุง อ. แกลง จ. ระยอง

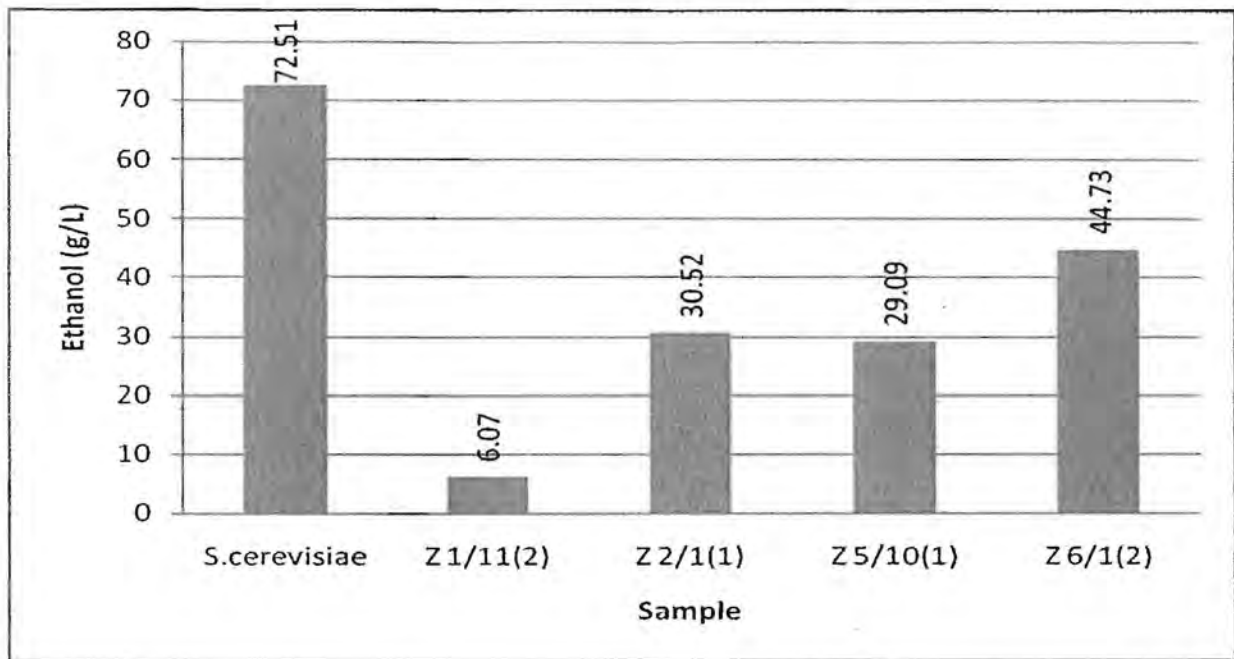
3.1 เชื้อที่เจริญบน 10% กัญโคส



พบว่าไม่มีเชื้อที่แยกได้ สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (57.1 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C

นาน 48 h

### 3.2 เชื้อที่เจริญบน 24% กัญโคส



พบว่าไม่มีเชื้อที่แยกได้จากป่าพรุหนองจำรุง สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (72.51 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h

ผลการทดสอบเชื้อที่เจริญบนอาหารกลูโคส มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้มากกว่า *S. cerevisiae* (control) ที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C จาก 13 แหล่ง จำนวน 94 เชื้อดังนี้

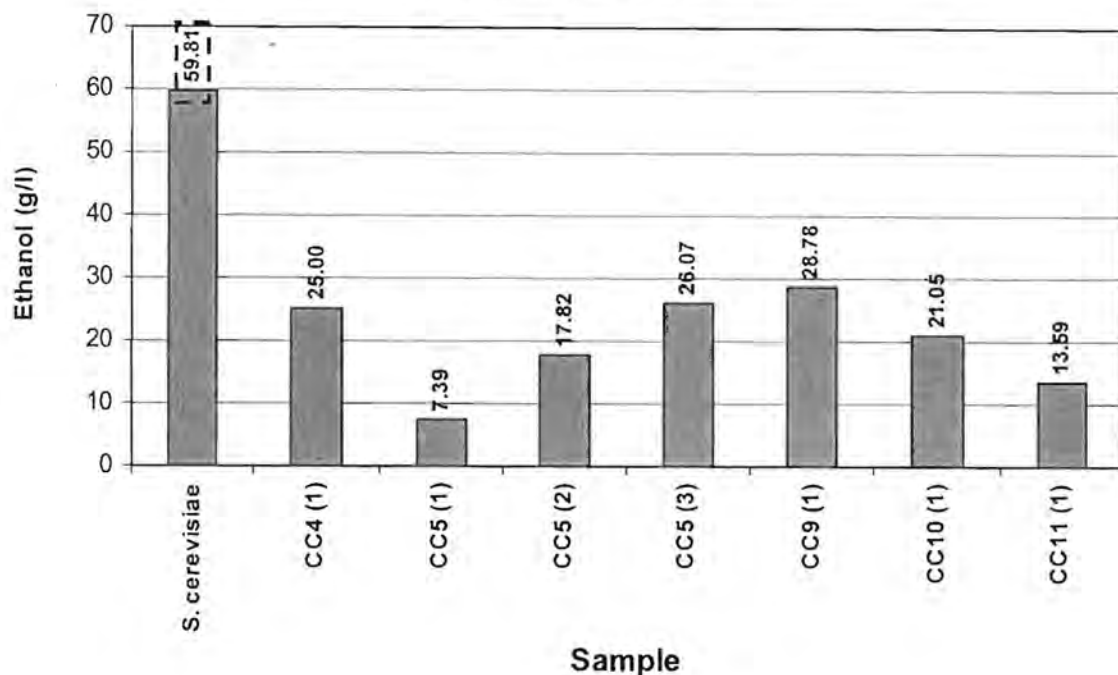
แหล่ง	อาหารกลูโคส	
	จำนวนเชื้อ (30°C)	จำนวนเชื้อ (40°C)
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	-	CG4 (1), CG 9(1)
โรงงานน้ำตาลราชบุรี	G 1-5, G 1-8, G 1-10(2), G 1-13 (1), G 1-14 (2), G 1-16(1), G 1-18(2), G 1-22 (2)	G 1-1 (3), G 1-4 (1), G 1-4 (2), G 1-6 (1), G 1-9 (1), G 1-12 (3), G 1-14 (2), G 1-15 (1), G 1-17 (1), G 1-27 (1)
โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูน อุตสาหกรรม	G 2-3 (2), G 2-4 (1), G 2-4 (2), G 2-5 (2), G 2-7 (1), G 2-10 (1), G 2-15 (1)	G 2-1 (1), G 2-3 (1), G2-3 (4), G 2-10 (1), G 2-10 (3), G 2-15 (1), G 2-16 (1), G 2-16 (3)
โรงงานไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล	G 3-3 (1)	G 3-3 (1), G 3-9 (1), G 3-10 (1), G 3-13 (2), G 3-13 (5)
โรงงานน้ำตาลสุรินทร์	-	G 4-5 (2)
โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช	-	G 5-7(1), G 5-7 (2)
โรงงานน้ำตาลครบุรี	G 6-3 (1), G 6-11 (2), G 6-11 (3), G 6-12 (2)	G 6-2 (1), G 6-2 (1), G 6-2 (1), G 6-3 (2), G 6-5, G 6-6 (2), G 6-11, G 6-12, G 6-13(1)
โรงงานน้ำตาลอีสาน	G 7-2 (2)	-
โรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์	G 8-1, G 8-2	G8-3(1), G8-5(1), G8-5(2), G8-8
โรงงานน้ำตาลราชสีมา	G 9-3 (1), G 9-5 (4)	G 9-5 (2), G 9-7 (2), G 9-8, G 9-9 (1), G 9-9 (2), G 9-10 (3)
โรงงานน้ำตาลที่เอ็น	G 10-9 (2), G 10-12	G 10-4 (3), G 10-8 (1), G 10-10(2), G 10-13 (1), G 10-13(2), G 10-18 (1), G 10-19 (4), G 10-20 (3)
โรงงานน้ำตาลสระบุรี	G11-1, G11-3 (1), G11-4 (2), G11-12 (2), G11-16 (1), G11-16 (2), G11-20 (1)	G 11-15 (1), G 11-15 (2), G 11-15 (3), G 11-16 (1), G 11-19(2), G 11-21(2), G 11-23(2)
ป่าพรุหนองจำรุง อ. แกลง จ. ระยอง	-	-
รวม	34	60

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากเชื้อที่แยกได้บนอาหารกลูโคสทั้งหมดแล้ว จึงทดสอบการหมักเอทานอลของเชื้อซึ่งแยกได้บนอาหารเซลลูโลสทั้งหมด

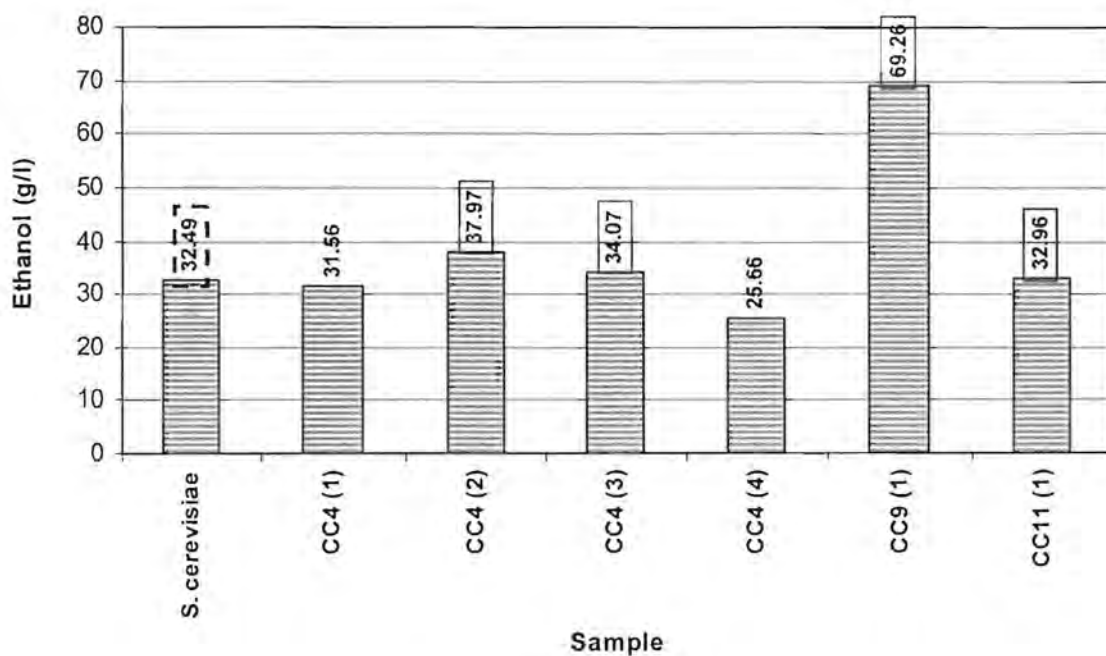
### เชื้อที่แยกได้บนอาหารเซลลูโลส (Selective cultivation)

#### 1. เชื้อที่แยกได้จากจุฬาฯ

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C



เชื้อที่แยกได้จากจุฬาร พบว่า ไม่มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (59.81 g/l) ที่

อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h และที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

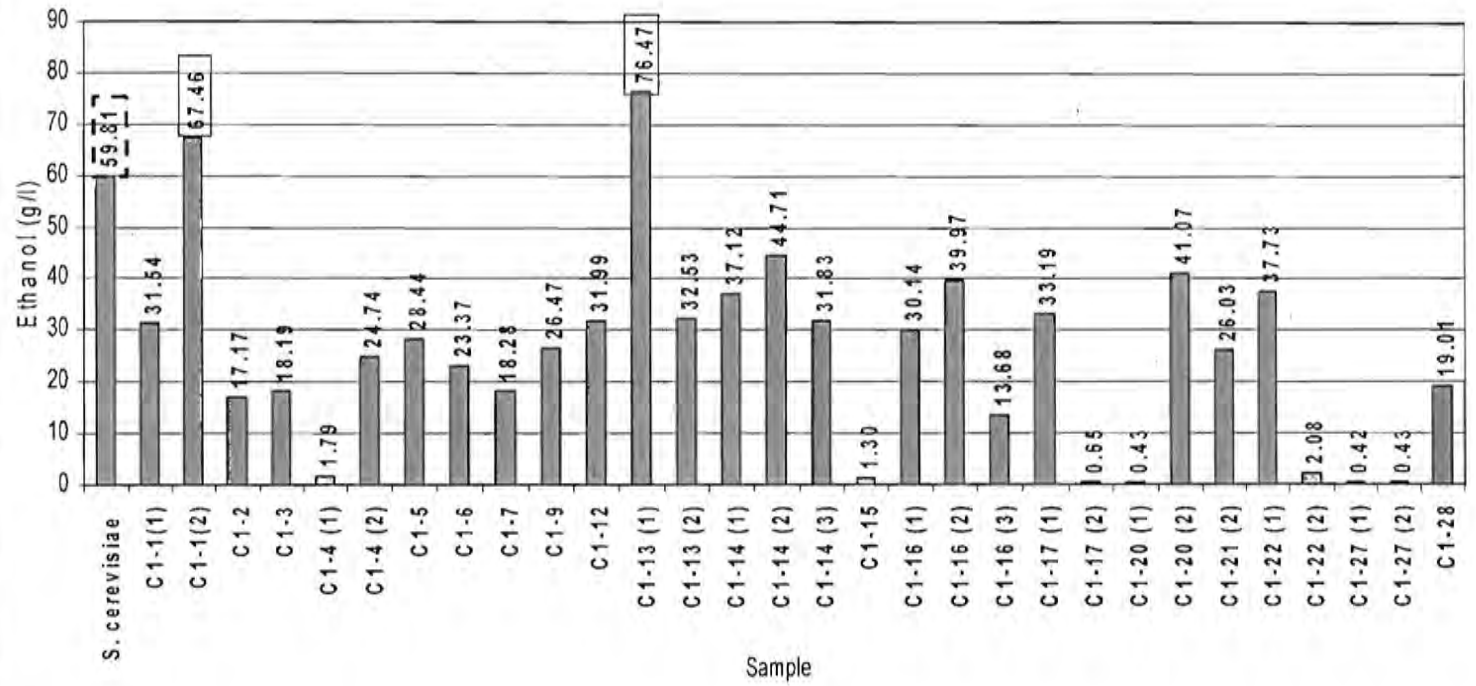
(control) (32.49 g/l) ทั้งหมด 4 เชื้อ ดังนี้

1.	CC 4 (2)	EtOH	37.97 g/l
2.	CC 4 (3)	"	34.07 g/l
3.	CC 9 (1)	"	69.26 g/l
4.	CC 11 (1)	"	32.96 g/l

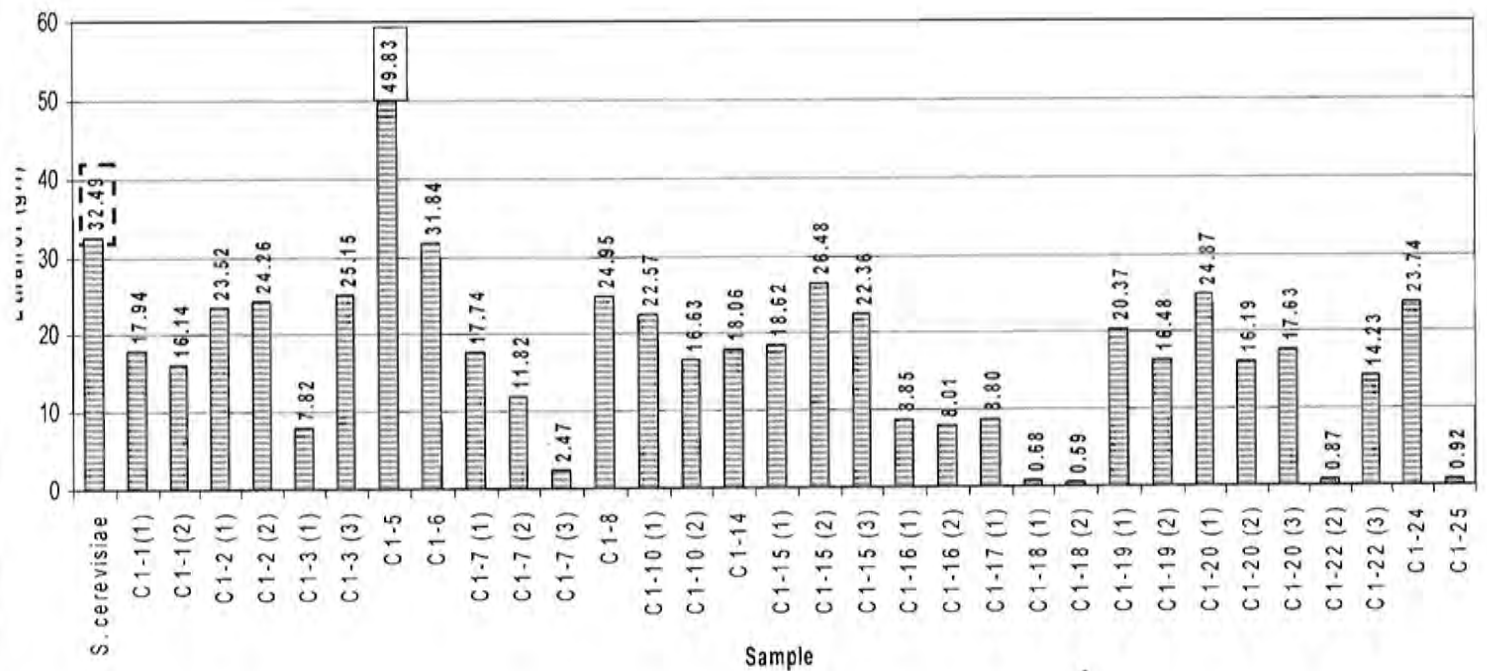
## 2. กลุ่มโรงงานน้ำตาล

### 2.1 โรงงานน้ำตาลราชบุรี

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลครบุรี มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(control) (59.81 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

1.	C 1-1 (2)	EtOH	67.46 g/l
2.	C 1-13 (1)	"	76.47 g/l

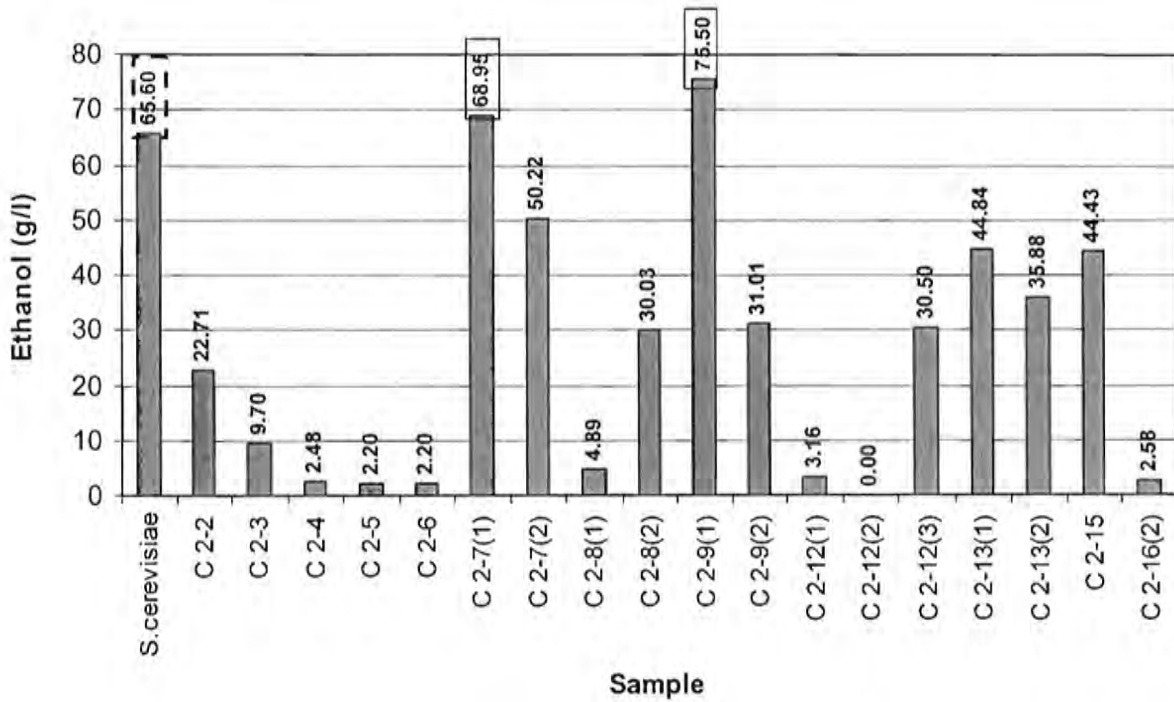
เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control) (32.49 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 1

เชื้อ ดังนี้

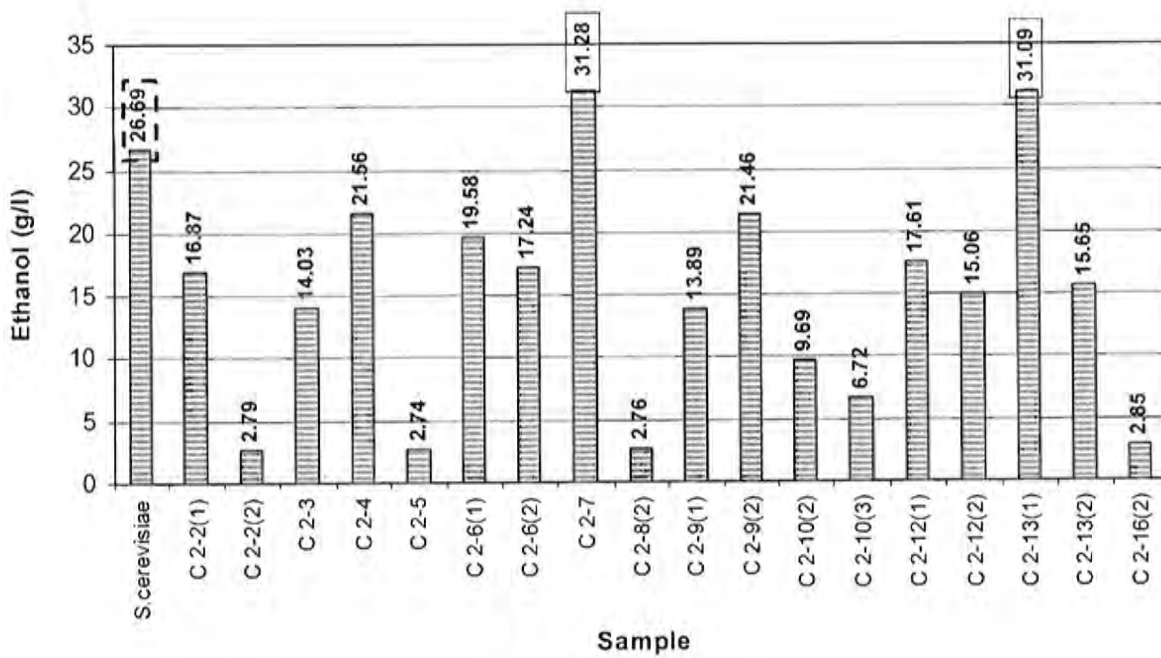
1.	C 1-5	EtOH	49.83 g/l
----	-------	------	-----------

## 2.2 โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C





เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า

*S. cerevisiae* (65.60 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

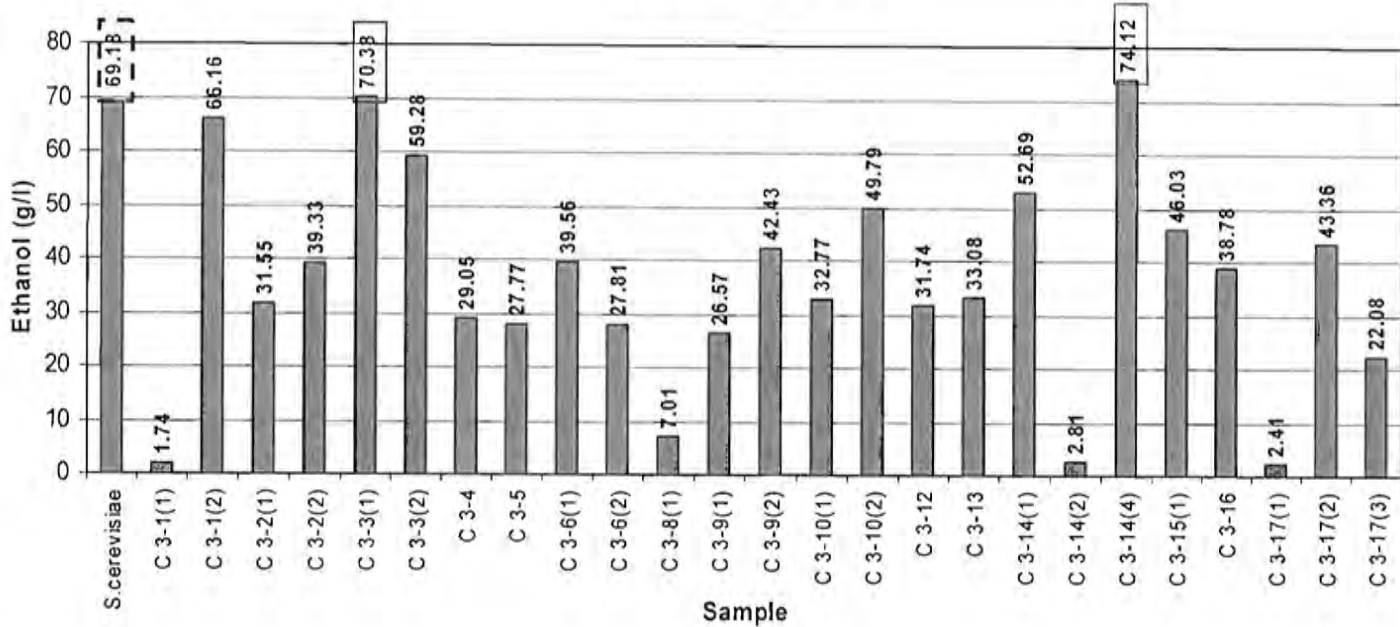
1.	C 2-7 (1)	EtOH	68.95 g/l
2.	C 2-9 (1)	"	75.50 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (26.69 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 2 เชื้อ ดังนี้

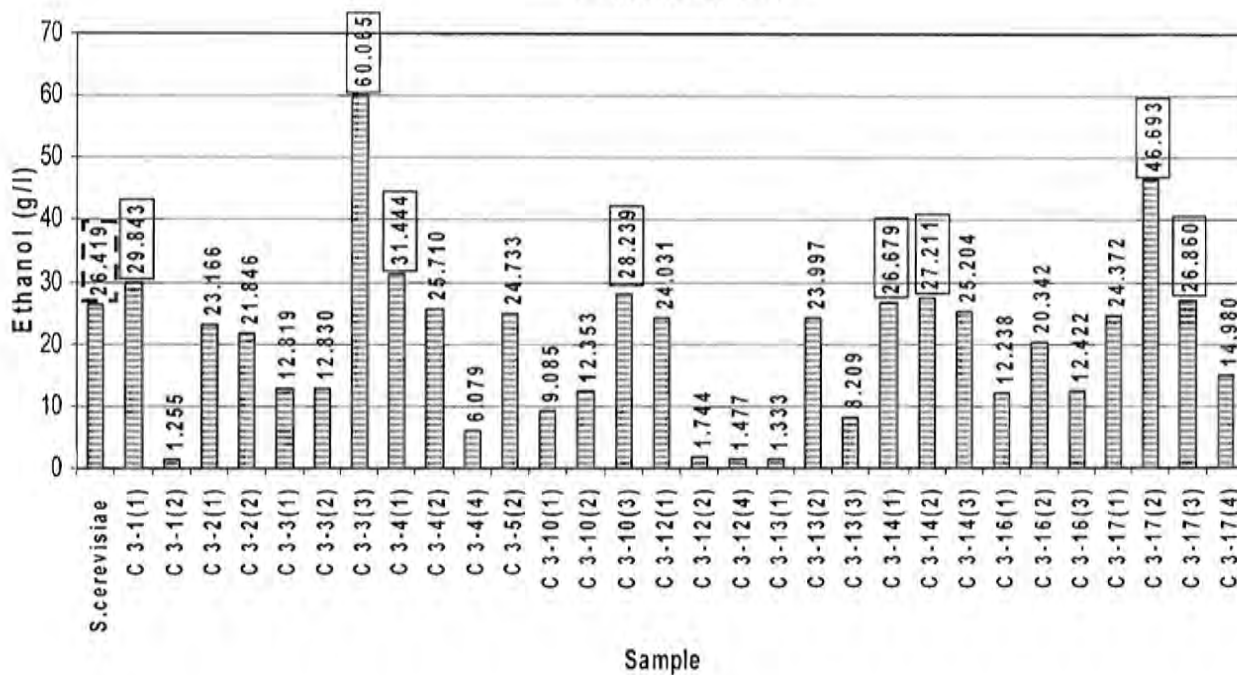
1.	C2-7	EtOH	31.28 g/l
2.	C2-13 (1)	"	31.09 g/l

2.3 โรงงานไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae*

(69.18 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

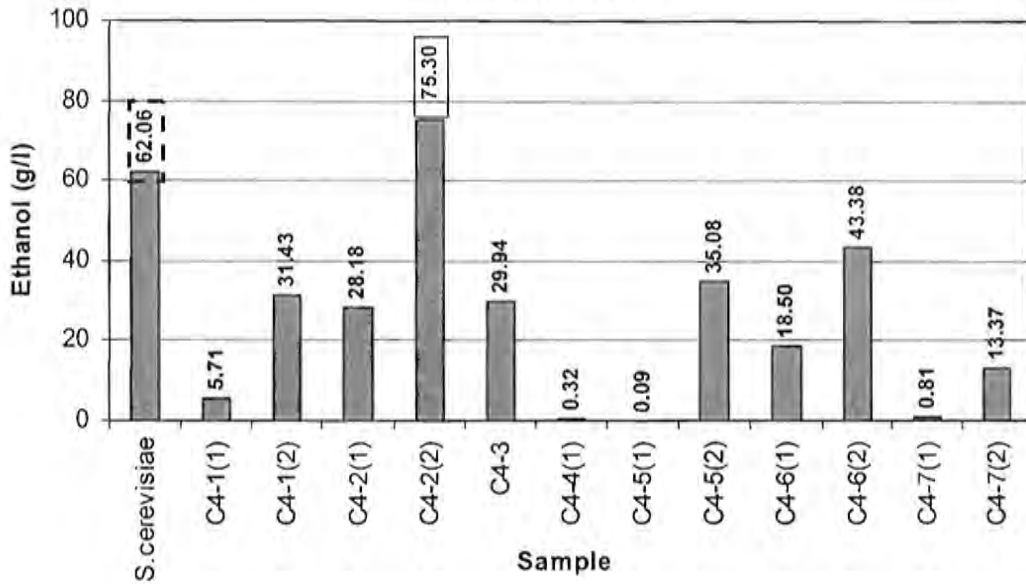
1.	C 3-3 (1)	EtOH	70.38 g/l
2.	C3-14(4)	"	74.12 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (26.42 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 8 เชื้อ ดังนี้

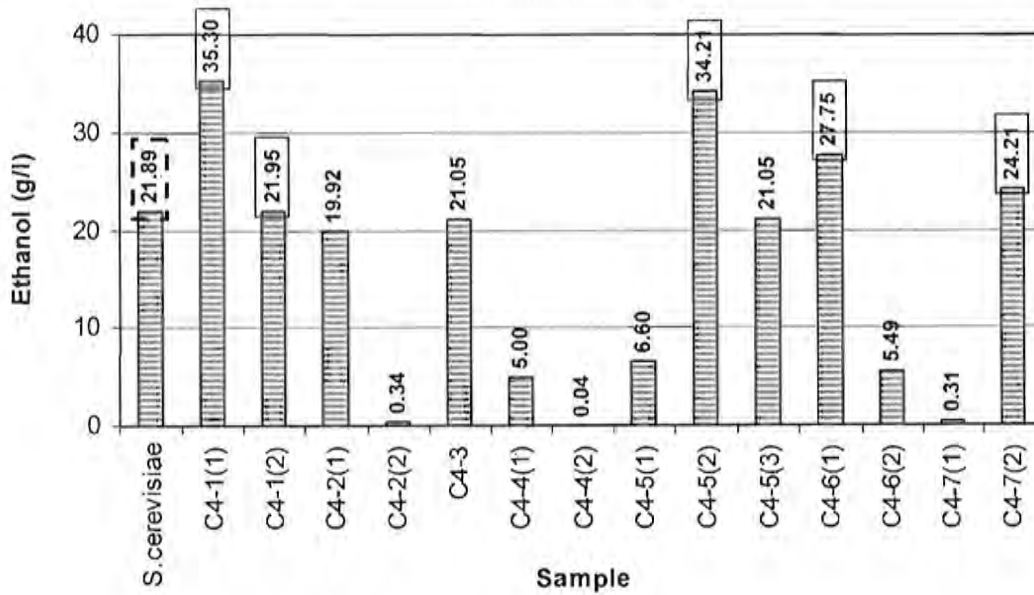
1.	C3-1(1)	EtOH	29.84 g/l
2.	C3-3(3)	"	60.07 g/l
3.	C3-4(1)	"	31.44 g/l
4.	C3-10(3)	"	28.24 g/l
5.	C3-14(1)	"	26.68 g/l
6.	C3-14(2)	"	27.21 g/l
7.	C3-17(2)	"	46.69 g/l
8.	C3-17(3)	"	26.86 g/l

## 2.4 โรงงานน้ำตาลสุรินทร์

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลสุรินทร์ มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (62.06 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 1 เชื้อ ดังนี้

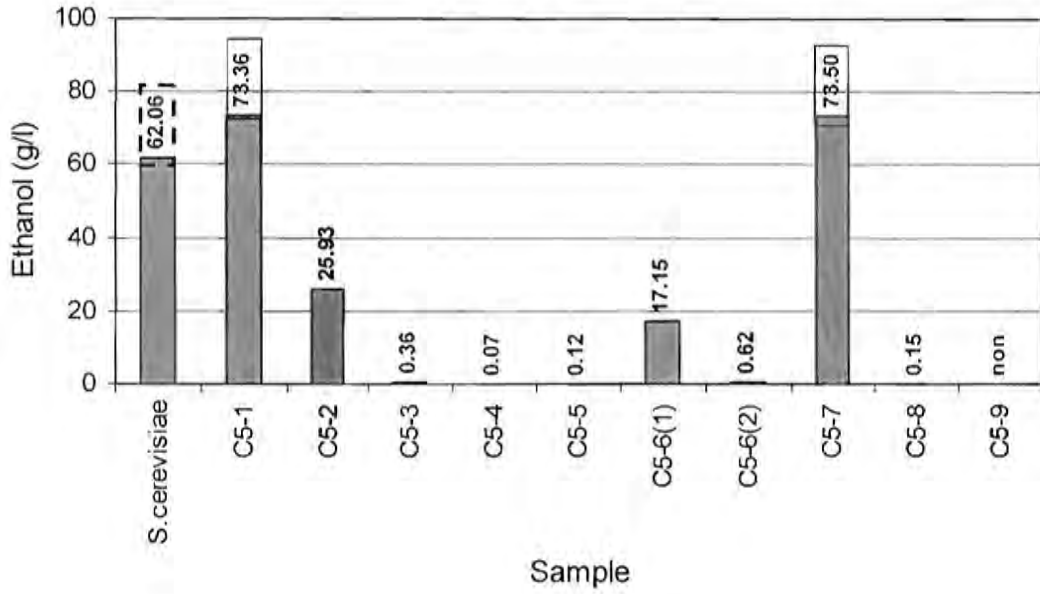
1.	G 4-2 (2)	EtOH	75.30 g/l
----	-----------	------	-----------

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (21.89 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 5 เชื้อ ดังนี้

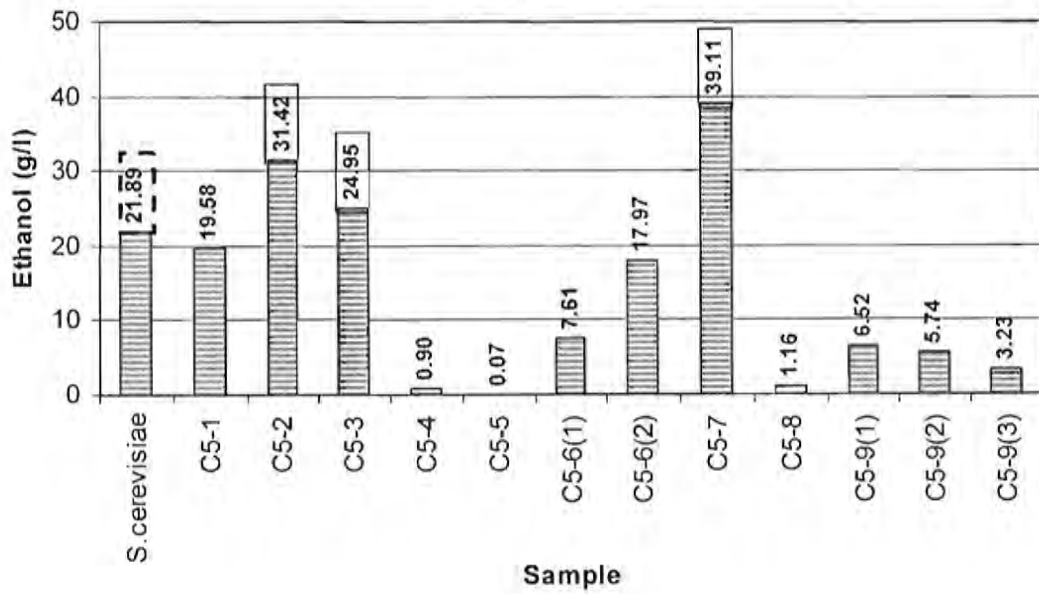
1.	C4-1(1)	EtOH	35.30 g/l
2.	C4-1(2)	"	21.95 g/l
3.	C4-5(2)	"	34.21 g/l
4.	C4-6(1)	"	27.75 g/l
5.	C4-7(1)	"	24.21 g/l

2.5 โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C



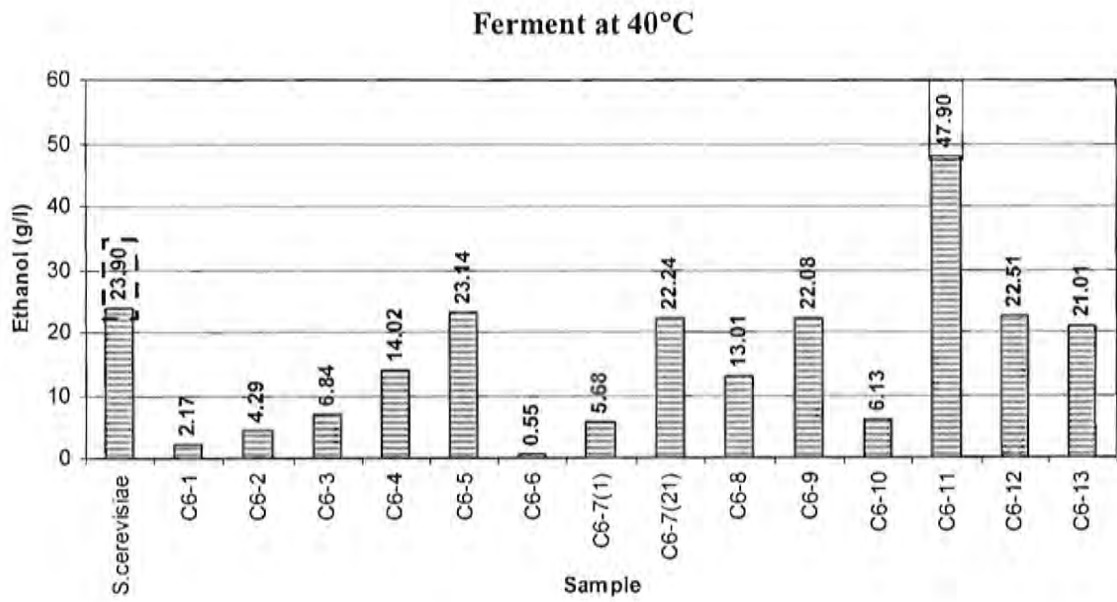
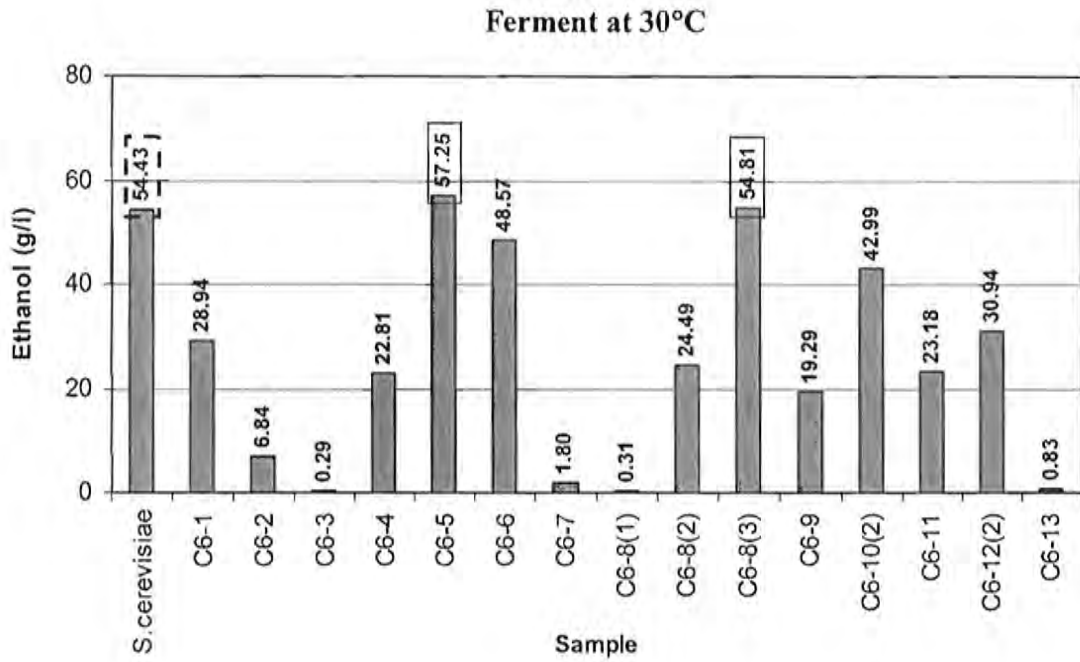
เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (62.06 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

1.	C5-1	EtOH	73.36 g/l
2.	C5-7	"	73.50 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (21.89 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 3 เชื้อ ดังนี้

1.	C5-2	EtOH	31.42 g/l
2.	C5-3	"	24.95 g/l
3.	C5-7	"	39.11 g/l

2.6 โรงงานน้ำตาลนครบุรี





เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลนครบุรี มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (54.43 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 2 เชื้อ ดังนี้

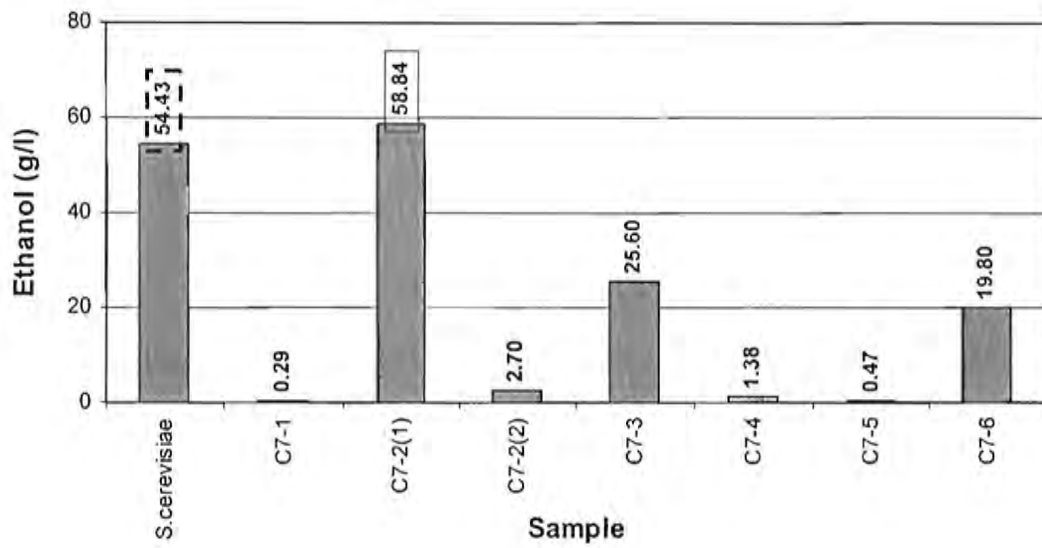
1.	C6-5	EtOH	57.25 g/l
2.	C6-8(3)	"	54.81 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (23.90 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 1 เชื้อ ดังนี้

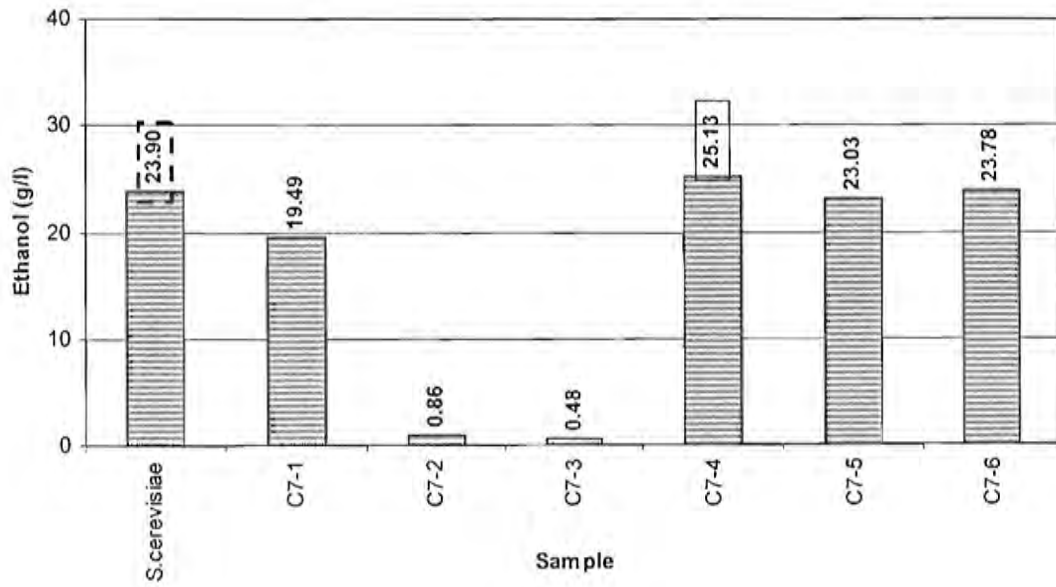
1.	C6-11	EtOH	47.90 g/l
----	-------	------	-----------

## 2.7 โรงงานน้ำตาลอีสาน

### Ferment at 30°C



### Ferment at 40°C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอีสาน มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (54.43 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 1 เชื้อ ดังนี้

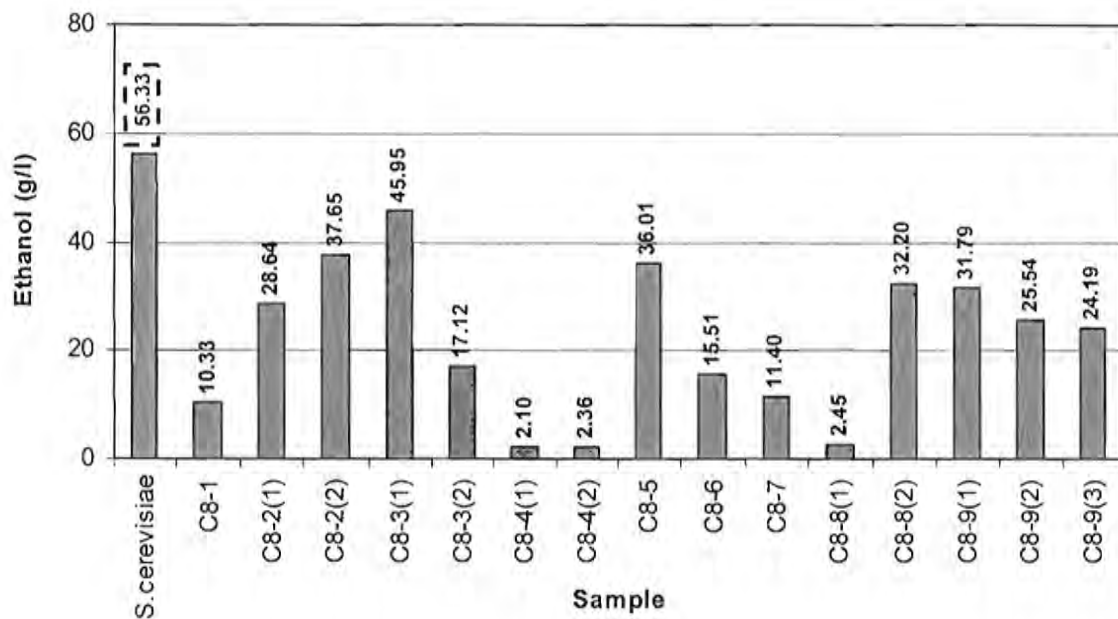
1. C 7-2 (1) EtOH 58.84 g/l

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (23.90 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 1 เชื้อ ดังนี้

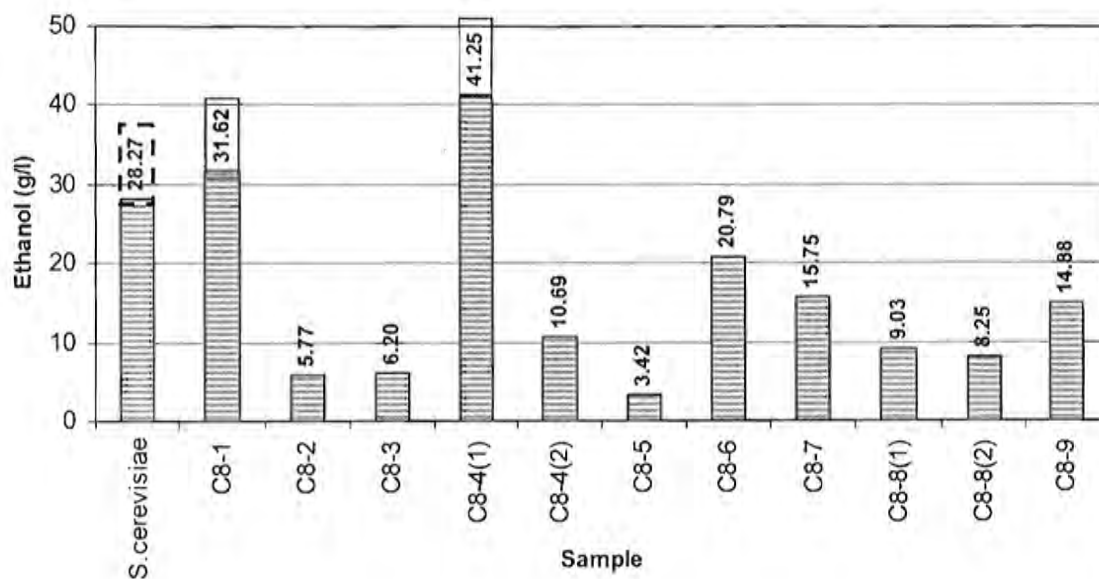
1. C7-4 EtOH 25.13 g/l

2.8 โรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C



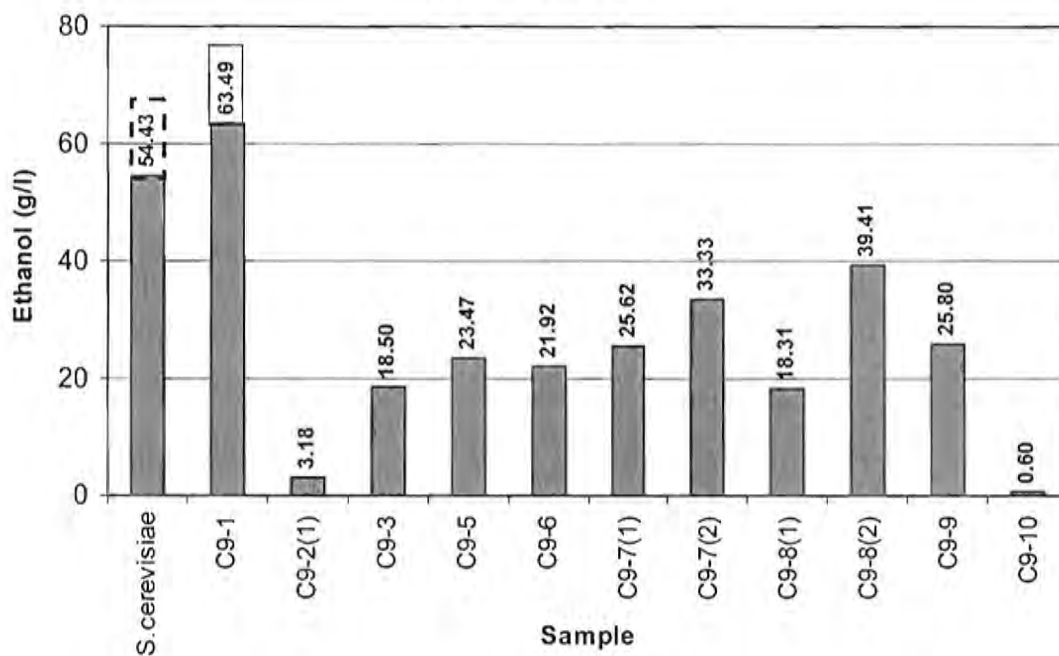
เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์ ไม่มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (56.33 g/l)  
ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (28.27 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 2 เชื้อ ดังนี้

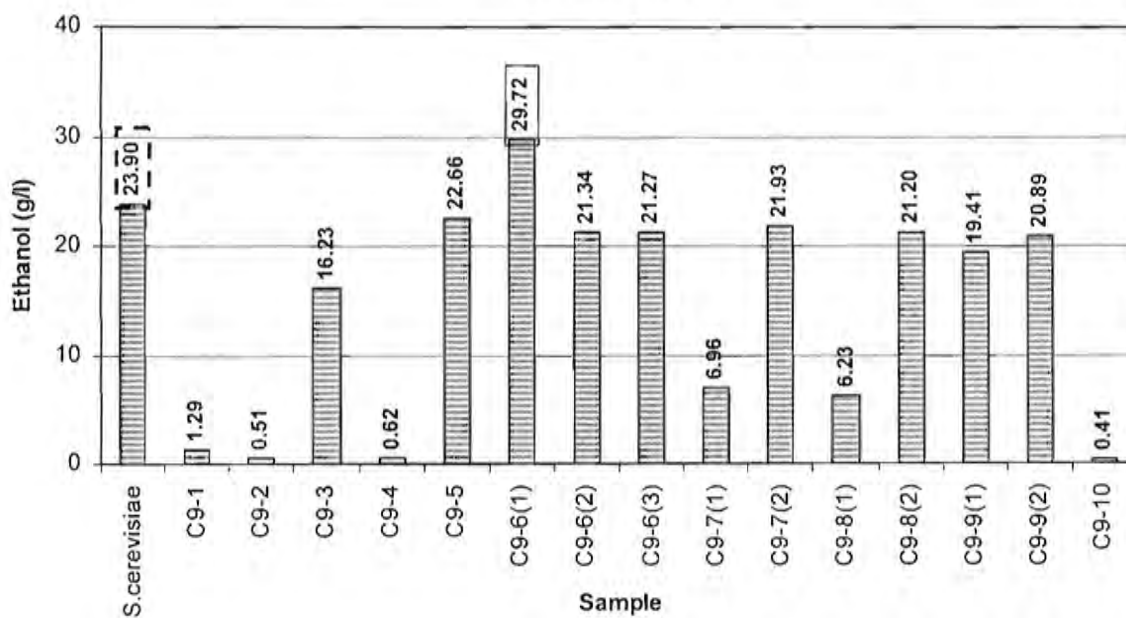
1.	C8-1(1)	EtOH	31.62 g/l
2.	C8-4(1)	"	41.25 g/l

2.9 โรงงานน้ำตาลราชสีมา

Ferment at 30°C



Ferment at 40°C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชสีมา มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (54.43 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 1 เชื้อ ดังนี้

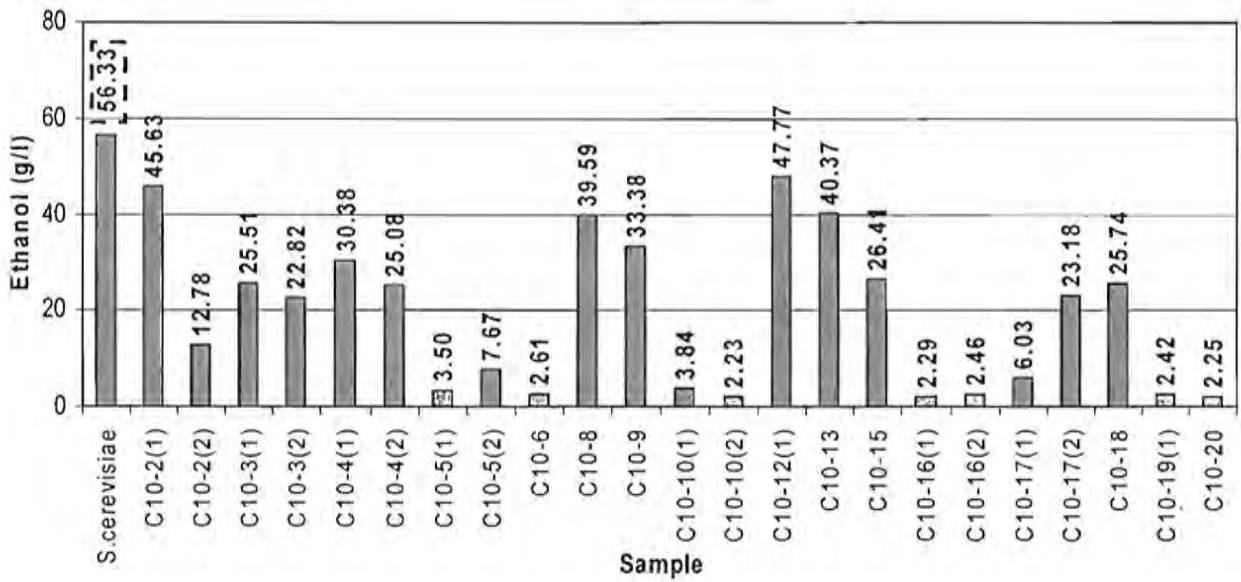
1.	C9-1	EtOH	63.49 g/l
----	------	------	-----------

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (23.90 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 1 เชื้อ ดังนี้

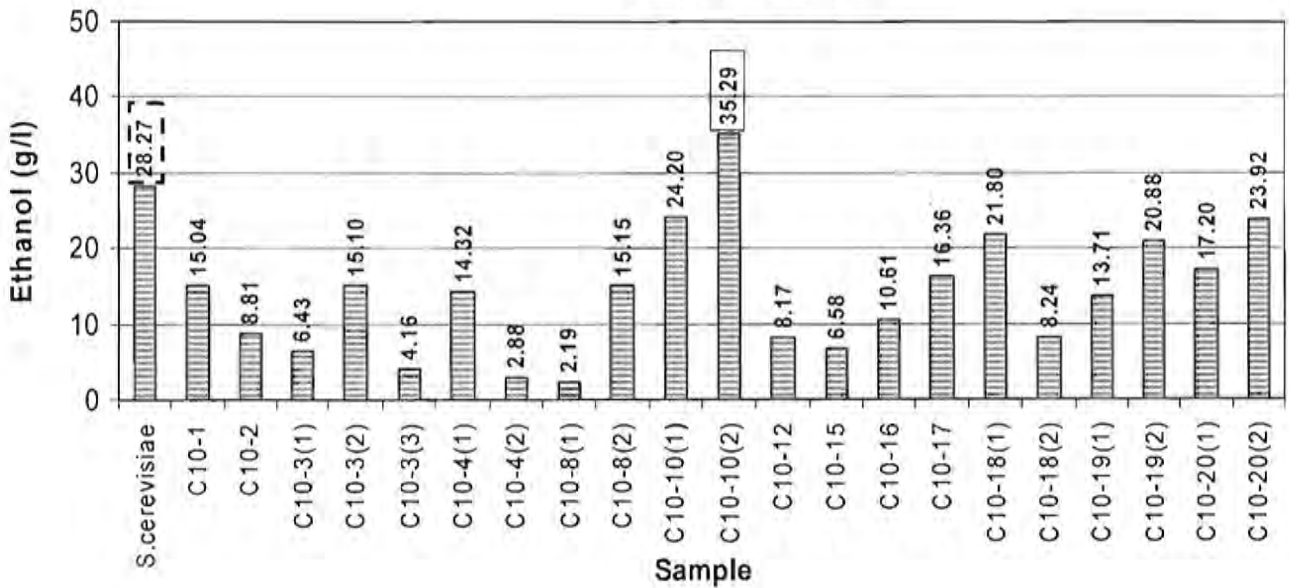
1.	C9-6(1)	EtOH	29.72 g/l
----	---------	------	-----------

## 2.10 โรงงานน้ำตาลที่เอ็น

### Ferment at 30°C



### Ferment at 40°C





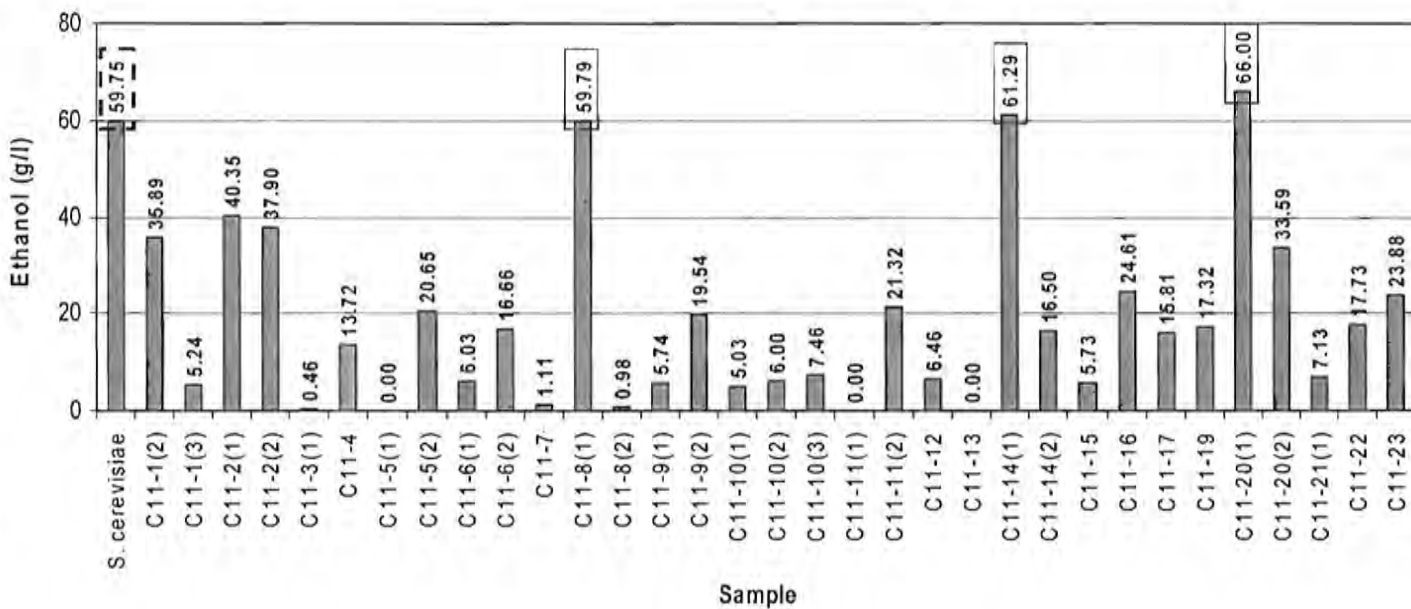
เชื้อที่แยกได้จาก โรงงานน้ำตาลที่เอ็น ไม่มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (56.33 g/l) ที่ อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h

เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (28.27g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 1 เชื้อ ดังนี้

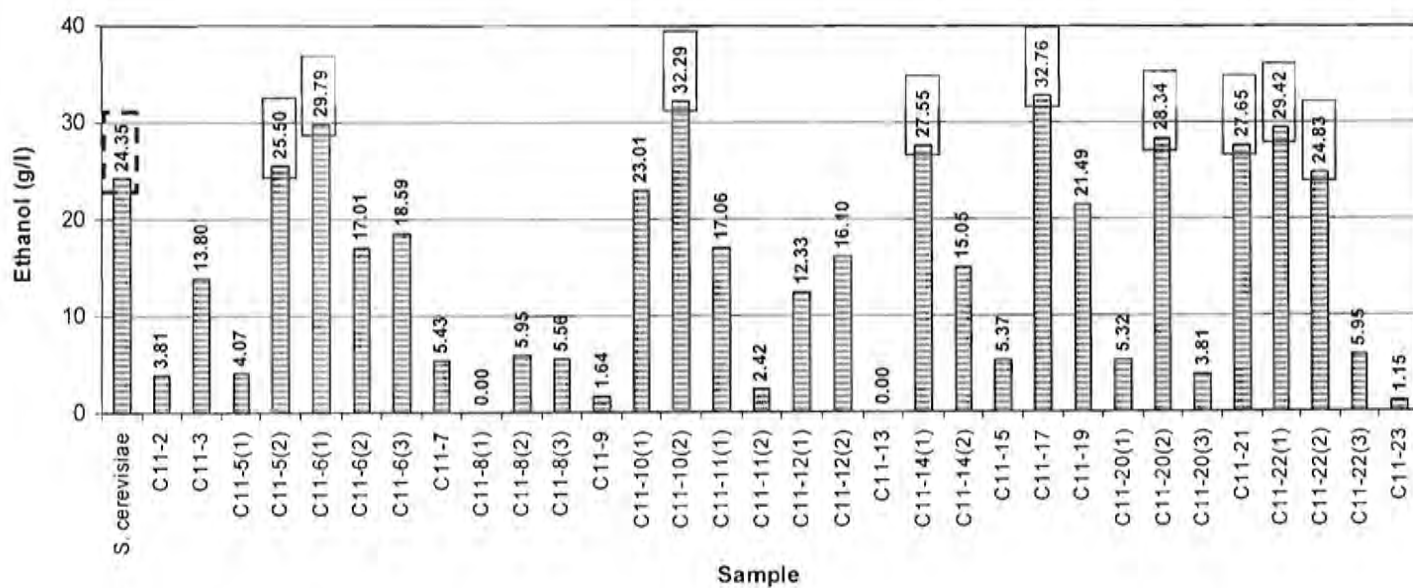
1.	C10-10(2)	EtOH	35.29 g/l
----	-----------	------	-----------

## 2.11 โรงงานน้ำตาลสระบุรี

### Ferment at 30°C



### Ferment at 40°C



เชื้อที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลสระบุรี มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (59.75 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h ทั้งหมด 3 เชื้อ ดังนี้

1.	C11-8 (1)	EtOH	59.79 g/l
2.	C11-14 (1)	"	61.29 g/l
3.	C11-20 (1)	"	66.00 g/l

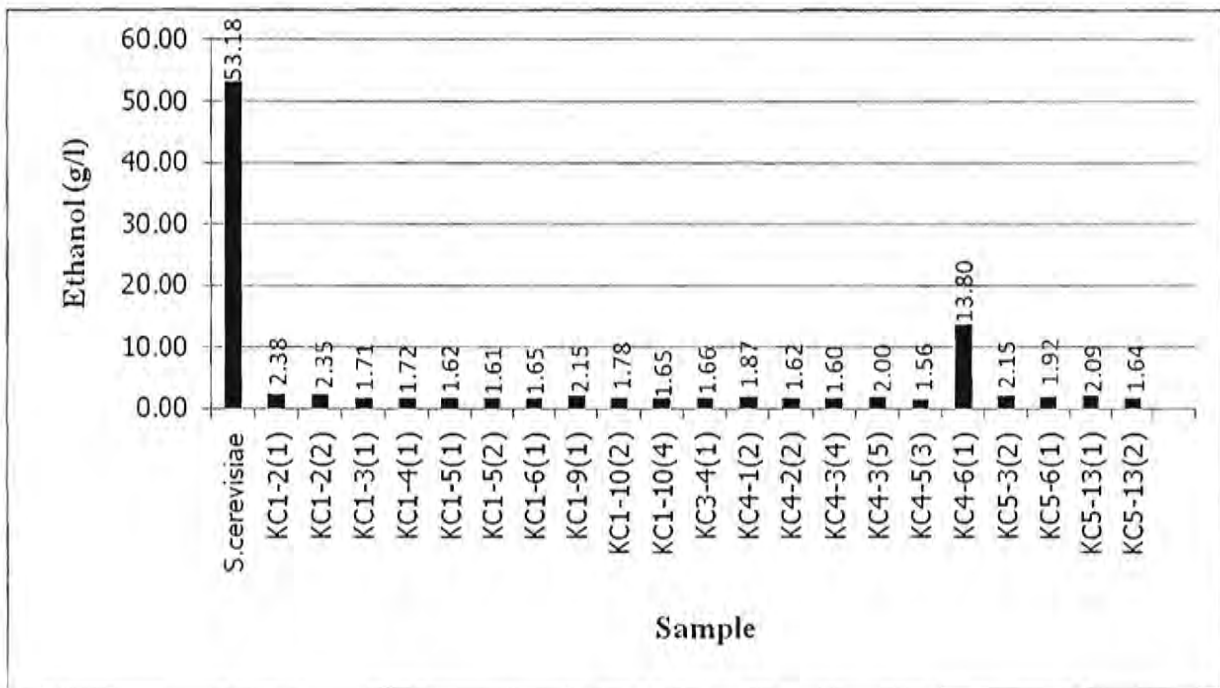
เชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (24.35 g/l) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 h มี 9 เชื้อ ดังนี้

1.	C11-5 (2)	EtOH	25.25 g/l
2.	C11-6 (1)	"	29.79 g/l
3.	C11-10 (2)	"	32.29 g/l
4.	C11-14 (1)	"	27.55 g/l
5.	C11-17	"	32.76 g/l
6.	C11-20 (2)	"	28.34 g/l
7.	C11-21	"	27.65 g/l
8.	C11-22 (1)	"	29.42 g/l
9.	C11-22 (2)	"	24.83 g/l

### 3. ป่าพรุหนองจำรุง อ. แกลง จ. ระยอง

#### 3.1 ผลการหมักเอทานอลโดยยีสต์ที่แยกได้บนอาหาร cellulose

นำเชื้อที่แยกได้บนอาหาร cellulose ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถหมักน้ำตาล glucose เป็น เอทานอล ที่ 30°C ในสภาพจำกัดออกซิเจน



พบว่าเชื้อที่แยกได้จากป่าพรุหนองจำรุง ไม่มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (control)

(53.18 g/l) ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 h

ผลการทดสอบเชื้อที่เจริญบนอาหารเซลลูโลส มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้มากกว่า *S. cerevisiae*

(control) ที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C จาก 13 แหล่ง จำนวน 54 เชื้อดังนี้

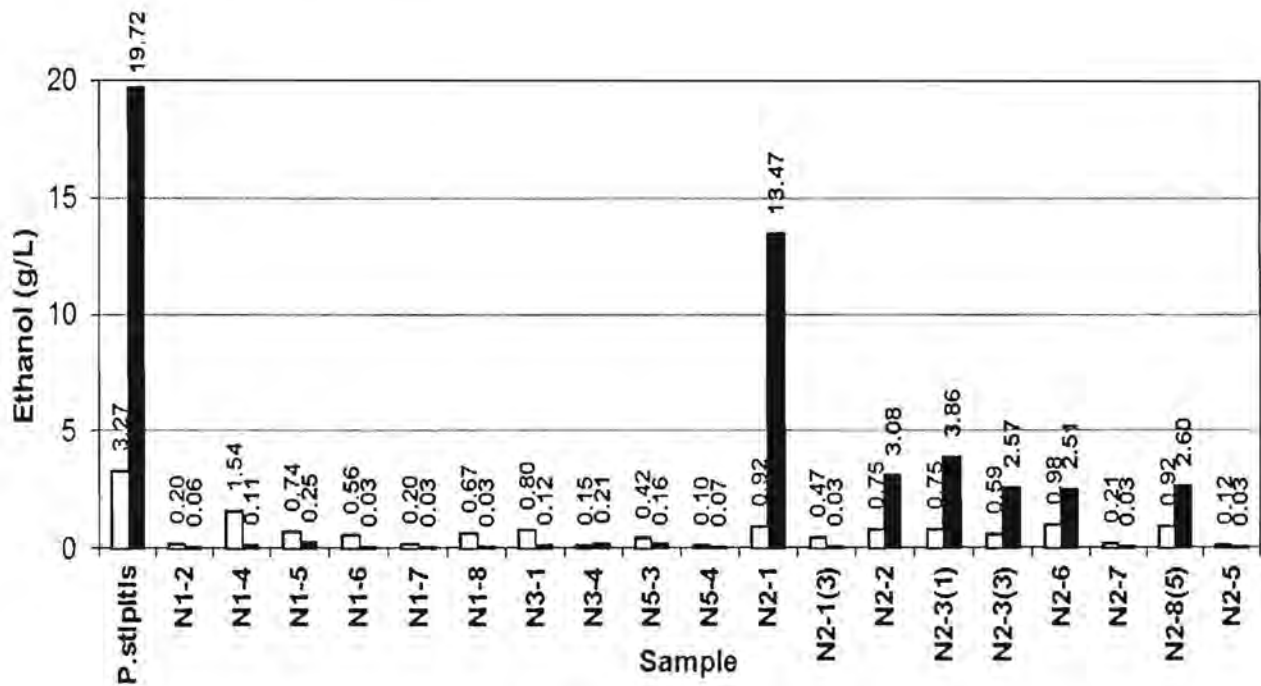
แหล่ง	อาหารกลูโคส	
	จำนวนเชื้อ (30°C)	จำนวนเชื้อ (40°C)
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	-	CC4(2), CC4(3), CC9(1), CC11(2)
โรงงานน้ำตาลราชบุรี	C 1-1(2), C 1-13 (1)	C 1-5
โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูน อุตสาหกรรม	C 2-7 (1), C 2-9 (1)	C 2-7 (1), C 2-13 (1)
โรงงานไทยอุตสาหกรรมน้ำตาล	C 3-3 (1), C 3-14 (4)	C 3-1 (1), C 3-3 (3), C 3-4 (1), C 3-10 (3), C 3-14 (1), C 3-14 (2), C 3-17 (2), C 3-17 (3)
โรงงานน้ำตาลสุรินทร์	C 4-2 (2)	C 4-1 (1), C 4-1 (2), C 4-5 (2), C 4-6 (1), C 4-7 (1)
โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช	C 5-1, C 5-7	C 5-2, C 5-3, C 5-7
โรงงานน้ำตาลครบุรี	C 6-5, C 6-8 (3)	C 6-11
โรงงานน้ำตาลอีสาน	C 7-2 (1)	C 7-4
โรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์	-	C 8-1, C 8-4 (1)
โรงงานน้ำตาลราชสีมา	C 9-1	C 9-6 (1)
โรงงานน้ำตาลที่เอ็น	-	C 10-10 (2)
โรงงานน้ำตาลสระบุรี	C 11-8 (1), C 11-14 (1), C 11-20 (3)	C 11-5 (2), C 11-6 (1), C 11-10(2), C 11-14(1),C11-17, C 11-20 (2), C 11-21,C11-22(1), C 11-22(2)
ป่าพรุหนองจำรุง อ. แกลง จ. ระยอง	-	-
รวม	16	38

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากเชื้อที่แยกได้บนอาหารเซลลูโลสทั้งหมดแล้ว จึงทดสอบ

การหมักเอทานอลจากเชื้อที่แยกได้บนอาหารไซโลสจากป่าพรุหนองจำรุง อ.แกลง จ.ระยอง ที่อุณหภูมิ 30°C

### 3.2 ผลการหมักเอทานอลโดยยีสต์ที่แยกได้บนอาหารไซโลส

นำเชื้อที่แยกได้บนอาหารไซโลสทั้งหมดมาทดสอบความสามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลที่ 30°C ในสภาพมีออกซิเจนและสภาพจำกัดออกซิเจน



หมายเหตุ: □ สภาพจำกัดออกซิเจน  
■ สภาพให้อากาศ

ผลการทดสอบเชื้อที่เจริญบนอาหารไซโลส ไม่มีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลได้มากกว่า *P. stipitis* (control) ที่อุณหภูมิ 30°C และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากเชื้อที่แยกได้บนอาหารไซโลสทั้งหมดแล้ว จึงทำการจำแนกชนิดของยีสต์สามารถหมักเอทานอลที่แยกได้

### 3.3 ผลการคัดกรองยีสต์ทนแรงดันออสโมติก

นำเชื้อซึ่งสามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้สูงกว่า *S. cerevisiae* ที่แยกได้มาคัดกรอง Osmotolerant Yeast โดยทดสอบการเจริญในสภาวะความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (YPD medium กลูโคส 24%) เปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* โดยวัดค่าการเจริญที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C shaker 200 rpm นาน 24 ชั่วโมง จากค่าความขุ่น (OD<sub>660</sub>)

#### 3.3.1 ผลการเจริญ(OD<sub>660</sub>) ของเชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 30°C

เชื้อ (อุณหภูมิ 30°C)	OD660
G1-5(1)	1.270
G1-8(1)	1.516
G1-10 (2)	0
G1-13 (1)	0.397
G1-14 (2)	0
G1-16 (1)	0.370
G1-18 (2)	0
G1-22 (2)	0
G2-3 (2)	1.266
G2-4 (1)	1.988
G2-4 (2)	0
G2-5 (2)	2.333
G2-7 (1)	0.542
G2-10 (1)	2.169
G2-15 (1)	2.475
G3-3 (1)	1.332
G6-3 (1)	0.579
G6-11 (2)	1.413
G6-11 (3)	1.708
G6-12 (2)	2.447
G7-2 (2)	0
G8-1(1)	2.457
G8-2(1)	0

พบว่าการเจริญในสภาวะความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (YPD medium กลูโคส 24%) เปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* โดยทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 30°C, 200 rpm นาน 24 ชั่วโมง มีเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น Osmotolerant Yeast ที่เจริญได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (1.294) ทั้งหมด 10 เชื้อ ดังนี้

1. G1-8 (1)	OD <sub>660</sub>	1.516
2. G2-4 (1)	“	1.988
3. G2-5 (2)	“	2.333
4. G2-10 (1)	“	2.169
5. G2-15(1)	“	2.475
6. G3-3(1)	“	1.332
7. G6-11(2)	“	1.413
8. G6-11(3)	“	1.708
9. G6-12(2)	“	2.447
10. G8-1	“	2.475



3.3.2 ผลการเจริญ(OD<sub>660</sub>) ของเชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 40°C

เชื้อ (อุณหภูมิ 40°C)	OD <sub>660</sub>
CG4(1)	0.894
CG5(1)	0.767
G1-1(3)	0.668
G1-4 (1)	0.739
G1-4 (2)	0.653
G1-6 (1)	0.992
G1-9 (1)	0.796
G1-12 (3)	0.755
G1-14 (2)	0.755
G1-15 (1)	0.905
G1-17 (1)	0.672
G1-27 (1)	0.682
G2-1 (1)	0.983
G2-3 (1)	0.769
G2-3 (4)	0.808
G2-10 (1)	0.091
G2-10 (3)	0.129
G2-15 (1)	0.115
G2-16 (1)	0.935
G2-16 (3)	1.061

Control : *Saccharomyces cerevisiae* OD<sub>660</sub> = 0.875

เชื้อ (อุณหภูมิ 40°C)	OD <sub>660</sub>
G3-3 (1)	0.335
G3-9 (1)	0.806
G3-10 (1)	0.979
G3-13 (2)	0.114
G3-13 (5)	0.645
G4-5 (2)	0.877
G5-7 (1)	0.001
G5-7 (2)	0.587
G6-2 (1)	0.842
G6-2 (2)	0.692
G6-2 (3)	0.363
G6-2 (5)	0.681
G6-3 (2)	0.011
G6-5(1)	0.005
G6-6 (2)	0.553
G6-11(1)	0.886
G6-12(1)	1.165
G6-13 (1)	0.784
G8-3 (1)	0.897
G8-5 (1)	0.935
G8-5 (2)	0.514
G8-8(1)	0.740

Control : *Saccharomyces cerevisiae* OD<sub>660</sub> = 0.667

พบว่าการเจริญในสภาวะความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (YPD medium กลูโคส 24%) เปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* โดยทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 40°C, 200 rpm นาน 24 ชั่วโมง มี Osmotolerant Yeast ที่เจริญได้ดีกว่า *S. cerevisiae* รวมทั้งหมด 18 เชื้อ

โดยแบ่งเป็นเจริญได้ดีกว่า *S. cerevisiae* ( $OD_{660} = 0.875$ ) ทั้งหมด 6 เชื้อ ดังนี้

1.	CG 4(1)	$OD_{660}$	0.894
2.	G1-6(1)	"	0.922
3.	G1-15(1)	"	0.905
4.	G2-1(1)	"	0.983
5.	G2-16(1)	"	0.935
6.	G2-16(3)	"	1.061

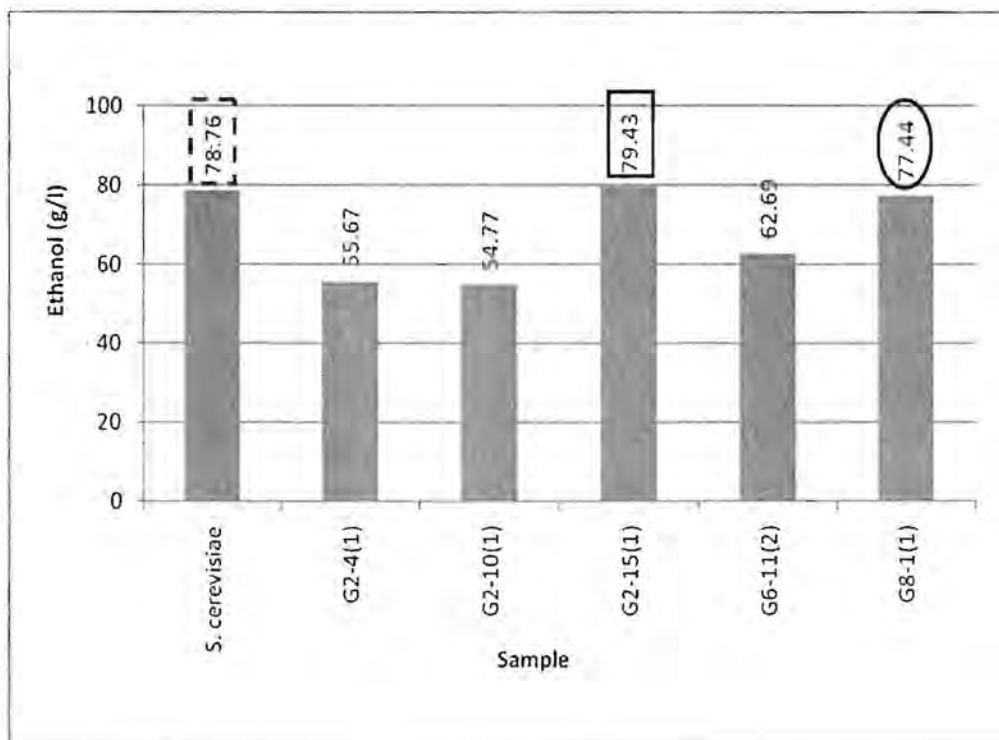
และมีเชื้อที่เจริญได้ดีกว่า *Saccharomyces cerevisiae* ( $OD_{660} = 0.667$ ) ทั้งหมด 12 เชื้อ ดังนี้

1.	G3-9(1)	"	0.806
2.	G3-10(1)	"	0.979
3.	G4-5(2)	"	0.877
4.	G6-2(1)	"	0.842
5.	G6-2(2)	"	0.692
6.	G6-2(5)	"	0.681
7.	G6-11(1)	"	0.886
8.	G6-12(1)	"	1.165
9.	G6-13(1)	"	0.784
10.	G8-3(1)	"	0.897
11.	G8-5(1)	"	0.935
12.	G8-8(1)	"	0.740

### 3.3.3 ผลการหมักเอทานอลจากยีสต์ที่แยกได้

จากนั้นนำเชื้อ Osmotolerant Yeast ทั้งหมดที่มีการเจริญได้คือว่า *S. cerevisiae* โดยพิจารณาจากเชื้อที่มีค่า OD<sub>600</sub> มากกว่า *S. cerevisiae* มาจัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนี แล้วจึงเลือกตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาทดสอบการหมักเอทานอล (24% (w/v) glucose) เปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* โดยทดสอบการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C และ 40°C ตามการเจริญของเชื้อที่แยกได้

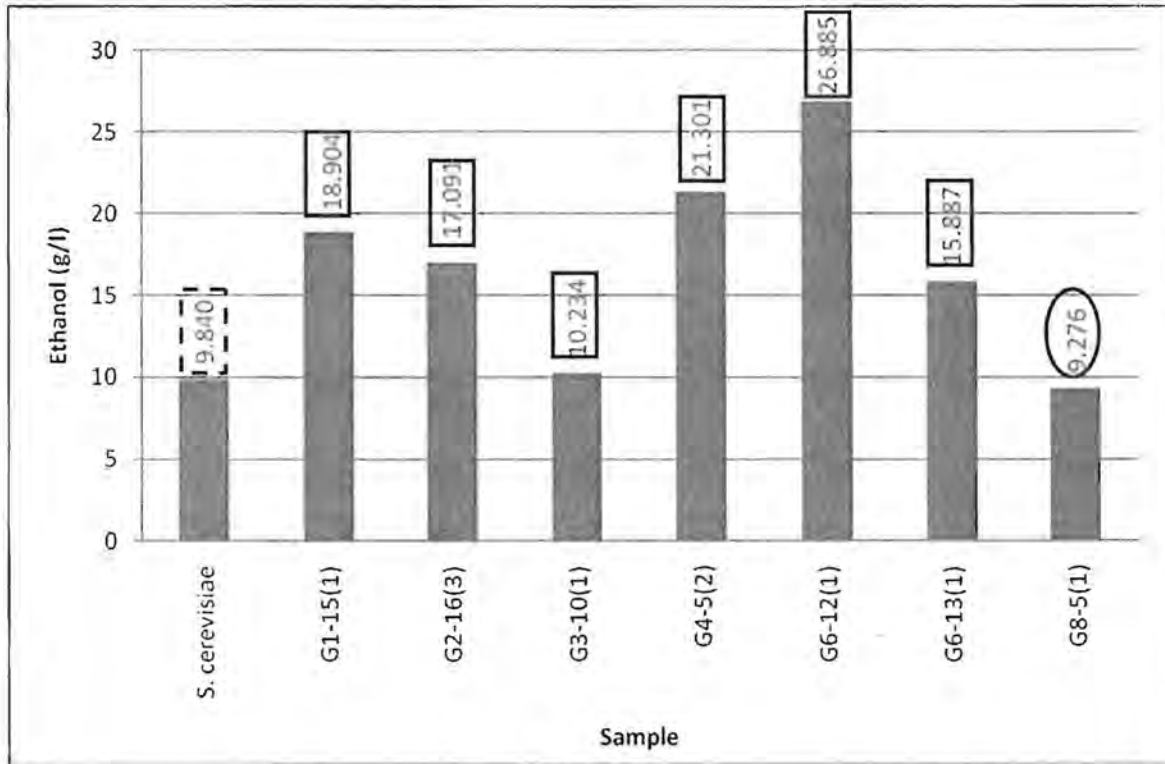
ผลการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C



จากผลพบว่าเชื้อที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชั่วโมงได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (78.76 g/l) มี 1 เชื้อ คือ G2-15(1) EtOH 79.43 g/l และมี 1 เชื้อที่หมักได้ใกล้เคียงกับ *S. cerevisiae* และมี 1 เชื้อที่หมักได้ใกล้เคียง *S. cerevisiae* คือ G8-1(1) EtOH 77.44 g/l

- หมายเหตุ :
- ┌─── EtOH ที่ได้จาก *S. cerevisiae*
  - EtOH ที่ได้สูงกว่า *S. cerevisiae*
  - EtOH ที่ได้ใกล้เคียง *S. cerevisiae*

ผลการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C



จากผลพบว่าเชื้อที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C นาน 48 ชั่วโมงได้สูงกว่า *S. cerevisiae* (9.840 g/l) มี

ทั้งหมด 6 เชื้อ ดังนี้

1.	G1-15(1)	EtOH	18.904 g/l
2.	G2-16(3)	“	17.091 g/l
3.	G3-10(1)	“	10.234 g/l
4.	G4-5(2)	“	21.301 g/l
5.	G6-12 (1)	“	26.885 g/l
6.	G6-13 (1)	“	15.887 g/l

และมีเชื้อที่สามารถหมักเอทานอลใกล้เคียงกับ *S. cerevisiae* 1 เชื้อ คือ G8-5 (1) EtOH 9.276 g/l

จากนั้นนำเชื้อ Osmotolerant yeast ที่หมักเอทานอลได้สูงกว่าและใกล้เคียงกับ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 40°C จำนวน 7 เชื้อ มาทดสอบการเจริญในสภาวะความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาล กลูโคสที่ 30, 32, 34, 36, 38 และ 40%(w/v) เปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* โดยทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 40°C

### 3.4 ผลการเจริญในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 30 % (w/v)

เชื้อ	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD <sub>660</sub> ) ในแต่ละระดับการเจือจาง				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
G1-15(1)	-	-	-	-	-
G2-16(3)	0.050	2.023	2.179	2.196	2.203
3-10(1)	0.051	1.956	2.167	2.303	2.329
G4-5(2)	-	-	-	-	-
G6-12(1)	0.051	2.239	2.367	2.375	2.394
G6-13(1)	-	-	-	-	-
G8-5(1)	0.051	1.909	2.137	2.140	2.160
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

จากผลพบว่าเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 30% (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C มี 4 เชื้อ คือ G2-16(3), G3-10(1), G6-12(1) และ G8-5(1) และมีเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ 4 เชื้อ คือ *S. cerevisiae*, G1-15(1), G4-5(2) และ G6-13(1)

หมายเหตุ : - เชื้อไม่สามารถเจริญได้

### 3.5 ผลการเจริญในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 32 % (w/v)

เชื้อ	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD <sub>660</sub> ) ในแต่ละระดับการเจือจาง				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
G2-16(3)	0.052	1.044	1.995	2.063	2.076
G3-10(1)	0.050	1.689	2.125	2.224	2.224
G6-12(1)	0.051	1.973	2.300	2.307	2.309
G8-5(1)	0.050	1.532	1.907	1.902	2.003
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

จากผลพบว่าเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 32% (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C มี 4 เชื้อ คือ G2-16(3), G3-10(1), G6-12(1) และ G8-5(1) และมีเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ 1 เชื้อ คือ *S. cerevisiae*

### 3.5 ผลการเจริญในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 34 % (w/v)

เชื้อ	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD <sub>600</sub> ) ในแต่ละระดับการเจือจาง				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
G1-16(3)	0.051	1.133	1.904	1.954	2.012
G3-10(1)	0.052	1.579	2.054	2.106	2.111
G6-12(1)	0.050	1.797	2.236	2.259	2.261
G8-5(1)	0.050	1.459	1.897	1.934	1.935
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

จากผลพบว่าเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 34% (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C มี 4 เชื้อ คือ G2-16(3), G3-10(1), G6-12(1) และ G8-5(1) และมีเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ 1 เชื้อ คือ *S. cerevisiae*

### 3.6 ผลการเจริญในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 36 % (w/v)

Code	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD <sub>600</sub> ) ในแต่ละระดับการเจือจาง				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
G1-16(3)	0.050	1.351	1.675	1.860	1.861
G3-10(1)	0.051	1.494	1.833	2.027	2.037
G6-12(1)	0.051	1.864	2.123	2.194	2.196
G8-5(1)	0.051	1.300	1.584	1.766	1.791
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

จากผลพบว่าเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 36% (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C มี 4 เชื้อ คือ G2-16(3), G3-10(1), G6-12(1) และ G8-5(1) และมีเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ 1 เชื้อ คือ *S. cerevisiae*

### 3.7 ผลการเจริญในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 38 % (w/v)

Code	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD <sub>600</sub> ) ในแต่ละระดับการเจริญ				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
G1-16(3)	0.051	1.341	1.610	1.882	1.882
G3-10(1)	0.050	1.392	1.819	2.011	2.013
G6-12	0.051	1.718	2.028	2.103	2.106
G8-5(1)	0.050	1.228	1.572	1.723	1.724
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

จากผลพบว่าเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 38% (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C มี 4 เชื้อ คือ G2-16(3), G3-10(1), G6-12(1) และ G8-5(1) และมีเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ 1 เชื้อ คือ *S. cerevisiae*

### 3.8 ผลการเจริญในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 40 % (w/v)

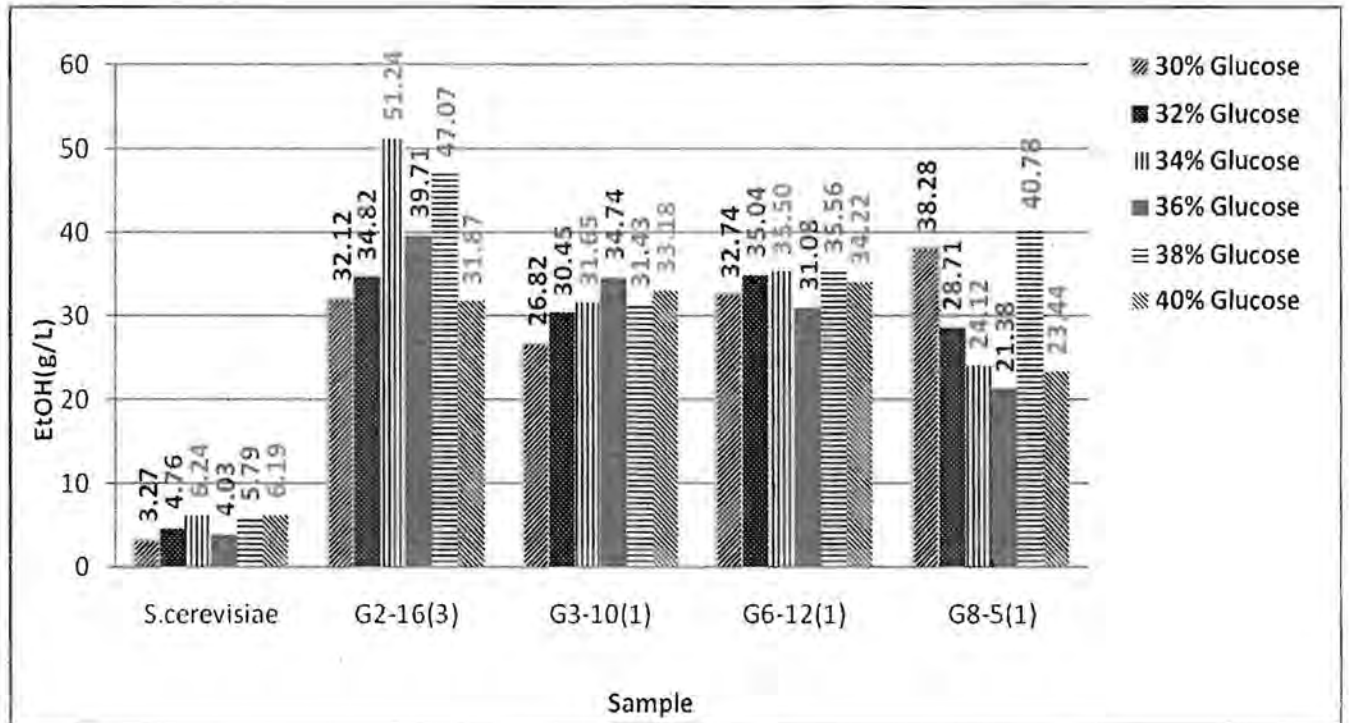
Code	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD <sub>600</sub> ) ในแต่ละระดับการเจริญ				
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 12	ชั่วโมงที่ 24	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72
G1-16(3)	0.051	1.173	1.561	1.791	1.794
G3-10(1)	0.051	1.281	1.675	1.891	1.897
G6-12	0.051	1.575	1.971	2.052	2.075
G8-5(1)	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

จากผลพบว่าเชื้อที่เจริญได้ดีในอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 38% (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C มี 4 เชื้อ คือ G2-16(3), G3-10(1), G6-12(1) และ G8-5(1) และมีเชื้อที่ไม่สามารถเจริญได้ 2 เชื้อ คือ *S. cerevisiae* และ G8-5(1)

จากนั้นนำเชื้อ Osmotolerant ที่มีการเจริญได้ดีกว่า *S. cerevisiae* ในสภาวะความเข้มข้นของน้ำตาลสูงแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 30, 32, 34, 36, 38 และ 40%(w/v) จำนวน 4 เชื้อ G2-16(3), G3-10(1), G6-12(1) และ G8-5(1) มาทดสอบการหมักเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* โดยทดสอบการหมักที่อุณหภูมิ 40 °C



## ผลการหมักเอทานอลจากยีสต์ที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 40 °C



จากผลในภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 30% (w/v) พบว่าเชื้อ Osmotolerant yeast ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมงได้ดีกว่า *S.cerevisiae* (3.27 g/l) มีทั้งหมด 4 ดังนี้

1.	G2-16(3)	EtOH	32.12 g/l
2.	G3-10(1)	EtOH	26.82 g/l
3.	G6-12(1)	EtOH	37.74 g/l
4.	G8-5(1)	EtOH	38.28 g/l

ในภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 32% (w/v) พบว่าเชื้อ Osmotolerant yeast ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมงได้ดีกว่า *S.cerevisiae* (4.76 g/l) มีทั้งหมด 4 ดังนี้

1.	G2-16(3)	EtOH	34.82 g/l
2.	G3-10(1)	EtOH	30.45 g/l
3.	G6-12(1)	EtOH	35.04 g/l
4.	G8-5(1)	EtOH	28.71 g/l

ในภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 34% (w/v) พบว่าเชื้อ Osmotolerant yeast ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมงได้ดีกว่า *S.cerevisiae* (6.24g/l) มีทั้งหมด 4 ดังนี้

1.	G2-16(3)	EtOH	51.24 g/l
2.	G3-10(1)	EtOH	31.65 g/l

3.	G6-12(1)	EtOH	35.50 g/l
4.	G8-5(1)	EtOH	24.12 g/l

ในภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 36% (w/v) พบว่าเชื้อ Osmotolerant yeast ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมงได้ดีกว่า *S.cerevisiae* (4.03 g/l) มีทั้งหมด 4 ดังนี้

1.	G2-16(3)	EtOH	39.71 g/l
2.	G3-10(1)	EtOH	34.74 g/l
3.	G6-12(1)	EtOH	31.08 g/l
4.	G8-5(1)	EtOH	21.38 g/l

ในภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 38% (w/v) พบว่าเชื้อ Osmotolerant yeast ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมงได้ดีกว่า *S.cerevisiae* (5.79 g/l) มีทั้งหมด 4 ดังนี้

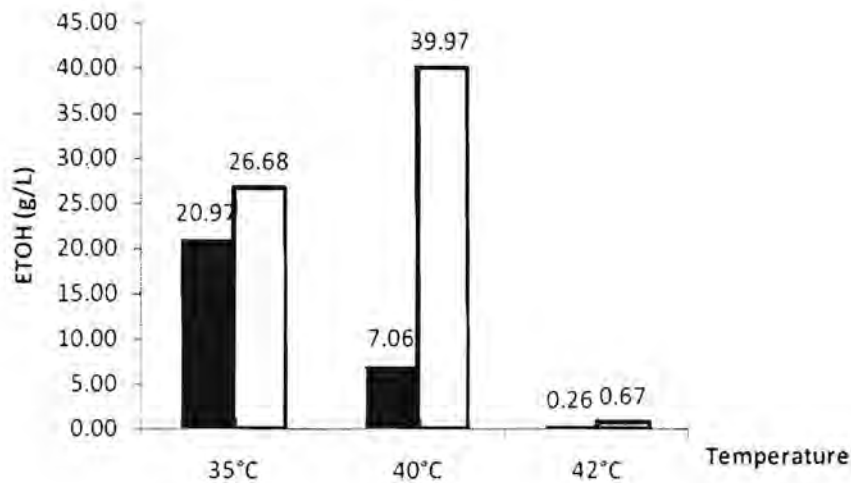
1.	G2-16(3)	EtOH	47.07 g/l
2.	G3-10(1)	EtOH	31.43 g/l
3.	G6-12(1)	EtOH	35.56 g/l
4.	G8-5(1)	EtOH	40.78 g/l

ในภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 40% (w/v) พบว่าเชื้อ Osmotolerant yeast ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมงได้ดีกว่า *S.cerevisiae* (6.19g/l) มีทั้งหมด 4 ดังนี้

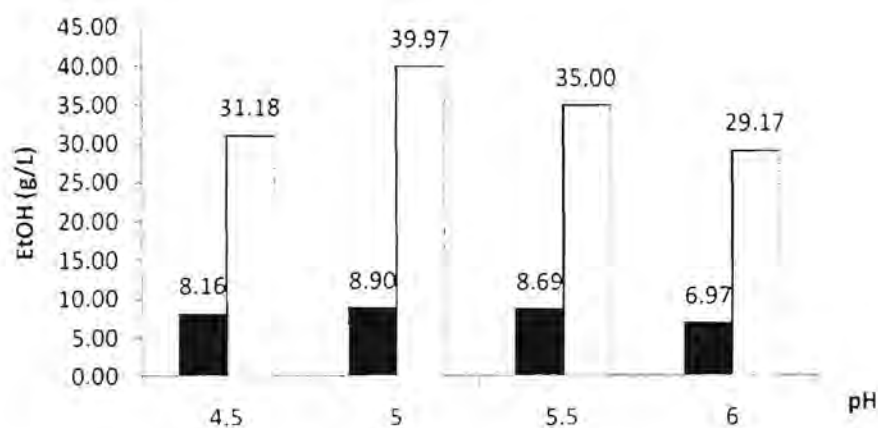
1.	G2-16(3)	EtOH	31.87 g/l
2.	G3-10(1)	EtOH	33.18 g/l
3.	G6-12(1)	EtOH	34.22 g/l
4.	G8-5(1)	EtOH	23.44 g/l

### 3. ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G 5-7(2)

เลี้ยง *S. cerevisiae* G 5-7(2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ 40 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที จนถึงระยะ Mid log phase ถ่ายเชื้อจำนวน 10% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม 42.5 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดพลาสติกด้วยจุกสำลี ปิดทับจุกสำลีด้วยแผ่นฟิล์ม วางไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 2 นาที เก็บส่วนน้ำไว้ไปวิเคราะห์เอทานอล โดยวิธี Gas chromatography แปรผันค่า อุณหภูมิและความเป็นกรด-เบส



ภาพที่ 1: กราฟแท่งแสดง ปริมาณเอทานอลที่ได้ภายหลังจากหมัก เชื้อ *S. cerevisiae* และ *S. cerevisiae* G 5-7(2) ที่ อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 (■)หมายถึง *S. cerevisiae* (□)หมายถึง *S. cerevisiae* G 5-7(2))



ภาพที่ 2: กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเอทานอลที่ได้ภายหลังจากหมักเชื้อ *S. cerevisiae* และ *S. cerevisiae* G 5-7(2) ที่ pH ต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (■)หมายถึง *S. cerevisiae* (□)หมายถึง *S. cerevisiae* G 5-7(2)

4. ผลการทดสอบการเจริญของ *Kluyveromyces marxianus* ที่อุณหภูมิ 48 °C

Isolation No.	การเจริญ (72 ชม.)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR5596	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (G2-3(1))	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (G2-16(1))	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (G2-16(3))	+

- ไม่เจริญ

+ เจริญได้

## 6. ผลการจำแนกชนิดยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลที่แยกได้

1. จำแนกชนิดยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่ 30°C และ 40°C ซึ่งแยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชบุรี โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราชและโรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์ รวม 15 ไอโซเลต ทั้ง 15 ไอโซเลต เป็น known species (ดังตารางที่ 1-4)

พบว่าไอโซเลต G5-7(2) ซึ่งแยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช ที่ 40°C เป็นชนิด *Saccharomyces cerevisiae* มีประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงที่สุด คือ จาก glucose 150 g/l เป็นเอทานอล 72.83 g/l คิดเป็น 0.49% Theoretical yield หลังการหมัก 72 ชม. (*S. cerevisiae* TISTR 5596 ให้เอทานอล 30.61 g/l)

2. จำแนกชนิดยีสต์ทุกไอโซเลตที่สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่ 30°C และ 40°C ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช ซึ่งเป็นแหล่งที่แยก *S. cerevisiae* G 5-7(2) ได้ จำนวน 16 ไอโซเลต พบว่ามี 3 ไอโซเลต ที่เป็น new species (ตาราง 5-6)

## โรงงานน้ำตาลราชบุรี

Control 30°C : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 : Ethanol = 69.17 g/l

Control 40°C : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 : Ethanol = 32.84 g/l

Code	Query sequence length	BLASTn Results	Accession No.	Identity	No. of nucleotide substitutions	No. of gap	Remark
G1-8 30°C 75.99 g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	99	0	1	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	99	0	1	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	99	0	1	Known species
G1-10(2) 30°C 75.47 g/l	575	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51221	FN393983	100	0	0	Known species
	571	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51223	FN393982	100	0	0	Known species
	587	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51213	FN393981	100	0	0	Known species
G1-13(1) 30°C 99.35 g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	100	0	0	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	100	0	0	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	100	0	0	Known species
G1-18(2) 30°C 73.29 g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	99	0	3	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	99	0	3	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	99	0	3	Known species
G1-4(1) 40°C 44.96 g/l	572	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain RY8-1	AB550116	99	0	3	Known species
	577	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LY2-3	AB550111	99	0	3	Known species
	586	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain isolate CLOA10	GU299473	99	0	3	Known species
G1-12(3) 40°C 45.54 g/l	573	<i>Torulaspota globosa</i> strain SSK9	AB499988	99	1	0	Known species
	573	<i>Torulaspota globosa</i> strain SSK8	AB499987	99	1	0	Known species
	573	<i>Torulaspota globosa</i> strain LY10	AB499015	99	1	0	Known species

ตารางที่ 1 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชบุรี

## โรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม

Control **30°C** : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 : Ethanol = 34.44 g/l

Control **40°C** : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 : Ethanol = 73.26 g/l

Code	Query sequence length	BLASTn Results	Accession No.	Identity	No. of nucleotide substitutions	No. of gap	Remark
G2-3(1) 40°C 65.88 g/l	569	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain IMAU6Y043(BL2-1)	GQ121629	100	0	0	Known species
	581	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain TY17	FJ972218	100	0	0	Known species
	588	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate FSMP-Y40	FJ627963	100	0	0	Known species
G2-10(3) 40°C 59.89 g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	100	0	0	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	100	0	0	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	100	0	0	Known species
G2-16(1) 40°C 62.27 g/l	569	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain IMAU6Y043(BL2-1)	GQ121629	100	0	0	Known species
	581	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain TY17	FJ972218	100	0	0	Known species
	588	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate FSMP-Y40	FJ627963	100	0	0	Known species
G2-16(3) 40°C 58.76g/l	269	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain IMAU6Y043(BL2-1)	GQ121629	100	0	0	Known species
	581	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain TY17	FJ972218	100	0	0	Known species
	588	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate FSMP-Y40	FJ627963	100	0	0	Known species
G2-4(1) 30°C 81.69 g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	100	0	0	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	100	0	0	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	100	0	0	Known species
G2-4(2) 30°C 76.16 g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	100	0	0	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	100	0	0	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	100	0	0	Known species
G2-5(2) 30°C 76.54 g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	100	0	0	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	100	0	0	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	100	0	0	Known species

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม

## โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช

Control **40°C** : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 ; Ethanol = 30.61 g/l

Code	Query seq-length	BLASTn Results	Accession No.	Identity	No. of nucleotide substitutions	No. of gap	Remark
G5-7(2)	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	100	0	0	Known species
40°C	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	100	0	0	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	100	0	0	Known species

ตารางที่ 3 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช



## โรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์

Control **30°C** : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 : Ethanol = 53.37 g/l

Control **40°C** : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 : Ethanol = 28.27 g/l

Code	Query seq-length	BLASTn Results	Accession No.	Identity	No. of nucleotide substitutions	No. of gap	Remark
G8-2 30°C 62.59 g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	100	0	0	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	100	0	0	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	100	0	0	Known species
G8-3(1) 40°C 47.92 g/l	581	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain TY17	FJ972218	100	0	0	Known species
	588	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate FSMP-Y40	FJ627963	100	0	0	Known species
	588	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate FSMP-Y39	FJ627962	100	0	0	Known species
G8-5(1) 40°C 42.22 g/l	569	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain IMAU6Y043(BL2-1)	GQ121629	100	0	0	Known species
	581	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain TY17	FJ972218	100	0	0	Known species
	588	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate FSMP-Y40	FJ627963	100	0	0	Known species
G8-5(2) 40°C 57.64g/l	614	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51215	FN393980	100	0	0	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51236	FN393979	100	0	0	Known species
	598	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain MUCL 51208	FN393978	100	0	0	Known species

ตารางที่ 4 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลบุรีรัมย์

โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช

Control 40°C : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 : Ethanol = 30.61 g/l

Code	Query seq-length	BLASTn Results	Accession No.	Identity	No. of nucleotide substitutions	No. of gap	Remark
5-6(1) 40°C	564	<i>Pichia kudriavzevii</i>	AB618028.1	100	0	0	Known species
	571	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LM089	AB617989.1	100	0	0	Known species
	571	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LM069	AB617963.1	100	0	0	Known species
G5-5(5) 40°C	3227	<i>Ambrosiozyma monospora</i> strain NRRL Y-1484	EU011590.1	86	56	24	New strain
	566	<i>Ambrosiozyma monospora</i>	U40106.1	86	56	24	New strain
	577	<i>Ambrosiozyma monospora</i> strain IY 05-6-20-1-1-1	DQ655695.1	86	53	28	New strain
G5-9(1) 40°C	564	<i>Pichia kudriavzevii</i>	AB618028.1	100	0	0	Known species
	571	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LM089	AB617989.1	100	0	0	Known species
	571	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LM069	AB617963.1	100	0	0	Known species
G5-9(3) 40°C	3227	<i>Ambrosiozyma monospora</i> strain NRRL Y-1484	EU011590.1	86	55	20	New strain
	566	<i>Ambrosiozyma monospora</i>	U40106.1	86	55	20	New strain
	572	<i>Pichia cf. trehaloabstinens</i> UWO(PS)99-304.4	AF530611.1	86	52	24	New strain
G5-9(4) 40°C	3227	<i>Ambrosiozyma monospora</i> strain NRRL Y-1484	EU011590.1	86	56	24	New strain
	566	<i>Ambrosiozyma monospora</i>	U40106.1	86	56	24	New strain
	577	<i>Ambrosiozyma monospora</i> strain IY 05-6-20-1-1-1	DQ655695.1	86	53	28	New strain

ตารางที่ 5 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์หมักเอทานอลที่ 40°C ซึ่งแยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช

โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช

Control 30°C : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5596 : Ethanol = 71.31 g/l

Code	Query seq-length	BLASTn Results	Accession No.	Identity	No. of nucleotide substitutions	No. of gap	Remark
G5-1(3) 30°C	622	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain 23w66	HQ149319.1	100	0	0	Known species
	609	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain 23w61	HQ149315.1	100	0	0	Known species
	600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain 23w65	HQ149309.1	100	0	0	Known species
G5-4(1) 30°C	616	Uncultured fungus clone 28-239FM	HQ143112.1	100	0	0	Known species
	611	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	FN393988.1	100	0	0	Known species
	1195	<i>Pichia anomala</i> isolate M10	FJ865436.1	100	0	0	Known species
G5-4(2) 30°C	626	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> strain PH-M16	GU373754.1	100	0	0	Known species
	595	<i>Pichia guilliermondii</i> strain TY09	FJ972213.1	100	0	0	Known species
	613	<i>Pichia caribbica</i>	AB260134.1	100	0	0	Known species
G5-5(1) 30°C	3199	<i>Pichia deserticola</i> strain NRRL Y-12918	EF550226.1	99	1	0	Known species
	3199	<i>Candida ethanolica</i> strain NRRL Y-12615	EF550225.1	99	1	0	Known species
	598	<i>Pichia deserticola</i> H5S11K28	FM180545.1	99	2	0	Known species
G5-5(2) 30°C	3199	<i>Pichia deserticola</i> strain NRRL Y-12918	EF550226.1	99	1	1	Known species
	3199	<i>Candida ethanolica</i> strain NRRL Y-12615	EF550225.1	99	1	1	Known species
	559	Fungal sp. DQY-2	DQ472020.1	99	1	1	Known species
G5-5(3) 30°C	567	<i>Pichia galeiformis</i> strain LM073	AB617973.1	100	0	0	Known species
	566	<i>Pichia galeiformis</i> strain LM044	AB617946.1	100	0	0	Known species
	617	<i>Pichia manshurica</i> isolate H4S7K13	FM180542.1	100	0	0	Known species
G5-6(1) 30°C	564	<i>Pichia kudriavzevii</i>	AB618028.1	100	0	0	Known species
	571	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LM089	AB617989.1	100	0	0	Known species
	571	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LM069	AB617963.1	100	0	0	Known species
G5-6(2) 30°C	571	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LM089	AB617989.1	100	0	0	Known species
	571	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain LM063	AB617963.1	100	0	0	Known species
	612	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 01w29	HQ149323.1	100	0	0	Known species

ตารางที่ 6 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์หมักเอทานอลที่ 30°C ซึ่งแยกได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อที่แยกได้จากอาหารกลูโคส จากดินป่าพรุหนองจำรุง อ.แกลง จ.ระยอง

Code	Query sequence length	BLASTn Results	Accession No.	Identity	No. of nucleotide substitutions	No. of gap	Remark
KG1-10(1) 30 °C 2.27 g/l	638	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> strain R-4272	FJ416596.1	100	0	0	Known species
	608	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> isolate CLA2	GU299455.1	100	0	0	Known species
	613	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> strain HB 1175	AJ601388.1	99	0	1	Known species
KG2-4(1) 30 °C 4.48 g/l	559	<i>Candida pseudolambica</i> strain NT20	AB557858.1	99	0	3	Known species
	568	<i>Candida pseudolambica</i> strain HOct07AX-Y40	GQ324696.1	99	0	3	Known species
	559	<i>Candida pseudolambica</i> strain RV149	AB437385.1	99	0	3	Known species
KG2-7(1) 30 °C 3.57 g/l	559	<i>Candida pseudolambica</i> strain SR 1	AB500183.1	99	1	0	Known species
	559	<i>Candida pseudolambica</i> strain MD 2	AB500881.1	99	2	0	sister species
	582	<i>Issatchenkia occidentalis</i> strain LN-8	EF643590.1	99	2	0	sister species
KG2-8(1) 30 °C 20.94 g/l	571	<i>Candida sojae</i> strain LM 093	AB617993.1	99	4	3	May be new
	572	<i>Candida sojae</i> 26S ribosomal RNA gene	U71070.1	99	6	2	May be new
	1091	<i>Candida sojae</i> strain IMUFRJ 51947	FN424104.1	99	5	1	May be new
KG5-7(1) 30 °C 3.37 g/l	589	<i>Candida palmiophila</i> strain ATCC 20507	HM755979.1	100	0	0	Known species
	567	<i>Candida palmiophila</i> strain MK883	AB361594.1	100	0	0	Known species
	567	<i>Candida palmiophila</i> strain SM 49	AB281308.1	100	0	0	Known species
KG5-9(1) 30 °C 28.33 g/l	573	<i>Torulaspota globosa</i> strain SSK9	AB499988.1	99	1	0	Known species
	573	<i>Torulaspota globosa</i> strain SSK8	AB499987.1	99	1	0	Known species
	573	<i>Torulaspota globosa</i> strain LY10	AB499015.1	99	1	0	Known species

Control 30 °C : *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 : Ethanol = 57.10 g/l

Code	Query sequence length	BLASTn Results	Accession No.	Identity	No. of nucleotide substitutions	No. of gap	Remark
KG5-15(1) 30 °C 31.00 g/l	570	<i>Candida tropicalis</i> strain SN2-2	AB557758.1	98	1	10	Known species
	570	<i>Candida tropicalis</i> strain KU-Xs14	AB557787.1	98	2	10	Sister species
	570	<i>Candida tropicalis</i> strain LM096	AB617996.1	98	2	10	Sister species
KG5-18(1) 30 °C 13.20 g/l	511	<i>Candida orthopsilosis</i> strain ATCC 20504	HM755978.1	100	0	0	Known species
	592	<i>Candida orthopsilosis</i> strain ATCC 20503	HM755977.1	100	0	0	Known species
	7240	<i>Candida orthopsilosis</i> strain 90-125	FN812686.1	100	0	0	Known species
KG5-19(1) 30 °C 20.16 g/l	581	<i>Candida uthaithanina</i> SK 44	AB588753.1	100	0	0	Known species
	589	<i>Candida uthaithanina</i> DD2-22-1	AB588752.1	99	1	0	Known species
	544	<i>Candida sp.</i> ST-449	DQ404525.2	99	1	0	Known species
KG7-2(1) 30 °C 2.77 g/l	570	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> var. <i>vanriijiae</i> strain CPB2	AB500888.1	100	0	0	Known species
	570	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> var. <i>vanriijiae</i> strain MD1	AB499991.1	100	0	0	Known species
	563	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> var. <i>vanriijiae</i> strain LYSM10	AB498995.1	100	0	0	Known species
KC4-6(1) 30 °C 13.8 g/l	562	<i>Debaryomyces hansenii</i> EVN 1223	FR852770.1	100	0	0	Known species
	591	<i>Debaryomyces sp.</i> CLIB 1277	FR693385.1	100	0	0	Known species
	601	<i>Debaryomyces sp.</i> CBS 11666	FN598875.1	100	0	0	Known species

ตารางที่ 7 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์หมักเอทานอลที่ 30°C ซึ่งแยกได้จากป่าพรุหนองจำรุง

## 7. สรุปผลการทดลอง

สามารถแยกยีสต์ *S. cerevisiae* ได้จากโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมโคราช หมักเอทานอลได้ 0.49 กรัม/กรัม กลูโคส ที่ 40°C 72 ชั่วโมง (*S. cerevisiae* TISTR 5596 ให้เอทานอล 0.2 กรัม/กรัม กลูโคส) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลคือ 40°C, pH 5.0

แยกยีสต์ *K. marxianus* G 2-16(3) ได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมสามารถหมัก 38% (w/v) กลูโคสที่ 40°C เป็นเอทานอลได้ 47.07 กรัม/ลิตร 48 ชั่วโมง (*S. cerevisiae* เท่ากับ 5.79 กรัม/ลิตร)

แยกยีสต์หมักเอทานอลที่มีความน่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ ได้ 3 ไอโซเลต

## 8. งานที่จะทำต่อไป

- 8.1 ศึกษาประสิทธิภาพผลการหมักเอทานอลจากวัสดุทิ้งทางการเกษตร โดย *S. cerevisiae* GS-7(2) ทั้งโดยวิธี Separate hydrolysis and fermentation (SHF) และ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)
- 8.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูง โดยยีสต์ที่แยกได้
- 8.3 จำแนกชนิดของยีสต์หมักเอทานอลที่แยกได้
- 8.4 ทดสอบความสามารถใช้ cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของยีสต์หมักเอทานอล ซึ่งแยกได้บนอาหารเซลลูโลส
- 8.5 ปรับปรุง *Kluyveromyces marxianus* ซึ่งมีประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูง ให้สามารถทนต่อเอทานอลเพิ่มมากขึ้น

## 9. เอกสารอ้างอิง

- Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M.J. 2006. Production of ethanol and mycelia biomass from rice straw hemicelluloses hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochem.* 41: 653-658.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331-381.
- Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G-A. 1999. Simultaneous fermentation of glucose and xylose by pure and mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* immobilized in a two-chambered bioreactor. *Enz. Microbial. Technol.* 21: 265-272.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M.J. 2005. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. *Enz. Microbial. Technol.* 36: 294-300.
- Sanchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A.J. and Camacho, F. 2002 The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77: 641-648.
- Skoog, K., Hahn-Hägerdal, B., Degn, H., Jacobsen, J.P., Jacobsen, H.S. 1992. Ethanol reassimilation and ethanol tolerance in *Pichia stipitis* CBS6054 as studied by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2552-2558.



## การเผยแพร่ผลงานวิจัย

1. Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N., Srinorakutara, T., Kitpreechavanich, V., Tolieng V. 2011. Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbial*. DOI 10.1007/s 13213-010-0155-8.
2. Ratsamee, S., Akaracharanya, A., Leepipatpiboon, N., Srinorakutara, T., Kitpreechavanich, V., Tolieng V. 2011. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of purple guinea grass pretreated with lime. *J. Biomass. Bioeng.* **submitted**
3. Jutakanoke, R., Srinorakutara, T., Leepipatpiboon, N., Kitpreechavanich, V., Tolieng V., Akaracharanya, A. 2011. Sugar cane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biomass. Bioeng.* **submitted**

## Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

Ancharida Akaracharanya · Jutarat Kesornsit ·  
Natchanun Leepipatpiboon · Teerapatr Srinorakutara ·  
Vichien Kitpreechavanich · Vasana Tolieng

Received: 14 June 2010 / Accepted: 22 October 2010  
© Springer-Verlag and the University of Milan 2010

**Abstract** Cassava starch production waste (cassava pulp) has been proposed as a high potential ethanolic fermentation substrate due to its high residual starch level and the small particle size of the lignocellulosic fibers. Saccharification of the residual starch from a 3% (w/v) dry weight basis (DS) of cassava pulp by  $\alpha$ -amylase (100°C, 10 min) and glucoamylase (60°C, 2 h) resulted in a glucose yield of 22.6 g/l [67.8% (w/w) DS of cassava pulp] and in lignocellulosic fibers at 0.5 g/g DS cassava pulp. Pretreatment of the lignocellulosic fiber with dilute sulfuric acid and calcium hydroxide at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 min increased and decreased, respectively, its susceptibility to cellulase hydrolysis. Under the optimal conditions found, pretreatment of 6% (w/v) DS lignocellu-

losic fiber by 2% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min, followed by saccharification by cellulase (40°C, 9 h), yielded a glucose level of 26.6 g/l [79.8% (w/w) DS of the cassava pulp]. The starch and lignocellulosic fiber hydrolysates obtained from 30 g cassava pulp and 60 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretreated lignocellulosic fiber were fermented by *Saccharomyces cerevisiae*, without the need for (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> supplementation, to yield ethanol levels of 9.9 and 11.9 g/l, respectively, after 48 h.

**Keywords** Cassava pulp · Ethanol · Starch · Lignocellulose

### Introduction

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the major commercial crops in Thailand, with an annual production of approximately 23 million tons of cassava root. One-half of this cassava root crop is exported as cassava chips and pellets that are used principally for ethanol fuel production. The remainder is supplied as a raw material for cassava starch production, which alone generates approximately 1.7 million tons of solid cassava pulp waste after the starch extraction (Office of the National Economic and Social Development Board 2007). However, the starch extraction from cassava roots in Thailand is relatively inefficient, resulting in waste cassava pulp typically still being comprised of some 60–70% (w/w) dry weight basis (DS) starch and 15–30% (w/w) DS lignocellulosic fiber (Balagopalan et al. 1994; Sriroth et al. 2000). Due to the high starch and moisture content [75–80% (w/w) DS], the cassava pulp spoils rapidly causing environmental problems, including a strong and offensive putrefaction odor and local water contamination. If the starch in cassava pulp could be hydrolyzed economically to fermentable sugars, and prin-

A. Akaracharanya (✉) · J. Kesornsit  
Department of Microbiology, Faculty of Science,  
Chulalongkorn University,  
Bangkok 10330, Thailand  
e-mail: sanchari@chula.ac.th

N. Leepipatpiboon  
Department of Chemistry, Faculty of Science,  
Chulalongkorn University,  
Bangkok 10330, Thailand

T. Srinorakutara  
Department of Energy Technology,  
Thailand Institute of Scientific and Technological Research,  
Klongluang, Pathumthani 12120, Thailand

V. Kitpreechavanich  
Department of Microbiology, Faculty of Science,  
Kasetsart University,  
Bangkok 10900, Thailand

V. Tolieng  
The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering,  
Chulalongkorn University,  
Bangkok 10330, Thailand

cipally glucose, it would not only help solve the environmental problem of cassava pulp disposal but also provide added value for cassava crops, which are typically grown by small-scale farmers in poor or developing regions. Moreover, the lignocellulosic fiber obtained after the starch is removed from the cassava pulp is potentially an ideal substrate for ethanol production. Since it has a 20–40 mesh particle size, cutting and milling processes are not needed, saving on the requirement for these energy- and cost-consuming steps that serve as a major constraint for lignocellulosic ethanol production from other substrates. In contrast to the above-suggested potential use, the actual current use of cassava pulp, if not wasted, is either as a low-grade animal feed or for fertilizer. The improved utilization of cassava pulp is, therefore, an important and necessary step towards efficient cassava root usage.

In this work, both the starch and the lignocellulosic fibers in waste cassava pulp were hydrolyzed enzymatically to glucose and then fermented to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. The susceptibility of the lignocellulosic fiber to cellulase after pretreatment with either dilute sulfuric acid or calcium hydroxide was compared. Potential inhibitors of the ethanolic fermentation by *S. cerevisiae* that were liberated from the pretreatment step were analyzed. From the results presented here, cassava pulp is proposed as a potentially promising, sustainably renewable, plentiful and low cost substrate for ethanol production.

## Materials and methods

### Cassava pulp

Cassava pulp was collected from Sanguan Wongse Industries, Nakhonratchasima Province, Thailand, in a frozen form and was thawed to room temperature just prior to use. The major components, on a dry weight basis (DS) were 67.8% (w/w) starch and 11.2% (w/w) lignocellulosic fiber but, as obtained, the moisture content was 80% (w/w) wet weight.

### Microorganism

*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 was obtained from the Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). A single colony of *S. cerevisiae* was grown in yeast peptone dextrose medium (YPD; yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l, pH 4.5) at 30°C with shaking (150 rpm) for 48 h, and then transferred [1% (v/v) inoculum] to cassava pulp-starch hydrolysate supplemented with 0.2% (w/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and incubated at the same conditions as above. This was grown to late log phase and was then used as the *S. cerevisiae* inoculum.

### Saccharification of starch in cassava pulp

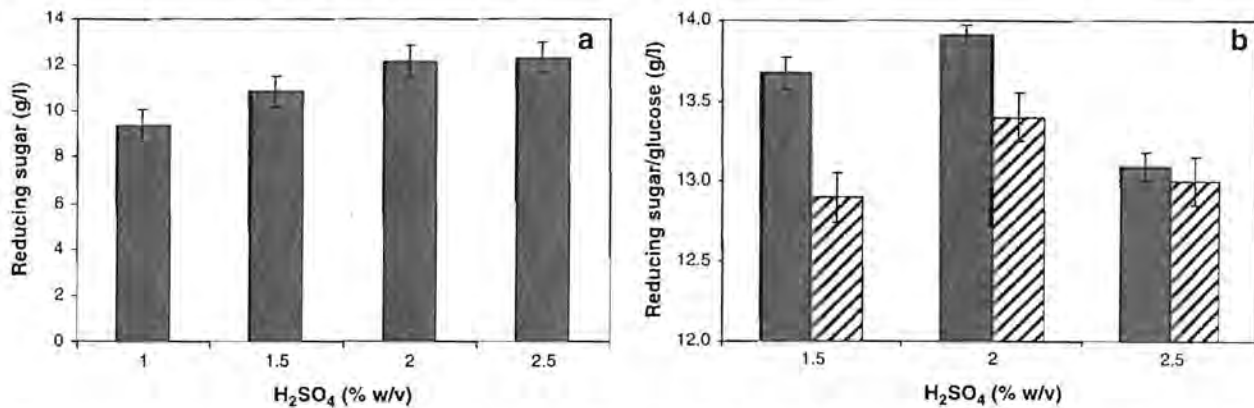
Cassava pulp was suspended in water at 3% (w/v) DS and saccharified by  $\alpha$ -amylase (8.4 units/ $\mu$ l; Genecor International, Rochester, NY), as per the supplier's instructions, using 58.8 U/g DS at 100°C for 10 min. Under these conditions, the cassava pulp slurry did not turn blue after the addition of iodine solution, indicating the hydrolysis of most to all of the starch. The cassava pulp slurry was then further saccharified by glucoamylase (0.4 units/ $\mu$ l; Genecor), as per the supplier's instructions, using 2 U/g DS at 60°C for 2 h. The hydrolysate so obtained was separated from the residual lignocellulosic fiber by filtration through a stainless filter ( $0.88 \times 10^3 \mu\text{m}$  pore size) and centrifuged (11,500 g for 20 min) at 4°C. The supernatant, referred to as the starch hydrolysate, was harvested and analyzed for reducing sugar and glucose content (see Analytical procedures), whilst the pellet, the lignocellulosic fiber, was treated as described in the next section.

### Saccharification of lignocellulosic fiber in cassava pulp

The lignocellulosic fiber, separated from the starch hydrolysate, was pretreated by suspending at 3% (w/v) DS in the indicated concentration of either sulfuric acid [0–2.5% (w/v)] or calcium hydroxide [0–1.5% (w/v)] solution and autoclaved at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 min. The pretreated lignocellulosic fiber suspension was then adjusted to pH 6 and saccharified by cellulase GC 220 (6.2 units/ $\mu$ l; Genecor), as per the supplier's instructions, using 62 U/g DS at 40°C with shaking (150 rpm) for 72 h. After filtration and centrifugation, as detailed above, to separate the hydrolysate from the remaining lignocellulosic fibers, the hydrolysate was analyzed for reducing sugar and glucose content. An optimal condition for this pretreatment step was determined by individually varying the concentration of sulfuric acid or calcium hydroxide solution, the percentage of lignocellulosic fiber loaded [3, 6 and 8% (w/v)] and the autoclaving period (15, 30 and 45 min). The optimal saccharification period of the pretreated lignocellulosic fiber with cellulase GC 220 at 62 U/g DS was also determined (0–72 h).

### Detoxification of lignocellulosic fiber-acid hydrolysate

The lignocellulosic fiber-acid hydrolysate was detoxified by the method described by Gupta et al. (2009). Calcium hydroxide was added to the acid hydrolysate at room temperature with constant stirring until the pH reached 10 and then held with stirring for 30 min. Then, the detoxified hydrolysate was neutralized with concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and centrifuged at 4°C, 10,000 g for 15 min to remove the precipitate formed during the neutralization stage.



**Fig. 1** Effect of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration in the acid pretreatment on **a** the subsequent level of the reducing sugar liberated in pretreatment hydrolysate, and **b** the degree of susceptibility of the pretreated lignocellulosic fiber to cellulase degradation (hydrolysis). Lignocellulosic fibers [3% (w/v) DS] were pretreated by various concentrations of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 min, then saccharified by cellulase GC 220 (62 U/g) at 40°C, pH 6 for 72 h. *Solid bars* Reducing sugar level, *hatched bars* glucose level. The data are displayed as the mean±1 SD, and are derived from triplicate experiments

#### Ethanol fermentation

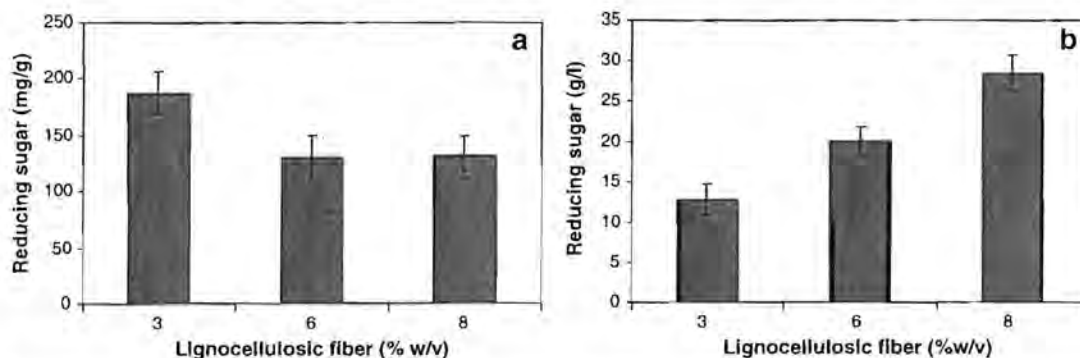
A late log phase *S. cerevisiae* culture ( $1.96 \times 10^7$  cell/ml) was inoculated at 10% (v/v) into the starch or lignocellulosic fiber hydrolysate and incubated at 30°C, pH 4.5 without shaking for 72 h. Different levels of ammonium sulfate [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0–0.6% (w/v)] supplementation, and fermentation periods (0–72 h), were evaluated for optimization.

#### Analytical procedures

The cellulose, hemicellulose and lignin contents were determined by the method described by the Technical Association of Pulp and Paper Industry method (TAPPI 1988). Reducing sugars were quantified using the Somogyi-Nelson method (Somogyi 1952). Sugars and pretreatment byproducts (furfural, hydroxymethylfurfural,

4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin) were analyzed by HPLC (Agilent 1100 Series equipped with quaternary pump, on-line degasser, autoinjector, column thermostat, refractive index detector and a ChemStation softwares, Agilent Technologies, Wilmington, DE). Sugars were identified and quantified by Aminex column HPX-87P (300×7.8 mm) with a Carbo-P micro-guard cartridge (Bio-Rad, Richmond, CA). The Column was maintained at 80°C and 20 μl of each sample was injected at a time and eluted with Milli-Q filtered water at a flow rate of 0.6 ml/min. The pretreatment byproducts were identified and quantified by Aminex column HPX-87 H (300 × 7.8 mm) with a Cation H micro-guard cartridge (Bio-Rad). The column was maintained at 5°C and 50 μl of each sample was injected at a time and eluted by 0.01 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.6 ml/min.

Ethanol was quantified by GC (Hewlett-Packard, HP 5890 Series) with an Porapak QS (Cabowax 20 M) column



**Fig. 2** Effect of the lignocellulosic fiber loading levels in the 2% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretreatment on the subsequent level of the reducing sugar liberated, shown as **a** the reducing sugar liberation efficiency and **b** the

reducing sugar concentration (yield) obtained. The data are displayed as the mean±1 SD, and are derived from triplicate experiments

**Table 1** Sugars and byproducts from H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and Ca(OH)<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulosic fibers. Lignocellulosic fiber [6% (w/v)] was pretreated by 2% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or 0.1% (w/v) Ca(OH)<sub>2</sub> at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for

30 min. The results are displayed as the mean±1 SD, and are derived from triplicate determinations. HMF Hydroxymethylfurfural

Pre-treatment	Pretreatment byproducts(g/l)						
	Glucose	Xylose	Purpural	HMF	Syringaldehyde	4-Hydroxybenzaldehyde	Vanillin
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.4±0.01	8.2±0.06	-	-	-	-	-
Ca(OH) <sub>2</sub>	0.16±0.01	0.08±0.01	-	-	-	-	0.02±0.0003

-Not detected

(2 m×0.32 m) at an oven temperature of 175°C and a flame ionization detector (FID) at 150°C. Helium, with a flow rate of 35 ml/min, was used as the carrier gas.

## Results and discussion

### Saccharification of starch in cassava pulp

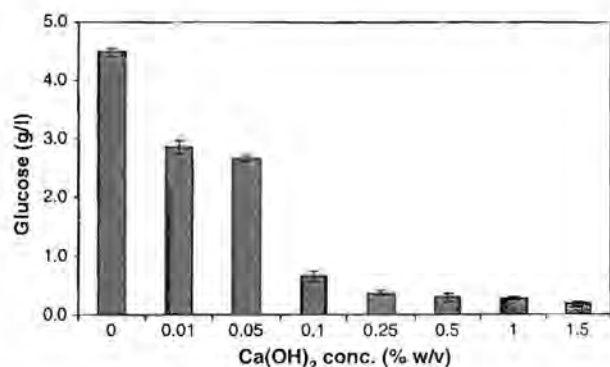
Analysis of the starch hydrolysates, obtained from a 3% (w/v) DS suspension of cassava pulp saccharified by α-amylase and glucoamylase as detailed in Materials and methods, revealed that the obtained glucose levels increased with increasing glucoamylase levels from 0.4 U/g (11.8 g glucose/l) to a maximal glucose yield of 22.6 g/l in the presence of glucoamylase 2 U/g. Indeed, the 23.5 g/l reducing sugar and 22.6 g/l glucose seen in the hydrolysate under these conditions represents some 68–70% (w/w) of the total mass of the cassava, and is close to the 68% (w/w) starch composition, suggesting a high degree of saccharification. This starch hydrolysate, once separated from the lignocellulosic fiber by filtration and centrifugation, was fermented to ethanol by *S. cerevisiae*, while the lignocellulosic fiber was further pretreated (see next section) and then saccharified by cellulase to glucose.

### Saccharification of lignocellulosic fiber in cassava pulp

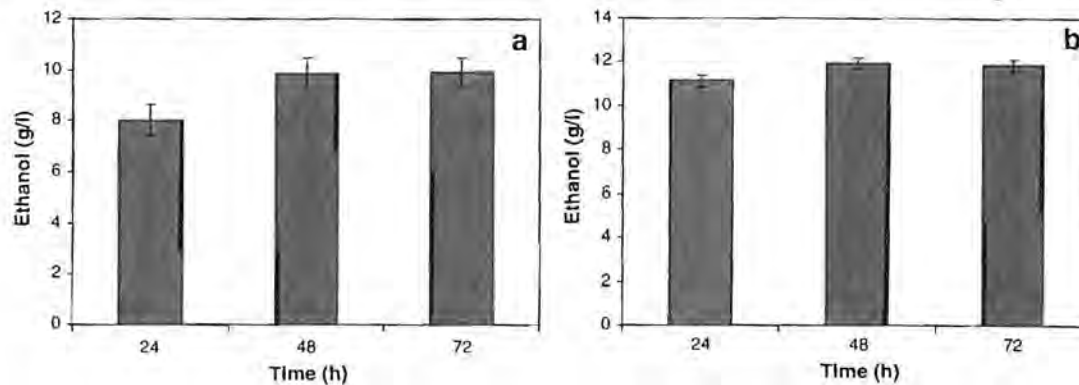
Saccharification of cassava pulp (3 g DS) by α-amylase and glucoamylase generated 1.5 g dry weight of lignocellulosic fiber, which was found to consist of 40% (w/w) cellulose, 18% (w/w) hemicellulose and 9% (w/w) lignin. Pretreatment of the lignocellulosic fiber mass by suspending [3% (w/v) DS] in various concentrations of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> indicated that the lignocellulosic fiber was most susceptible to cellulase GC 220 saccharification after treatment with 2% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 min (Fig. 1). Increasing the amount of lignocellulosic fiber loaded from 3% (w/v) to 6% (w/v), reduced the amount of sugar liberated per gram of substrate some 1.5-fold but this then remained stable at ~125 mg/g as the fiber loading level was further increased

up to 8% (w/v) (Fig. 2a). In contrast, the reducing sugar concentration in the hydrolysate increased 1.6- and a further 1.4-fold as the amount of lignocellulosic fiber loaded was increased from 3% (w/v) to 6 and 8% (w/v), respectively (Fig. 2b).

A lignocellulosic fiber loading of 6% (w/v) DS was thus selected based upon the homogeneity of the substrate during pH adjustment and the degree of cellulase saccharification. The reducing sugar level obtained from pretreatment of the 6% (w/v) DS lignocellulosic fiber, suspended in 2% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup>, reached a maximal level of 22 g/l after 30 min of treatment (being only ~21.6 and ~21.7 g/l at 15 and 45 min autoclaving, respectively) where, at this time, the fermentation inhibitory byproducts of furfural, hydroxymethylfurfural, 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin, all remained below the detection thresholds of these assays (Table 1). The glucose yield obtained after saccharification of the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretreated lignocellulosic fiber by cellulase GC 220 increased with increasing hydrolysis time from 15 g/l at 0 h to a maximum glucose yield of 26.6 g/l at 9 h, and remained at this level at



**Fig. 3** Effect of Ca(OH)<sub>2</sub> concentration on the subsequent susceptibility of the lignocellulosic fibers to cellulase degradation (hydrolysis). Lignocellulosic fibers (6% (w/v)) were pretreated with the indicated concentration of Ca(OH)<sub>2</sub> at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 min, and then hydrolyzed by cellulase GC 220 (62 U/g) at 40°C, pH 6 for 72 h. The data are displayed as the mean±1 SD, and are derived from triplicate experiments



**Fig. 4** Effect of the fermentation period on the level of ethanol production from **a** the starch hydrolysate, and **b** the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/cellulase treated lignocellulosic fiber [6% (w/v) loaded] hydrolysate, as substrates. Hydrolysates were fermented without (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> supple-

mentation to ethanol by *S. cerevisiae* at 30°C, pH 4.5 without shaking. The data are displayed as the mean ± 1 SD, and are derived from triplicate experiments

all longer time points up to 72 h. This 26.6 g/l glucose containing hydrolysate, equivalent to 79.8% (w/w) of the dry cassava pulp, was then fermented to ethanol (see Ethanol fermentation).

This glucose yield reported here is considerably higher than that reported previously by Srinorakutara et al. (2006), who reported a yield of 6.2% (w/v) of reducing sugar after treatment of cassava pulp [65.37% (w/w) DS starch content] at an initial substrate loading of 11% (w/v) DS using a mixture of cellulase (15 units/g) and pectinase (4.7 units/g) for 1 h followed by saccharifying by  $\alpha$ -amylase (24 units/g) for 2 h and glucoamylase (0.66 units/g) for 24 h.

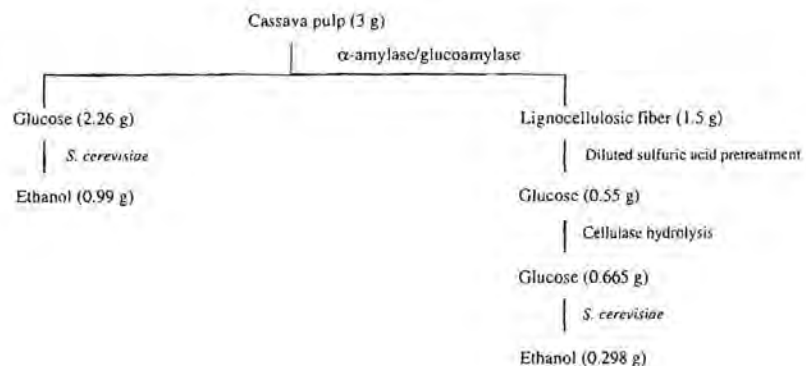
Pretreatment of the lignocellulosic fiber by calcium hydroxide was found to be counterproductive since it significantly decreased the subsequent susceptibility to cellulase digestion (hydrolysis) in a dose-dependent manner (Fig. 3). Certainly, alkaline pretreatment has been reported to cause solubilization, redistribution and condensation of lignin and modifications in the crystalline state of the cellulose that can lower or counteract the positive effects of lignin removal and cellulose swelling (Gregg and Saddler 1996). Likewise, it has been reported previously that the

cellulose structure is changed to a form that is denser and thermodynamically more stable than the native cellulose by alkaline pretreatment (Pettersen 1984). Analysis of the calcium hydroxide pretreated hydrolysate revealed the presence of vanillin at 0.02 mg/ml, while furfural, hydroxymethylfurfural, 4-hydroxybenzaldehyde and syringaldehyde all remained below detectable limits (Table 1).

#### Ethanol fermentation

The starch hydrolysate, and the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/cellulase treated lignocellulosic fiber hydrolysate, were each supplemented with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [0, 0.2, 0.4 and 0.6% (w/v)] and then fermented to ethanol by *S. cerevisiae* at 30°C, pH 4.5, without shaking for 72 h. However, neither hydrolysate required (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> supplementation as no enhanced ethanolic fermentation was observed upon the addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The maximum ethanol yields attained for the starch and the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/cellulase treated lignocellulosic fiber hydrolysates after 48 h of incubation were 9.9 and 11.9 g/l, respectively (Fig. 4). The experimental steps showing the glucose and ethanol yields in each step are shown in Fig. 5. Detoxification of the lignocellulosic fiber hydrolysate after

**Fig. 5** Schematic summary of the experimental steps showing the glucose and ethanol yields obtained



H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretreatment did not increase the ethanol yield above that found for the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / cellulase fiber hydrolysates (data not shown).

However, it should be noted that carboxylic acids are important byproducts formed during the lignocellulose pretreatment step in addition to furan derivatives and water-soluble lignin degradative compounds (Millati et al. 2002).

## Conclusions

Based on the method described herein, the hydrolysis of cassava pulp (3 g), which consisted of 67.8% (w/w) starch and 11.2% (w/w) lignocellulosic fiber, by  $\alpha$ -amylase and glucoamylase yielded glucose (2.26 g) and 1.5 g (DS) of lignocellulosic fiber. Fermentation of the resultant glucose to ethanol by *S. cerevisiae* yielded 0.99 g ethanol.

Diluted sulfuric acid pretreatment and hydrolysis of the pretreated lignocellulosic fiber (1.5 g, DS) by cellulase resulted in the production of 0.665 g glucose, which upon subsequent fermentation by *S. cerevisiae* gave 0.298 g ethanol. Therefore, the total ethanol yield was 0.44 g ethanol /g glucose, and 0.429 g ethanol/g (DS) of cassava pulp.

**Acknowledgments** The authors thank Dr. Robert Butcher for critical reading of this manuscript. This study was financially supported by the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK 2555), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovation Food, Health Products and Agriculture, the Ratchadapisek Somphot Endowment Fund (AG 001B) and the Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). We thank two anonymous referees for their helpful comments that improved this manuscript.

## References

- Balagopalan C, Ray RC, Sheriff JT, Rajalekshmy L (1994). Biotechnology for the value addition of waste waters and residues from cassava processing industries. In: Proceedings of the second international scientific meeting of the cassava biotechnology network. Bogor, Indonesia, 22–26 August 1994. Working document no. 150, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Columbia. 690-701
- Gregg D, Saddler JN (1996) A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl Biochem Biotechnol* 57-58(1):711–727
- Gupta R, Sharma KK, Kuhad RC (2009) Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*- NCIM 3498. *Bioresour Technol* 100:1214–1220
- Millati R, Niklasson C, Taherzadeh MJ (2002) Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem* 38:515–522
- Office of the National Economic and Social Development Board (2007) Development and promotion guideline for biochemical industry. Research and Consulting Institute. Thammasart University, Thailand
- Petersen RC (1984) The chemical composition of wood (chapter 2). In: Rowell RM (ed) The chemistry of solid wood, *Advances in Chemistry Series*, vol. 207. American Chemical Society, Washington, DC, p 984
- Somogyi M. (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195:19–23
- Srinorakutara T, Kaewvimol L, Saengow L (2006) Approach of cassava waste pretreatments for fuel production in Thailand. *J Sci Res Chula Univ* 31(1):77–84
- Sriroth K, Chollakup R, Chotineeranat S, Piyachomkwan K, Oates CG (2000) Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresour Technol* 71:63–69
- TAPPI (1988) Test method for determination of alpha-beta and gamma-cellulose in pulp. Technical Association of Pulp and Paper Industry, 203 om-88. TAPPI, Atlanta, Georgia

Manuscript Number:

Title: Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

Article Type: Research Paper

Keywords: Sugarcane leaves; Ethanol; Pretreatment; Lignocellulose

Corresponding Author: Associate Prof.Dr. Ancharida Akaracharanya, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Chulalongkorn University

First Author: Rumpa Jutakanoke

Order of Authors: Rumpa Jutakanoke; Teerapatr Srinorakutara; Natchanun Leepipatpiboon; Vichien Kitpreechavanich; Vasana Tolieng; Ancharida Akaracharanya, Ph.D.

**Abstract:** The susceptibility of sugarcane leaves to cellulase-mediated hydrolysis was compared after pretreatment by autoclaving at 121 °C, 15 pounds per square inch (lb/in<sup>2</sup>) in the presence of either dilute sulfuric acid or lime. The optimal (from those evaluated) conditions for each type of pretreatment of sugarcane leaves (20 - 40 mesh particle) at 6% weight by volume (w/v), dry weight basis, were found to be 1.5% (w/v) sulfuric acid and 1% (w/v) calcium hydroxide for 30 and 15 min, respectively, prior to GC220 cellulase (10 Filter paper unit (FPU)/gram dry weight basis (g, DS) treatment for 72 h. However, the acid pretreated samples released more glucose than the lime treated ones (5.7% and 3.9% weight by weight (w/w) DS, respectively). Acellulase TM 1000 hydrolysis (160 FPU/g, DS) of the dilute sulfuric acid pretreated ground sugarcane leaves only, or with the pretreatment hydrolysate yielded 0.104 and 0.163 g glucose/g (DS) of leaves after 6 h, respectively. Fermentation of the two above obtained glucose sources by *Saccharomyces cerevisiae* yielded ethanol at 4.8% and 8.0% (w/w, DS) after 24 h, respectively.

Suggested Reviewers: T. Vancov  
Industry and Investment NSW, Australia  
tony.vancov@industry.nsw.gov.au

He recently published "Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw" (2011)

Yuancai Chen  
state key laboratory of pulp engineering, China  
chenyc@scut.edu.cn

He recently published "Conversion of paper sludge to ethanol by SHF using *S.cerevisiae*" (2011)

S.C. Rabelo  
CTBE, Sao Paulo, Brazil  
sarita.rabelo@bietenol.org.br  
He recently published "Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. (2011)



Opposed Reviewers:

Dear Editor,

Enclosed please find the manuscript entitled "Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*" that I would like to submit for publishing as a full paper in the Biomass and Bioenergy.

This manuscript compares an efficiency of dilute sulfuric acid and lime pretreatment methods, which generate low amount of inhibitors against growth and ethanol fermentation ability of subsequent utilized ethanol-fermenting microorganisms, on cellulase susceptibility improvement of pretreated sugarcane leaves. And also ethanol yield obtained after cellulase hydrolysis of the pretreated sugarcane leaves in the presence and absence of pretreatment hydrolysate were compared.

We hope for your kind considerations.

Dr. Ancharida Akaracharanya

Department of Microbiology,

Faculty of Science, Chulalongkorn University,

Bangkok 10330, Thailand

Email: sanchari@chula.ac.th

### Highlights

> We compared two pretreatment methods for sugarcane leaves, dilute sulfuric acid and lime. > Dilute sulfuric acid sugarcane leaves were more susceptible to cellulase than lime pretreated. > We compared ethanol yield from dilute sulfuric acid pretreated sugarcane leaves saccharified in buffer solution and saccharified while suspending in pretreatment hydrolysate, then fermented to ethanol by *S.cerevesiae*. > Higher ethanol yield was obtained when the pretreated sugarcane leaves were saccharified in pretreatment hydrolysate.

**Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae***

1  
2 Rumpa Jutakanoke<sup>a</sup>, Teerapatr Srinorakutara<sup>b</sup>, Natchanun Leepipatpiboon<sup>c</sup>, Vichien Kitpreechavanich<sup>d</sup>, Vasana  
3 Tolieng<sup>e</sup>, Ancharida Akaracharanya<sup>a\*</sup>

4  
5 <sup>a</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan,  
6 Bangkok 10330, Thailand

7 <sup>b</sup>Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Klong 5, Klong Luang, Pathumthani 12120,  
8 Thailand

9 <sup>c</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan,  
10 Bangkok 10330, Thailand

11 <sup>d</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, 50 Paholothin Road, Bangkok 10900,  
12 Thailand.

13 <sup>e</sup>Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road,  
14 Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

15  
16 \*Corresponding author: Phone: + 66-2-2185071; Fax: + 66-2-2527576; E-mail: [sanchari@chula.ac.th](mailto:sanchari@chula.ac.th)

17 **Abstract**

18

19 The susceptibility of sugarcane leaves to cellulase-mediated hydrolysis was compared after pretreatment by  
20 autoclaving at 121 °C, 15 pounds per square inch (lb/in<sup>2</sup>) in the presence of either dilute sulfuric acid or lime.

21 The optimal (from those evaluated) conditions for each type of pretreatment of sugarcane leaves (20 - 40 mesh  
22 particle) at 6% weight by volume (w/v), dry weight basis, were found to be 1.5% (w/v) sulfuric acid and 1%  
23 (w/v) calcium hydroxide for 30 and 15 min, respectively, prior to GC220 cellulase (10 Filter paper unit  
24 (FPU)/gram dry weight basis (g, DS) treatment for 72 h. However, the acid pretreated samples released more  
25 glucose than the lime treated ones (5.7% and 3.9% weight by weight (w/w) DS, respectively). Acellulase TM  
26 1000 hydrolysis (160 FPU/g, DS) of the dilute sulfuric acid pretreated ground sugarcane leaves only, or with the  
27 pretreatment hydrolysate yielded 0.104 and 0.163 g glucose/g (DS) of leaves after 6 h, respectively.  
28 Fermentation of the two above obtained glucose sources by *Saccharomyces cerevisiae* yielded ethanol at 4.8%  
29 and 8.0% (w/w, DS) after 24 h, respectively.

30

31 Keywords: Sugarcane leaves; Ethanol; Pretreatment; Lignocellulose

32

## 33 1. Introduction

34

35 Sugarcane (*Saccharum officinarum*), an economically important plant of several countries including Thailand, is  
36 cultivated in about 10.7 thousand million square-meters (6.7 million rais) in Thailand [12]. Harvesting of  
37 sugarcane is difficult because sugarcane leaves are sharp. Therefore, removal of the leaves by burning before  
38 cutting the sugarcane shoot is a popular practice, but this causes serious air pollution. Moreover, the price of the  
39 resultant sugarcane is reduced. Value addition to sugarcane leaves would be likely to stop or to reduce the  
40 practice of leaf burning as well as improve the environmental and economic efficiency of sugar cane agriculture.

41 Due to the depletion of the non-renewable fossil fuel supplies, and a shortage of it in the near future,  
42 searching for renewable practical alternative energy supplies is important and necessary. Ethanol that is  
43 produced from waste agricultural products by microbial activity is one potential alternative energy source for  
44 many countries, including within Thailand. Each year sugarcane cultivation generates  $18 \times 10^6$  Million Tons of  
45 leaves [3, 10], which are currently a waste product. As a lignocellulosic biomass that is composed of three major  
46 polysaccharide components; cellulose, hemicellulose and lignin, sugarcane leaves are a potential source of  
47 biofuels including bioethanol. Hydrolysis of the cellulose and hemicellulose components results in the formation  
48 of the fermentable monosaccharides, glucose and xylose. But prior to the ability to saccharify the cellulose  
49 content of the sugarcane leaves, in order to use it as raw material for ethanol production, the cellulose must first  
50 be unshielded from the hemicellulose and lignin, and so made accessible to the cellulase enzyme. Such  
51 pretreatment processing of the lignocellulosic biomass can be achieved by physical methods, such as heat or  
52 pressure treatment, and by chemical methods, such as acid or alkaline treatment. Acid pretreatment improves the  
53 subsequent cellulase hydrolysis through removal of hemicellulose and lignin. However, the disadvantage of acid  
54 pretreatment is that it leads to the formation of inhibitors of the growth and ethanol fermentation ability of the  
55 subsequently utilized ethanol-fermenting microorganism(s). These inhibitors are principally furfural,  
56 hydroxymethylfurfural, 4-hydrobenzaldehyde, syringaldehyde, organic acids and other (volatile) products. The  
57 use of dilute acid pretreatment generates a lower concentration of these inhibitors [6]. Alkaline pretreatment  
58 causes the swelling of the lignocellulosic structure, and so leads to an increase in the internal surface area of the  
59 cellulose, and an increase in the amorphous cellulose proportion that is more susceptible to cellulase hydrolysis  
60 than the crystalline cellulose, a disruption of the structural linkage between lignin and carbohydrates, and a  
61 disruption of the lignin structure [14]. Recently, interest in lime (calcium hydroxide) pretreatment has increased  
62 because lime is recyclable and generates a low amount of inhibitory compounds [5,7,15].

63 Sugarcane leaves were used as substrate for ethanol production previously by simultaneous  
64 saccharification and fermentation method using *Saccharomyces cerevisiae* [8] and thermotolerant yeast,  
65 *Kluyveromyces fragilis* [9]. They were pretreated with sodium hydroxide or with alkaline hydrogen peroxide.  
66 And the pretreated residues were enzymatic hydrolysis then fermented to ethanol in basal medium. So, the  
67 ethanol yield was not a real ethanol yield from sugarcane leaves. Dawson and Boopathy (2007) pretreated  
68 sugarcane leaves with alkaline hydrogen peroxide or with dilute sulfuric acid, but they fermented the pretreated  
69 sugarcane leaves to ethanol directly, without addition of cellulolytic enzyme by using *S.cerevisiae* ATCC 576  
70 which known as an ethanol producer from cellulosic materials.

71 In this work, the susceptibility of sugarcane leaves pretreated by dilute sulfuric acid or lime to  
72 subsequent cellulase hydrolysis was compared. In following experiments which sugarcane leaves were  
73 pretreated with dilute sulfuric acid which generated low amount of inhibitory compounds, they were  
74 saccharified by two methods. First, the pretreated ground sugarcane leaf particles (hereafter referred to simply  
75 as sugarcane leaves) were separated from pretreatment hydrolysate, then they were hydrolyzed by cellulase in  
76 buffer solution. Second, the pretreated sugarcane leaves were hydrolyzed in the presence of the pretreatment  
77 hydrolysate by an addition of cellulase directly into pretreatment slurry. After saccharification, the resultant  
78 fermentable sugars released were fermented to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* without any nutrients  
79 supplementation, an ethanol yield and fermentation period of each method were compared.

80

## 81 2. Materials and methods

82

### 83 2.1 Sugarcane leaves

84

85 Sugarcane leaves were collected from cultivation sites at Nakhon Ratchasima province, Thailand, and were then  
86 cut, dried at 60 °C, Hammer milled then sieved for a 20 - 40 mesh particle size. Their major component was  
87 found to be cellulose 38.5%, hemicellulose 23% and lignin 15.6% (w/w) on a dry weight basis (DS) (see section  
88 2.5).

89

### 90 2.2 Microorganism

91

92 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 was obtained from the Thailand Institute of Scientific and Technological  
93 Research (TISTR). A single colony of *S. cerevisiae* grown on Yeast Peptone Dextrose (YPD) agar (yeast extract  
94 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l, agar 15 g/l, pH 4.5) at 30 °C for 24 h was inoculated into YPD broth,  
95 incubated at 30 °C with shaking (200 rev/min) for 24 h, and then the culture was transferred at 1% volume by  
96 volume (v/v) to the same medium and incubated under the same conditions for either 6 or 12 h. The resulting 6-  
97 or 12-h-old yeast culture was then used as a starter inoculum at 10% (v/v). In some experiments, the culture  
98 suspension was first centrifuged at 4 °C, 11857xg (10 min) to precipitate the yeast cells and then the cells were  
99 resuspended in fresh YPD broth without glucose at the original volume of the separated supernatant, and then  
100 used as the inoculum.

101

## 102 2.3 Pretreatment and saccharification of sugarcane leaves

103

### 104 2.3.1 Sulfuric acid and lime pretreatment

105 Sugarcane leaves particles were pretreated by suspending at 3% (w/v, DS) (unless indicated otherwise at 6 or  
106 8%) in either dilute sulfuric acid (1, 1.5 or 2% (w/v) as indicated) or lime (0.1, 1, 2 or 3% (w/v) as indicated)  
107 solution and autoclaved at 121 °C, 15 lb/in<sup>2</sup> for the indicated time (5 – 60 min).

### 108 2.3.2 Determination of pretreatment efficacy on improvement of susceptibility to cellulase

109 The pretreatment slurry, which contained pretreated sugarcane leaves suspended in the pretreatment hydrolysate,  
110 was filtered through a 0.88 mm stainless sieve and re-centrifuged (4 °C, 11857xg for 10 min) to remove residual  
111 lime powder and completely remove the pretreatment hydrolysate (supernatant). The pretreated sugarcane leaves  
112 (pellet) were suspended in 0.5 M citrate buffer pH 5.0 to the same volume as the separated pretreatment  
113 hydrolysate. Cellulase GC220 (71.3 FPU/μl; Genecor International, Inc., USA) was added at 10 FPU/g, DS) and  
114 incubated at 40 °C with shaking (125 rpm) for 72 h. The susceptibility of the pretreated sugarcane leaves to  
115 cellulase hydrolysis was determined from the amount of reducing sugar liberated after hydrolysis of the  
116 pretreated sugarcane leaves with cellulase. Optimization of the pretreatment condition was performed by varying  
117 the concentration of sulfuric acid (1, 1.5 or 2% (w/v)) or lime (0.1 – 3.0% (w/v)) solution, autoclaving period (5  
118 – 60 min) and the amount of sugarcane leaves loaded (3, 6 and 8% (w/v) DS).

### 119 2.3.3 Analysis of sugars and pretreatment by-products

120 Sugarcane leaves were pretreated by autoclaving at 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) with either 1.5% (w/v) sulfuric acid for 30  
121 min or with 1% (w/v) lime for 15 min (optimized conditions from section 2.3.2), and then the pretreatment slurry



122 was centrifuged at 4 °C, 11857xg for 20 min. The supernatant was harvested and the pH adjusted to 7.0 prior to  
123 analysis of the levels of glucose, xylose and pretreatment by-products (furfural, hydroxymethylfurfural, 4-  
124 hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin) as detailed in section 2.5.

#### 125 *2.3.4 Dose of cellulase for saccharification of dilute sulfuric acid pretreated sugarcane leaves*

126 Sugarcane leaves were pretreated with 1.5% (w/v) sulfuric acid at 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) for 30 min (evaluated from  
127 section 2.3.2) and the resulting pretreatment slurry was adjusted to pH 5.0. Accellulase<sup>TM</sup> 1000 (265 FPU/ml,  
128 Genecor International, Inc., USA) at one of four doses (50, 106, 160 and 212 FPU/g, DS) was then added into  
129 the pH adjusted pretreatment slurry and incubated at 50 °C with shaking (120 rpm) for 6 h. After that the reaction  
130 mixture was filtered through a 0.88 mm stainless steel sieve and the filtrate was centrifuged at 4 °C, 11875xg for  
131 20 min. The obtained supernatant was analyzed for the level of reducing sugars and glucose liberated.

132

## 133 2.4 Ethanol fermentation

134

#### 135 *2.4.1 Ethanol production by S. cerevisiae from the acid pretreated leaves*

136 Sugarcane leaves was pretreated with 1.5% (w/v) sulfuric acid at 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) for 30 min and then the  
137 resultant pretreatment slurry was centrifuged at 4 °C, 11857xg (20 min) to separate the pretreated sugarcane  
138 leaves (pellet) from the pretreatment hydrolysate (supernatant). The pellet was resuspended in 0.5 M citrate  
139 buffer, pH 5.0 to the same volume of the separated pretreatment hydrolysate, and then saccharified by adding  
140 Accellulase<sup>TM</sup> 1000 at 160 FPU/g, DS (optimal dose derived from section 2.3.4). After incubation for 6 h, the  
141 suspension was centrifuged, the supernatant harvested and the pH adjusted to 4.5 before being sterilized (110 °C,  
142 10 lb/in<sup>2</sup>, 10 min) and used as a medium for ethanol fermentation by *S. cerevisiae* at 10% (v/v) inoculum.  
143 Fermentation conditions were 30 °C, pH 4.5 under oxygen limited conditions for 72 h. The oxygen limited  
144 condition was performed by fermenting 40 ml of the incubated medium in a 50 ml flask without shaking. The  
145 flask was capped with a cotton plug and covered tightly with parafilm. The effect of the inoculum age (6- and  
146 12-h-old) and fermentation period (0 – 96 h) on the ethanol yield obtained were determined.

#### 147 *2.4.2 Ethanol production from the acid treated leaves and hydrolysate by S. cerevisiae*

148 The ground sugarcane leaves were pretreated by 1.5% (w/v) sulfuric acid at 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) for 30 min, and  
149 then the pretreatment slurry containing acid treated leaves and hydrolysate was pH adjusted to 5.0 and  
150 saccharified by adding Accellulase<sup>TM</sup> 1000 at 160 FPU/g, DS. After incubation for 6 h, it was centrifuged and  
151 the resulting supernatant was harvested, pH adjusted to 4.5, sterilized at 110 °C and 10 lb/in<sup>2</sup> for 10 min, and

152 then used as the medium for ethanol fermentation by the 6-h-old *S. cerevisiae* culture (from section 2.4.1) at a  
153 10% (v/v) inoculum. Fermentation conditions were 30 °C, pH 4.5 under oxygen limited conditions (see section  
154 2.4.1) for 72 h. The effect of the fermentation period (0 – 96 h) under these conditions on the ethanol yield was  
155 determined.

156

## 157 2.5 Analytical procedures

158 The cellulose, hemicellulose and lignin contents of the sugarcane leaves were determined by the method  
159 described by the Technical Association of Pulp and Paper Industry [17]. Reducing sugars were analyzed by the  
160 Somogyi-Nelson method [16]. Glucose, xylose and pretreatment by-products (furfural, hydroxymethylfurfural,  
161 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin) were analyzed by High-performance liquid  
162 chromatography (HPLC) (Agilent 1100 Series) equipped with a quaternary pump, on-line degasser, autoinjector,  
163 column thermostat and refractive index detector, and using ChemStation software (Agilent Technology Co. Ltd.,  
164 USA). Sugars were identified and quantified by resolution through an Aminex column HPX-87P (300 x 7.8 mm)  
165 with a Carbo-P micro-guard cartridge (Bio-Rad, USA). The column was maintained at 80 °C and 20 µl of each  
166 sample was injected at a time and eluted with Milli-Q filtered water at a flow rate of 0.6 ml/min. The  
167 pretreatment by-products were identified and quantified by resolution through an Aminex column HPX-87H  
168 (300 x 7.8 mm.) with a Cation H micro-guard cartridge (Bio-Rad, USA). The column was maintained at 55 °C  
169 and 50 µl of each sample was injected at a time and eluted with 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.6 ml/min.  
170 Ethanol was quantified by GC (Hewlett-Packard, HP 5890 Series) with a Porapak QS (Cabowax 20 M) column  
171 (2 m x 0.32m) at a temperature of 175 °C and a flame ionization detector (FID) at 150 °C. Helium, with a flow  
172 rate of 35 ml/min, was used as the carrier gas. Glucose was also analyzed by a glucose analyzer (YSI 2700  
173 Select, USA).

174

## 175 3. Results and discussion

176

### 177 3.1 Dilute sulfuric acid pretreatment

178

179 Sugarcane leaves were most susceptible to cellulase hydrolysis when 3% (w/v, DS) was suspended in 1.5%  
180 (w/v) sulfuric acid and autoclaved at 121 °C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 min (Fig 1a). A prolonged autoclave period of 45 –  
181 60 min significantly decreased the susceptibility of the pretreated sugarcane leaves to cellulase hydrolysis (Fig.

182 1b). Increasing the amount of sugarcane leaves loaded in the pretreatment process from 3 to 6% (w/v, DS) had  
183 no significant affect but increasing it further up to 8% (w/v, DS) decreased the susceptibility to cellulase  
184 hydrolysis of the pretreated sugarcane leaves some 1.16-fold (Fig. 1c). A high substrate loading in pretreatment  
185 process may well block the heat transfer in the reaction [11,18]. A direct relationship between the amount of  
186 reducing sugars released after dilute sulfuric acid pretreatment and the susceptibility of dilute sulfuric acid  
187 pretreated sugarcane leaves to cellulase hydrolysis was evident. Indeed, previously Grohmann and Bothast  
188 (1996) and Gupta et al. (2009) determined the optimal conditions for the cellulose digestibility of dilute sulfuric  
189 acid pretreated corn fibre and *Propopis juliflora* by monitoring the level of reducing sugar released after dilute  
190 sulfuric acid pretreatment, respectively.

191

### 192 3.2 Lime pretreatment

193

194 With respect to lime pretreatment, sugarcane leaves were most susceptible to cellulase based hydrolysis when  
195 3% (w/v, DS) leaves were treated with 1% (w/v) calcium hydroxide and autoclaved at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 15  
196 min (Fig. 2a and b). However, the 1.5% (w/v) sulfuric acid pretreatment resulted in a greater digestibility  
197 (susceptibility to hydrolysis) of the pretreated sugarcane leaves to cellulase than that obtained with the lime  
198 pretreated leaves under all evaluated conditions. In addition, the pretreatment of 6% (w/v) sugarcane leaves with  
199 either 1.5% (w/v) sulfuric acid or 1% (w/v) calcium hydroxide at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 or 15 min, respectively,  
200 followed by hydrolysis with cellulase GC220 (10 FPU/g, DS) for 72 h resulted in a 3.18- and 1.46-fold greater  
201 level of reducing sugars (34% vs. 10.7% w/w (DS)) and glucose (5.7% vs. 3.9% (w/w, DS)) in the acid treated  
202 sample than the alkali one , respectively.

203 This result agrees well with the previous report of Dawson and Boopathy (2006) that dilute sulfuric acid  
204 pretreated sugarcane leaves gave a higher ethanol yield upon subsequent fermentation than alkaline peroxide  
205 pretreated sugarcane leaves.

206 Therefore, sugarcane leaves were pretreated with 1.5% (w/v) sulfuric acid at 121°C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 min  
207 in all the following experiments.

208

### 209 3.3 Sugars and by-products in pretreatment hydrolysate

210

211 The 1.5% (w/v) sulfuric acid pretreated hydrolysate contained a small amount of glucose (0.62 g/l) and a higher  
212 level of xylose (9.0 g/l) from the cellulose and hemicelluloses, as expected. The concentration of all pretreatment  
213 by-products (furfural, hydroxymethylfurfural, 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin) were  
214 detectable in both the dilute sulfuric acid (all assayed compounds) and the lime (not furfural nor  
215 hydroxymethylfurfural) pretreatment hydrolysates (Table 1), but were all present at concentrations below their  
216 reported toxic levels for ethanol fermentation by and growth of *S. cerevisiae* [2,13]. Therefore, detoxification of  
217 the pretreatment hydrolysates before ethanol fermentation by *S. cerevisiae* is not necessary  
218

### 219 3.4 Saccharification of dilute sulfuric acid pretreated sugarcane leaves

220  
221 Four different doses of Accellulase™1000 enzyme were used to hydrolyze the 1.5% (w/v) sulfuric acid  
222 pretreated sugarcane leaves for 6 h. The limit of a 6 h digestion was set because, in general, the longer the  
223 saccharification time, the higher is the risk of the glucose being lost due to contamination. The maximum  
224 reducing sugar (20.2 g/l) and glucose (9.8 g/l) levels were obtained with an Accellulase™ 1000 dose of 160  
225 FPU/g (DS). Therefore, 1.5% (w/v) sulfuric acid pretreated sugarcane leaves were hydrolyzed with 160 FPU/g  
226 (DS) Accellulase™1000 for 6 h in all the following experiments.

### 227 228 3.5 Ethanol fermentation

#### 229 230 3.5.1 Ethanol production by *S. cerevisiae* from the acid pretreated leaves.

231 Sugarcane leaves were pretreated with 1.5% (w/v) sulfuric acid and further hydrolyzed by 160 FPU/g (DS) of  
232 Accellulase™ 1000, as outlined in section 2.4.1 and shown schematically in Figure 4. After centrifugation, the  
233 resultant supernatant was found to contain 6.24 g/l glucose, and was sterilized (110 °C, 10 lb/in<sup>2</sup> for 10 min) and  
234 used as medium for ethanol fermentation. A 6- or 12-h-old *S. cerevisiae* culture was inoculated at 10% (v/v) and  
235 after 72 h the yield of ethanol was 2.76 and 1.76 g/l, respectively (Fig.4 and data not shown, respectively).  
236 Ethanol production by *S. cerevisiae* from the 6-h-old culture as the inoculum was maximal (2.9 g/l or 48% w/w,  
237 DS) after 12 h of incubation and remained at this level thereafter (Fig. 5).

#### 238 3.5.2 Ethanol production from the acid treated leaves and hydrolysate by *S. cerevisiae*

239 Sugarcane leaves were pretreated with 1.5% (w/v) sulfuric acid and the combined leaves and hydrolysate, which  
240 were found to contain glucose and xylose levels of 0.62 and 9.0 g/l, respectively, was pH adjusted to 5.0 and

241 then hydrolyzed by Accellulase™ 1000 (160 FPU/g, DS) for 6 h, as outlined in section 2.4.2 and schematically  
242 shown in Fig. 4. The resulting cellulase hydrolysate, after removal of the particulate matter by centrifugation,  
243 was found to contain a 1.57-fold higher glucose level (9.8 g/l) than that seen after the corresponding cellulase  
244 hydrolysis of the leaf particles alone. An increase of glucose released from pretreatment hydrolysate saccharified  
245 by cellulase. After sterilization (110 °C, 10 lb/in<sup>2</sup> for 10 min) and ethanol fermentation by a 10% (v/v) inoculum  
246 of a 6-h-old culture of *S. cerevisiae*, ethanol yield reached 4.15 g/l or 7 %w/w, DS after 12h, and the ethanol  
247 yield was maximum (4.71 g/l or 8 % (w/w, DS)) after 24 h of incubation (Fig. 6).

248 Under these conditions, when the 6-h-old *S. cerevisiae* culture inoculum was suspended into pretreated  
249 sugarcane leaves hydrolysate without any sugar and nutrients supplementation instead of YPD without glucose,  
250 the ethanol yield was reduced some 2.5-fold to 3.91 g/l or 6.5% w/w (DS). The addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to 0.45  
251 mM did not improve the ethanol yield (data not shown), but it could be increased to 4.75 g/l or 8 % (w/w, DS)  
252 by prolonging the incubation period to 72 h.

253 In this study, dilute sulfuric acid pretreated sugarcane leaves were hydrolyzed by cellulase (160  
254 FPU/g, DS) while suspended in the pretreatment hydrolysate for 6 h, then fermented to ethanol without any  
255 supplementation by inoculating of a 10% (v/v) inoculum of a 6-h-old *S. cerevisiae* culture to generate an  
256 ethanol yield of 8% (w/w, DS) or 0.048 g/g glucose after 24 h. Dawson and Boopathy (2006) reported an  
257 ethanol yield of 1% (w/w, DS) after 12 days of incubation from dilute sulfuric acid pretreated sugarcane leaves  
258 using *S. cerevisiae* which can ferment cellulose directly to ethanol. Krishna et al. (1998) reported an ethanol  
259 yield of 20% w/w, DS within 72h from alkaline peroxide pretreated sugarcane leaves saccharified by cellulase  
260 (40FPU/g, DS) and simultaneously fermented to ethanol by *S.cerevisiae* (10% v/v inoculum). Next 3 years,  
261 Krishna et al. reported an increase of ethanol yield (22% w/w, DS) within 72h from sugarcane leaves by the  
262 same pretreatment, cellulase dose and fermentation method but using *Kluyveromyces fragilis* (10% v/v)  
263 inoculum instead. The high ethanol yield of both works reported by Krishna et al, was due to the simultaneous  
264 saccharification and fermentation which performed in basal medium. And the increase ethanol yield by  
265 *Kluyveromyces fragilis* was due to an ability to ferment glucose to ethanol at elevate temperature, which raised  
266 up fermentation temperature to come closer an optimal temperature for cellulase hydrolysis activity. An  
267 achievement of this study were 1) suitable pretreatment and saccharification methods which did not generate an  
268 acid waste water 2) a real ethanol yield from sugarcane leaves because fermentation broth was not  
269 supplemented with any sugars or nutrients.

270

271 **4. Conclusion**

272

273 Sugarcane leaves pretreated with dilute sulfuric acid were more susceptible to cellulase hydrolysis than those  
274 pretreated with lime. The optimally (1.5% (w/v)) sulfuric acid pretreated sugarcane leaves (6% (w/v, DS)) were  
275 hydrolyzed with cellulase (160 FPU/g, DS) while suspended in pretreatment hydrolysate, which contained  
276 glucose (0.62 g/l), and xylose (9.0 g/l), then further fermented to ethanol by *S. cerevisiae*. The maximal ethanol  
277 yield obtained was 8% (w/w, DS) after 24 h of incubation.

278 Based on this study, dilute (1.5% (w/v)) sulfuric acid pretreated sugarcane leaves are recommended for  
279 hydrolysis with cellulase while suspended in the pretreatment hydrolysate for maximal ethanol yield.

280

281 **Acknowledgements**

282

283 The authors thank Dr. Robert Butcher for critical reading of this manuscript. This study was financially  
284 supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand,  
285 Office of the Higher Education Commission (EN275B); the Thai Government Stimulus Package (TKK 2555)  
286 (under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovation Food, Health Products and  
287 Agriculture); the Ratchadapisek Somphot Endowment Fund (AG 001B); the Thailand Institute of Scientific and  
288 Technological Research (TISTR); and the Human Resource Development in Science Project (Science  
289 Achievement scholarship of Thailand, SAST).

290

291 **References**

292

- 293 [1] Dawson L, Boopathy R. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. *Bioresource Technol*  
294 2006;98:1695-1699.
- 295 [2] Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations  
296 of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*.  
297 *Enzyme Microb Tech* 1996;19:220–225.
- 298 [3] Food and agricultural organization of United Nations (FAO). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>;  
299 2008.

- 300 [4] Grohmann K, Bothast RJ. Saccharification of corn fibre by combined treatment with dilute sulfuric acid and  
301 enzymes. *Process biochem* 1996;32:405-415.
- 302 [5] Gupta R, Sharma KK, Kuhad RC. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody  
303 substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498.  
304 *Bioresource Technol* 2009;100:1214-1220.
- 305 [6] Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.  
306 *Bioresource Technol* 2009;100:10-18.
- 307 [7] Hodge DB, Andersson C, Berglund KA, Rova U. Detoxification requirements for bioconversion of softwood  
308 dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzyme Microb Tech* 2009;44:309-316.
- 309 [8] Krishna SH, Prasanthi K, Chowdary GV, Ayyanna C. Simultaneous saccharification and fermentation of  
310 pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochem* 1998;33:825-830.
- 311 [9] Krishna SH, Reddy TJ, Chowdary GV. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic  
312 waste to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technol* 2001;77:193-196.
- 313 [10] Krishnan C, Sousa LDC, Jin M, Chang L, Dale BE, Balan V. Alkali-Based AFEX pretreatment for the  
314 conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnol Bioeng* 2010;107: 441-450.
- 315 [11] Kuhad RC, Manchanda M, Singh A. Hydrolytic potential of extracellular enzymes from a mutant strain of  
316 *Fusarium oxysporum*. *Bioproc Biosyst Eng* 1999;20:47-125.
- 317 [12] Office of the National Economics and Social Development Board. Value-added agricultural products  
318 project by Zero Waste Industry development. Thailand; 2007.
- 319 [13] Olsson L, Hahn-Hagardal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme*  
320 *Microb Tech* 1996;18:312-331.
- 321 [14] Palonen H, Thomsen AB, Tenkanen M, Schmidt AS, Viikari L. Evaluation of wet oxidation pretreatment  
322 for enzymatic hydrolysis of softwood. *Appl Biochem Biotech* 2004;117:1-17.
- 323 [15] Ranatunga TD, Jervis J, Helm RF, McMillan JD, Wooley RJ. The effect of overliming on the toxicity of  
324 dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme*  
325 *Microb Tech* 2000;27:240-247.
- 326 [16] Somogyi M. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 1952;195:15-23.
- 327 [17] TAPPI-Technical Association of Pulp and Paper Industry. Test method for determination of alpha-beta  
328 and gamma-cellulose in pulp; 1988.

329 [18] Zheng Y, Pan Z, Zhang R, Wang D. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops of  
330 fermentable sugar production. *Appl Ener* 2009;86:2459-2465.



1 **Table 1** - The level of fermentable monosaccharide sugars and potentially inhibitory byproducts in the 1.5% (w/v)  
 2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 1% (w/v) Ca(OH)<sub>2</sub> pretreated hydrolysates

		Pretreatment hydrolysate <sup>a</sup>	
		Sulfuric acid (g/l)	Calcium hydroxide (g/l)
<b>Sugars</b>	Glucose	0.62 ± 0.05	-
	Xylose	9.0 ± 0.26	-
<b>Inhibitors</b>	Hydroxymethylfurfural	0.000396 ± 4.04x10 <sup>-6</sup>	-
	Furfural	0.006047 ± 2.31x10 <sup>-5</sup>	-
	4-Hydrobenzaldehyde	0.000228 ± 5.5x10 <sup>-6</sup>	0.0171 ± 0.0086
	Vanillin	0.000198 ± 1.2x10 <sup>-5</sup>	0.0076 ± 0.0034
	Syringaldehyde	0.006557 ± 0.0011	0.0080 ± 0.006

14 <sup>a</sup> Sugarcane leaves (6% (w/v)) were pretreated with 1.5% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 121 °C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 30 min  
 15 or with Ca(OH)<sub>2</sub> (3g (DS)/g Ca(OH)<sub>2</sub> at 121 °C, 15 lb/in<sup>2</sup> for 15 min. The results are displayed as the mean ± 1  
 16 SD, and are derived from triplicate determinations. - Not detected

17

**Fig. 1** - Effect of (a) dilute sulfuric acid concentration, (b) autoclaving time and (c) substrate loading levels during pretreatment of sugarcane leaves on the susceptibility to subsequent cellulase hydrolysis (measured as the amount of released reducing sugar). The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments

**Fig. 2** - Effect of (a) calcium hydroxide concentration and (b) autoclaving time during pretreatment of sugarcane leaves on the susceptibility to subsequent cellulase hydrolysis (measured as the amount of released reducing sugar). The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments

**Fig. 3** - Effect of the cellulase (Accellulase<sup>TM</sup> 1000) enzyme dose on the level of released reducing sugars (■) and glucose (■). The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments

**Fig. 4** - Schematic summary of the two saccharification approaches showing the glucose and subsequent ethanol yields obtained in each approach

**Fig. 5** - Time course of ethanol production from the acid-pretreated leaves (glucose) by a 6-h-old culture of *S. cerevisiae* as the inoculum. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments

**Fig. 6** - Time course of ethanol production from the combined acid-pretreated leaves and hydrolysate (glucose/xylose mixture) by a 10% (v/v) inoculums of a 6-h-old culture of *S. cerevisiae*. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments

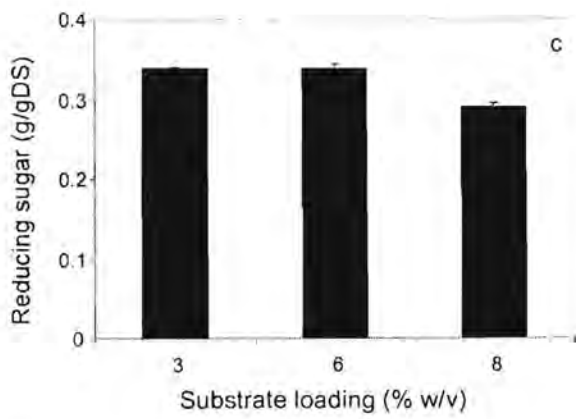
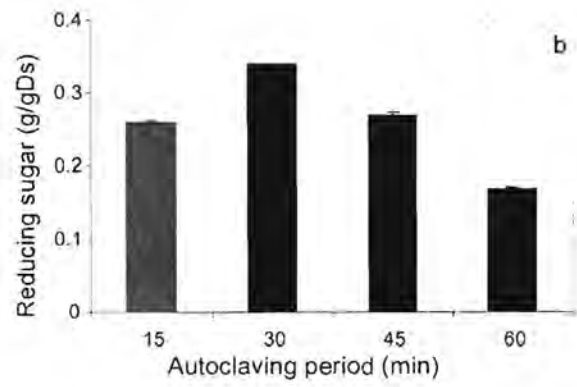
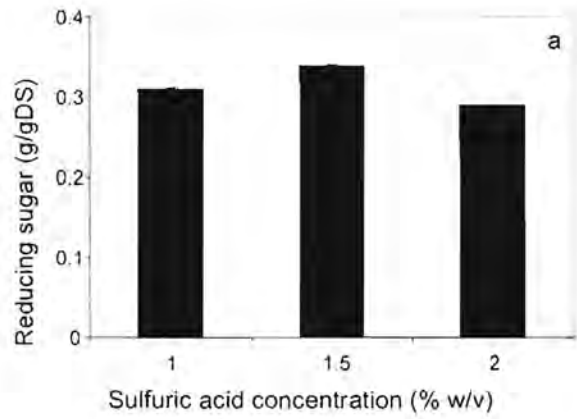


Fig. 1

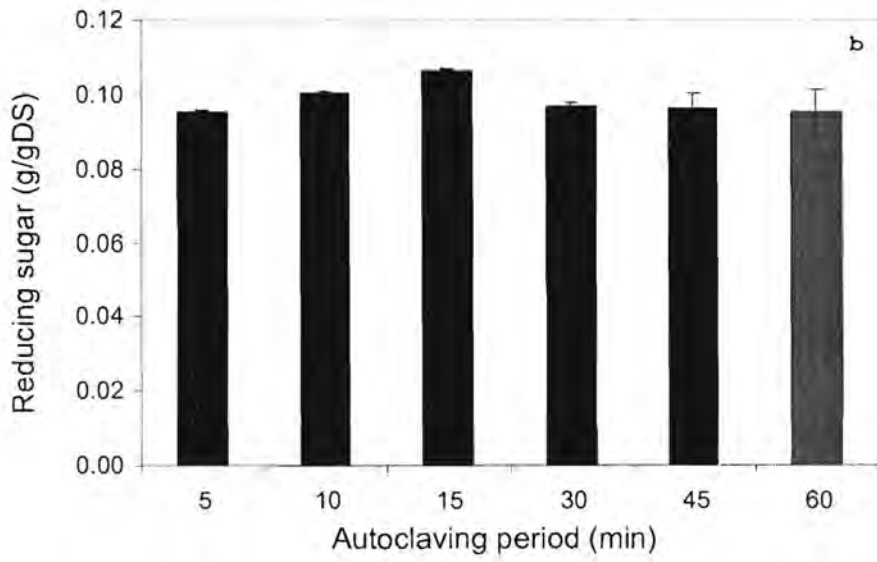
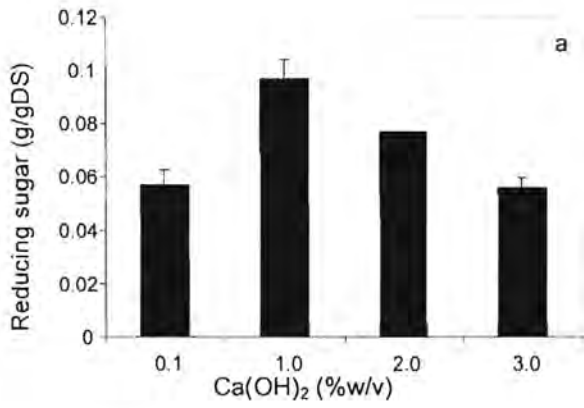


Fig. 2

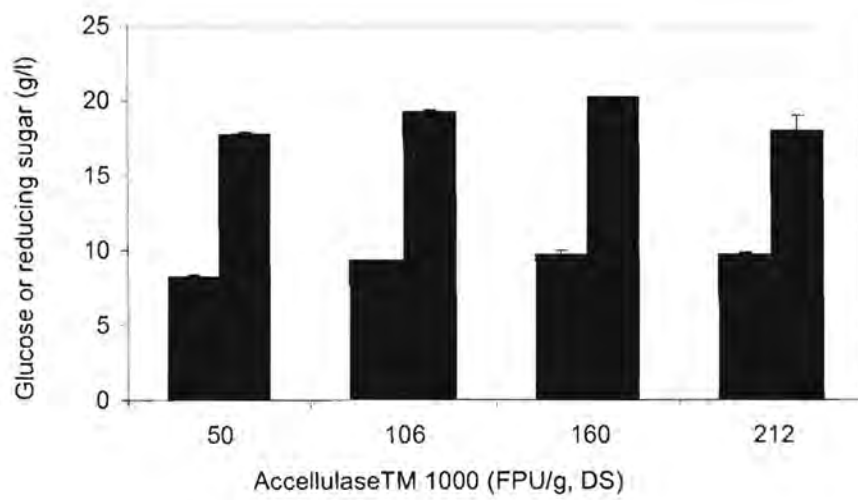


Fig. 3

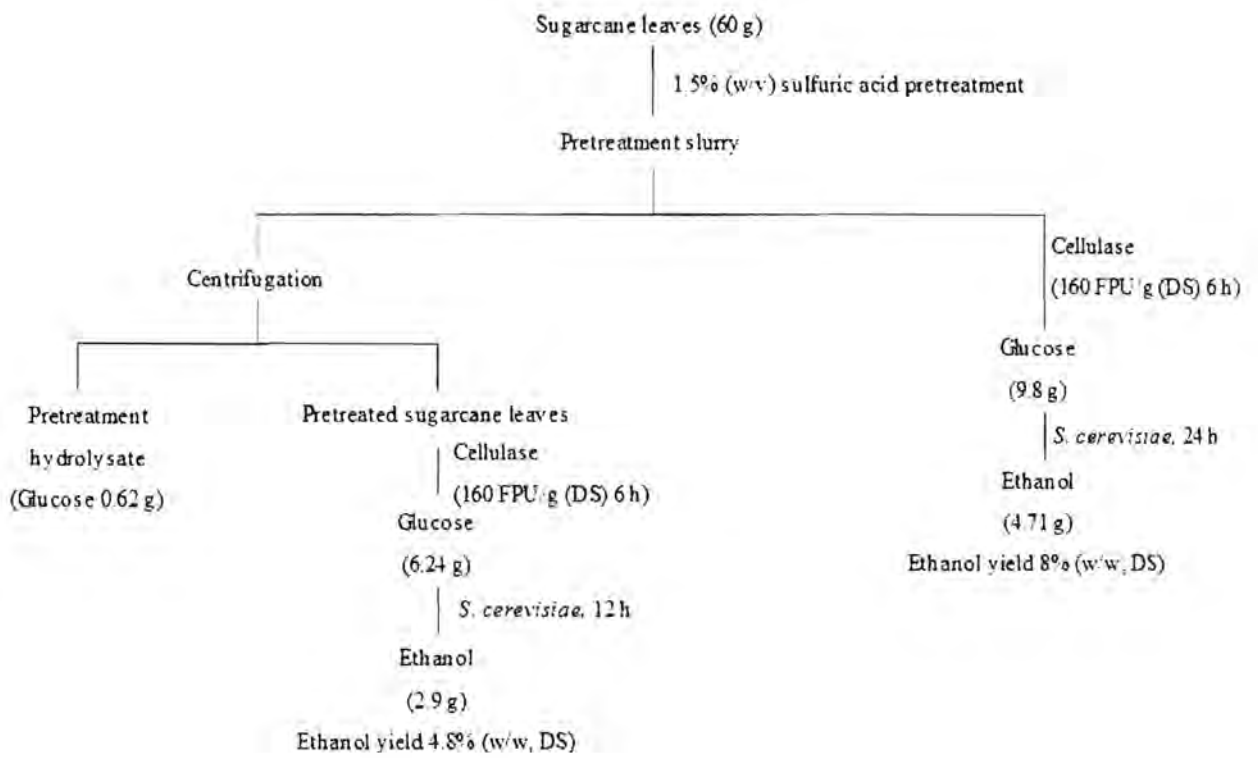


Fig. 4

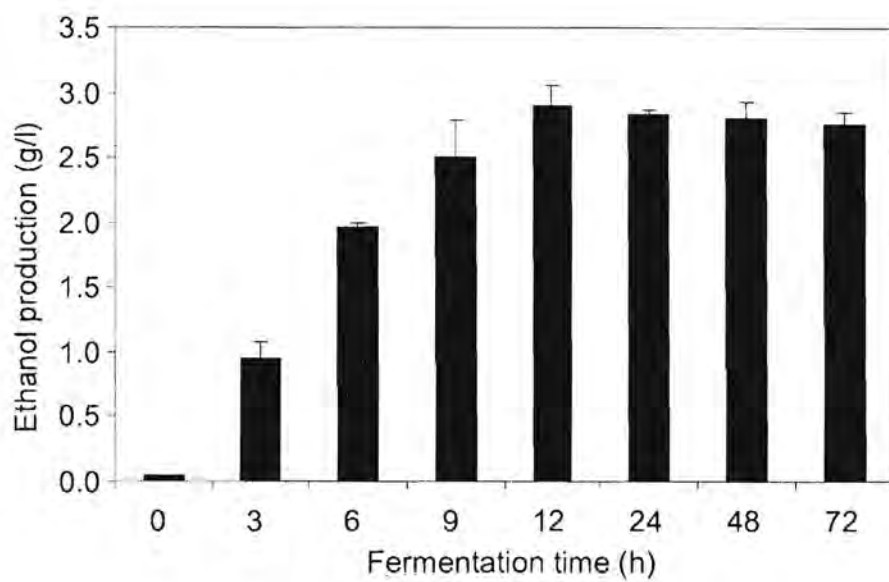
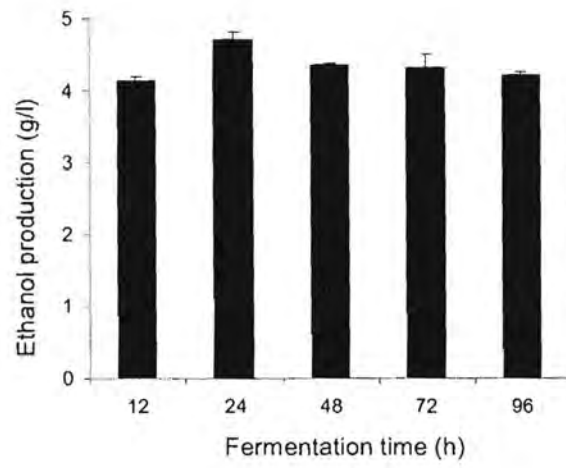


Fig. 5



**Fig. 6**



Manuscript Number:

Title: Ethanol production from enzymatic hydrolysis of Purple Guinea Grass pretreated with lime

Article Type: Research Paper

Keywords: Purple guinea grass, ethanol, pretreatment

Corresponding Author: Associate Prof.Dr. Ancharida Akaracharanya, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Chulalongkorn University

First Author: Suwaphat Ratsamee

Order of Authors: Suwaphat Ratsamee; Ancharida Akaracharanya, Ph.D.; Natchanun Leepipatpiboon; Teerapatr Srinorakutara; Vichien Kitpreechavanich; Vasana Tolieng

Abstract: Dilute sulfuric acid or calcium hydroxide at 121°C, 103.4 kPa was used to pretreat purple guinea grass to compare their efficiency on cellulose digestibility improvement. Cellulase hydrolysis of the purple guinea grass pretreated with dilute sulfuric acid at optimized conditions (6% (w/v) in 3% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min) yielded reducing sugars slightly higher than those pretreated with calcium hydroxide at optimized conditions (6% (w/v) in 4% (w/v) Ca(OH)<sub>2</sub> for 5 min). But glucose released from the purple guinea grass pretreated with calcium hydroxide was slightly higher than those pretreated with dilute sulfuric acid.

Ethanol fermentation via separate hydrolysis and fermentation (SHF) process using *Saccharomyces cerevisiae* of purple guinea grass pretreated with calcium hydroxide, then hydrolysed with commercial cellulase (9 PFU/g, dry wt.) for 6 h yielded ethanol 0.44 g/g glucose or 0.21 g/g cellulose within 48 h, while via simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process yielded ethanol 0.18 g/g cellulose within 96 h. Ethanol yield of the SHF process increased to 0.497 g/g glucose or 0.24 g/g cellulose when the fermentation was performed in 5 l fermentor.

Suggested Reviewers: Wen-Song Hwang  
Institute of Nuclear energy research, Taiwan  
wshwang@iner.gov.tw

His report " Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production" was published on 2008.

Castro Eulogio  
Department of chemical, Environmental and Material Engineering University. Spain  
ecastro@ujaeni.es

His report " Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification" was published on 2008

Hongzhang Chen  
Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Science, China  
hzchen@home.ipe.ac.cn

His report "Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose" was published on 2006

Opposed Reviewers:

Dear Editor,

Enclosed please find the manuscript entitled "Ethanol production from enzymatic hydrolysis of Purple Guinea Grass pretreated with lime" that I would like to submit for publishing as a full paper in the Biomass and Bioenergy.

This manuscript compares an efficiency of dilute sulfuric acid and lime pretreatment methods, which generate low amount of inhibitors against growth and ethanol fermentation ability of subsequent utilized ethanol-fermenting microorganisms, on cellulase susceptibility improvement of pretreated sugarcane leaves. And also ethanol yield obtained after cellulase hydrolysis of the pretreated sugarcane leaves in the presence and absence of pretreatment hydrolysate were compared.

We hope for your kind considerations.

Dr. Ancharida Akaracharanya

Department of Microbiology,

Faculty of Science, Chulalongkorn University,

Bangkok 10330, Thailand

Email: sanchari@chula.ac.th

## \*Highlights

### Highlights

> Ethanol yield and pretreatment method for purple guinea grass were determined. >Cellulase hydrolysis of lime pretreated purple guinea grass liberated higher glucose than dilute sulfuric acid pretreated. >Ethanol fermentation of the lime pretreated purple guinea grass via separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) method using *S.cerevisiae* yielded 0.21 g ethanol/g cellulose after 48h and 0.18 g ethanol/ g cellulose after 96h, respectively, in flask scale. >The ethanol yield via SHF method increased to 0.24/ g ethanol/ g cellulose after 9h in 5L fermentor scale.

1 **Ethanol production from enzymatic hydrolysis of Purple Guinea Grass pretreated with**  
2 **lime**

3  
4 Suwaphat Ratsamee<sup>a</sup>, Ancharida Akaracharanya<sup>a\*</sup>, Natchanun Leepipatpiboon<sup>b</sup>, Teerapatr Srinorakutara<sup>c</sup>,  
5 Vichien Kitpreechavanich<sup>d</sup>, Vasana Tolieng<sup>e</sup>

6  
7 <sup>a</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan,  
8 Bangkok 10330, Thailand

9 <sup>b</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Pathumwan,  
10 Bangkok 10330, Thailand

11 <sup>c</sup>Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Klong 5, Klong Luang, Pathumthani 12120,  
12 Thailand

13 <sup>d</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, 50 Paholothin Road, Bangkok 10900,  
14 Thailand.

15 <sup>e</sup>Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road,  
16 Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

17  
18 \*Corresponding author: Phone: + 66-2-2185071; Fax: + 66-2-2527576; E-mail: [sanchari@chula.ac.th](mailto:sanchari@chula.ac.th)

19

20 **Abstract**

21 Dilute sulfuric acid or calcium hydroxide at 121°C, 103.4 kPa was used to pretreat purple guinea grass  
22 to compare their efficiency on cellulose digestibility improvement. Cellulase hydrolysis of the purple guinea  
23 grass pretreated with dilute sulfuric acid at optimized conditions (6% (w/v) in 3% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min)  
24 yielded reducing sugars slightly higher than those pretreated with calcium hydroxide at optimized conditions  
25 (6% (w/v) in 4% (w/v) Ca(OH)<sub>2</sub> for 5 min). But glucose released from the purple guinea grass pretreated with  
26 calcium hydroxide was slightly higher than those pretreated with dilute sulfuric acid.

27 Ethanol fermentation via separate hydrolysis and fermentation (SHF) process using *Saccharomyces*  
28 *cerevisiae* of purple guinea grass pretreated with calcium hydroxide, then hydrolysed with commercial cellulase  
29 (9 PFU/g, dry wt.) for 6 h yielded ethanol 0.44 g/g glucose or 0.21 g/g cellulose within 48 h, while via  
30 simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process yielded ethanol 0.18 g/g cellulose within 96 h.  
31 Ethanol yield of the SHF process increased to 0.497 g/g glucose or 0.24 g/g cellulose when the fermentation  
32 was performed in 5 l fermentor.

33

34 Keywords: Purple guinea grass, ethanol, pretreatment

35

36

37 **1. Introduction**

38 Thailand currently produces approximately 387 million liters per year of ethanol fuel from molasses  
39 and cassava. However, in common with many other countries, because the raw materials are not cheap, the cost  
40 of ethanol fuel production is relatively high compared to current gasoline prices, and so is only economically  
41 viable due to government subsidy. Indeed, about 20% of the ethanol production cost is that of the raw materials  
42 alone. Moreover, the raw materials are often food crops, such as sugar cane, and so their use for bioethanol  
43 production is in direct competition with food crop demands leading to potentially even higher or unstable global  
44 and regional prices in the future. Therefore, research into ethanol production for biofuel in Thailand has focused  
45 upon screening for lower cost and sustainably renewable raw materials, as well as in improved efficiency of their  
46 ethanolic conversion.

47 Lignocellulosic biomass is composed of cellulose and hemicellulose which can be hydrolyzed to the  
48 fermentable sugars, glucose and xylose. Lignocellulosic biomass is one of if not the most abundant source of  
49 fermentable sugars for the ethanol production, is sustainably renewable and can also be very cheap and  
50 ecologically sustainable when including agro-industrial and agricultural wastes [6] (which are not food crops, but  
51 often the waste products or parts of such). However, the gathering cost and volume management are typically a  
52 major disadvantage for this type of waste.

53 Purple guinea grass (*Panicum maximum* cv. TD53) is one of the popular forage plants grown in  
54 Thailand because its leaves are soft, they contain a relatively high protein content (13 - 21% (w/w)), and it grows  
55 well all over the country. Purple guinea grass is a tall (up to 2 m) perennial grass which gives a very high yield  
56 (1.5 - 4.0 tons /rai) for 10 years or longer and is easy to harvest [12]. It is resistant to drought, grows well on a  
57 wide variety of different types of soil and conditions, including being shade tolerant so it can grow under the  
58 shade of trees or bushes [1]. Plantation can be performed, for example, within the empty space of a fully growing  
59 agricultural area, such as parareubber plantation ditches. This character makes purple guinea grass a potentially  
60 ideal low cost, abundant, easy to gather and volume controllable lignocellulosic substrate for ethanol production.

61 Prior to conversion of the lignocellulosic biomass to fermentable sugars, however, it requires  
62 pretreatment to increase the enzymatic digestibility [15]. Chemical pretreatment by alkali, using sodium  
63 hydroxide or calcium hydroxide ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), or by acid, using dilute sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), improves the  
64 accessibility of the cellulose component to cellulase. Acid treatment solubilizes hemicellulose and decreases the  
65 cellulose crystallinity, whilst alkaline treatment causes the structure to swell [15]. In addition, physical  
66 pretreatment, such as cutting, milling or heating, also increases the cellulose digestibility by reducing the

67 substrate particle size (increasing the available surface area) and decreasing the cellulose crystallinity and degree  
68 of polymerization. A combination of chemical and physical pretreatments enhances the cellulose digestibility  
69 even further [11].

70 The enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulases is under end-product negative feedback, in the form  
71 of glucose-mediated inhibition of the enzyme. To reduce this inhibition, the glucose released from the hydrolysis  
72 of cellulose is typically simultaneously fermented to ethanol in a one-stage ethanol production process known as  
73 simultaneous saccharification and fermentation (SSF) [4].

74 The objective of this work was to evaluate the efficacy of dilute  $H_2SO_4$  and  $Ca(OH)_2$ -pretreatments on  
75 the subsequent cellulose digestibility of purple guinea grass and to then compare the resultant ethanol yield from  
76 purple guinea grass obtained by either a two-stage, separate hydrolysis and fermentation (SHF) or the one-stage  
77 SSF process.

78

## 79 2. Materials and methods

### 80 2.1 Purple guinea grass

81 Purple guinea grass (*P. maximum* cv. TD 53) was collected from the Department of Livestock  
82 Development, Ministry of Agricultural, Pakchong district, Nakhon Ratchasima province, Thailand. It was oven-  
83 dried at 70 - 80 °C, cut, Hammer milled to a fine powder and sieved to a 20 - 40 mesh particle size.

84

### 85 2.2 Microorganism

86 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 was obtained from the Thailand Institute of Scientific and  
87 Technological Research (TISTR). A single colony of *S. cerevisiae* grown on yeast peptone dextrose agar  
88 (YPDA; yeast extract 10  $g\ l^{-1}$ , peptone 20  $g\ l^{-1}$ , glucose 20  $g\ l^{-1}$  and agar 15  $g\ l^{-1}$ , pH 4.5) at 30 °C for 24 h, was  
89 inoculated into YPDB (as per YPD without the agar) and incubated at 30 °C (200 rpm) for 24 h, then transferred  
90 at 1% (v/v) to the fresh YPDB and incubated at the same conditions and then used as the inoculum.

91

### 92 2.3 Pretreatment and its optimization

93 Pretreatment comprised of suspending the dried, milled and sieved purple guinea grass particles (20 -  
94 40 mesh size) in the selected concentration of either dilute  $H_2SO_4$  or  $Ca(OH)_2$  solution at the indicated loading  
95 (3, 6 or 8% (w/v) on a dry weight basis (DS)) and autoclaving (heat treatment) at 121°C, 103.4 kPa for the  
96 indicated time. The partial optimization of the pretreatment process was performed via a univariate analysis



97 approach (which assumes no interaction between the factors). First, the concentration of  $H_2SO_4$  (1.0 - 3.5%  
98 (w/v)) or  $Ca(OH)_2$  (1.5 - 3.0% (w/v)) was varied with a 3% (w/v, DS) loading and heat treatment (autoclaving)  
99 for 30 min. The optimal concentration in each case was then selected for all subsequent trials. Next, the substrate  
100 loading was varied (3, 6 or 8% (w/v (DS))) with an autoclaving period of 30 mins and likewise the best loading  
101 level was then selected as optimal for all subsequent trails. However, in the case of the  $Ca(OH)_2$  pretreatment,  
102 variation in the substrate loading was evaluated with a constant substrate: alkali (w/w) ratio. Finally, with the  
103 optimally selected  $H_2SO_4$  or  $Ca(OH)_2$  concentration and substrate loading level, the autoclave time was varied  
104 within 0 – 60 mins, and the optimal time selected.

105 To determine the optimal conditions in each case, the susceptibility of the pretreated purple guinea  
106 grass to cellulase hydrolysis was evaluated, with the highest hydrolysis, as determined by the amount of released  
107 reducing sugars, being selected. To this end, the pretreated purple guinea grass slurry was press-filtered through  
108 a 20 - 40 mesh stainless steel sieve and the resultant filtrate was recentrifuged at 4 °C, 10,000 x g for 10 min to  
109 completely separate the pretreated purple guinea grass particles (and residual  $Ca(OH)_2$  powder) from the  
110 hydrolysate. The pretreated purple guinea grass was resuspended in the separated hydrolysate and the pH  
111 adjusted to 6.0. Cellulase GC 220 containing 6820 FPU/ml (Genencor International, Inc., USA) was added to a  
112 final concentration of 63 FPU/g (DS) and incubated with shaking (120 rpm) at 40 °C for 72 h. After cellulose  
113 digestion the remaining purple guinea grass slurry was removed by press-filtering and centrifugation, as above,  
114 and the harvested supernatant adjusted to pH 7.0 and then analyzed for reducing sugar content (section 2.7). In  
115 addition, for the optimal acid and alkali pretreatment processes, the level of glucose, xylose and potentially  
116 fermentation-inhibitory byproducts (furfural, hydroxymethylfurfural, 4-benzaldehyde, syringaldehyde and  
117 vanillin) in the pretreatment hydrolysate, cleared of purple guinea grass particles, was evaluated (section 2.7).

118

#### 119 2.4 Cellulase hydrolysis of the pretreated purple guinea grass

120 The pretreated purple guinea grass slurry was press-filtered and centrifuged (10,000 x g for 10 min at 4  
121 °C) to remove the hydrolysate, washed with distilled water to completely separate it from the  $Ca(OH)_2$  residues  
122 and was then suspended in 100 mM sodium citrate buffer pH 5.0 at the same volume as the original pretreatment  
123 hydrolysate. Accellerase™ 1000 (265 FPU/ml) (Genencor International, Inc., USA) was added at a dose of 9  
124 FPU/g (DS) and incubated at 50 °C for 72 h. The reaction was press-filtered and centrifuged at 4 °C, 11,292 x g  
125 for 10 min. The harvested supernatant was analyzed for reducing sugars and glucose (section 2.7). The cellulose  
126 digestion was partially optimized by sequential univariate analysis of different enzyme doses (9, 18, 27 and 36

127 FPU/g (DS)) followed by hydrolytic times (6, 12, 18 and 24 hr) to optimize these conditions, in an analogous  
128 manner to that in section 2.3.

129

## 130 2.5 Ethanol fermentation in a laboratory flask scale

### 131 2.5.1 Separate hydrolysis and fermentation (SHF) method

132 Purple guinea grass was pretreated, washed and hydrolyzed by Accellerase™ 1000 (9 FPU/g; DS). The  
133 cellulolytic hydrolysate was sterilized by autoclaving at 110 °C, 68.93 kPa for 10 min and used as fermentation  
134 medium. The *S. cerevisiae* inoculum, prepared as described in section 2.2, was inoculated at 10% (v/v) into the  
135 fermentation medium and incubated at 30 °C without shaking for 72 h under oxygen limited conditions, by  
136 fermenting 40 ml in a 50 ml flask with a gas tight cotton-plug covered tightly with parafilm. After fermentation  
137 and centrifugation, the obtained supernatant was analyzed for ethanol levels by gas chromatography (GC)  
138 (section 2.7). The effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> supplementation of the fermentation broth to 0-30 mM prior to  
139 fermentation, and of the presence or absence of the residual glucose in the YPDB culture of the *S. cerevisiae*  
140 inoculum, on the ethanol yield was determined.

141

### 142 2.5.2 Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) method

143 Purple guinea grass was pretreated, washed with distilled water and suspended in 100 mM sodium  
144 citrate buffer pH 5.0 at the same volume as the original pretreatment hydrolysate. This was then simultaneously  
145 hydrolyzed by Accellerase™ 1000 (9 FPU/g (DS) at 50 °C for 6 h and fermented to ethanol at oxygen limited  
146 condition by *S. cerevisiae* (10% (v/v) initial inoculum). The reaction was press-filtered and centrifuged, and then  
147 the harvested supernatant was analyzed for ethanol levels by GC (section 2.7). The effect of varying the reaction  
148 temperature (25 – 50 °C in 5 °C steps), pH (4.5, 5.0 or 5.5), reaction time (0, 24, 48, 72, 96 and 120), addition of  
149 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to 0-30 mM and the presence or not of the residual glucose in the YPDB culture of the *S. cerevisiae*  
150 inoculum on the resultant ethanol yield were determined sequentially by univariate analysis with starting values  
151 of pH 5.0, 48 hours, 0 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and with residual glucose from the YPD starter inoculum, respectively.

152

## 153 2.6 Ethanol fermentation in a 5 l fermentor

154 Purple guinea grass was pretreated, washed and hydrolyzed by Accellerase™ 1000 as described in  
155 section 2.5.1. The cellulolytic hydrolysate, which was found to contain 12 g/l glucose, was used as fermentation  
156 medium in an *in situ* sterilizable (110 °C, 68.93 kPa, 10 min) 5 l fermentor (B.E. Marubishi, model 10L, Japan).

157 The *S. cerevisiae* inoculum, prepared as described in section 2.2, was centrifuged and the harvested cells  
158 resuspended in fresh YPDB without glucose to the same volume as the original centrifugate and then used as the  
159 starter yeast inoculum at 10% (v/v) for fermentation. Fermentation was performed at 30 °C, with agitation (100  
160 rpm) and without aeration. The pH was controlled at  $4.5 \pm 0.4$  by the addition of 4 N HCL or 5 N NaOH, as  
161 required. A 10% (w/v) antifoaming agent solution (Adecanol LG-805; Asahi Denka Co. Ltd., Japan) was used  
162 for controlling foam. Samples were withdrawn and centrifuged at 4 °C, 7227 x g for 10 min. The harvested  
163 supernatant was then analyzed for ethanol contents by GC (section 2.7).

164

## 165 2.7 Analytical procedures

166 Cellulose, hemicellulose and lignin contents were determined by the Technical Association of Pulp  
167 and Paper Industry method [16]. Reducing sugars were quantified using the Somogyi-Nelson method [14].  
168 Glucose, xylose and pretreatment byproducts (furfural, hydroxymethylfurfural, 4-hydroxybenzaldehyde,  
169 syringaldehyde and vanillin) were analyzed by HPLC (Agilent 1100 Series equipped with quaternary pump,  
170 on-line degasser, autoinjector, on-line thermostat and a refractive index detector using ChemStation software  
171 (Agilent Technology Co. Ltd., USA). Sugars were identified and quantified using an Aminex column HPX-  
172 87P (300 x 7.8 mm) with a Carbo-P micro-guard cartridge (Bio-Rad, USA). The column was maintained at 80  
173 °C and 20 µl of each sample was injected at a time and eluted with Milli-Q filtered water at flow rate of 0.6  
174 ml/min. Glucose was additionally analyzed with a glucose analyzer (YSI Ltd., England). The pretreatment  
175 byproducts were identified and quantified using an Aminex column HPX-87P (300 x 7.8 mm) with Cation H  
176 micro-guard cartridge (Bio-Rad, USA). The column was maintained at 55 °C and 50 µl of each sample was  
177 injected at a time and eluted by 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.6 ml/min.

178

## 179 3. Results and Discussion

### 180 3.1. Raw material composition

181 The purple guinea grass (*Panicum maximum* cv TD53) used in this study was found to be composed of  
182 41.7% (w/w) cellulose, 27.1% (w/w) hemicellulose and 10.4% (w/w) lignin, on a dry weight basis (DS).

183

### 184 3.2. Dilute sulfuric acid pretreatment

185 With respect to acid pretreatment, the susceptibility of purple guinea grass to cellulase hydrolysis  
186 increased with increasing H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrations in the pretreatment from 1% (w/v) to a maximal level with 3%  
187 3% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, with a released reducing sugar level of 163 mg/g (DS). Note however that the numerically  
188 slightly smaller reducing sugar level seen at 2.5% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was not significantly different (Fig. 1). The  
189 amount of released reducing sugar released per gram of purple guinea grass increased when the purple guinea  
190 grass loaded in the pretreatment process was increased from 3 to 6% (w/v, DS), but this then declined  
191 significantly at a substrate loading of 8% (w/v, DS) to the lowest observed level (Fig. 2). Increasing the acid heat  
192 treatment (autoclaving) time from 15 to 30 minutes increased the released reducing sugar yield, but further  
193 increase to 45 and 60 min decreased this slightly (Fig. 3). Thus, from this univariate analysis, the partially  
194 optimized acid pretreatment conditions were selected as a purple guinea grass loading of 6% (w/v, DS)  
195 suspended in 3% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heated at 121°C, 103.4 kPa for 30 min. Under these conditions, 173 mg/g, DS  
196 reducing sugar was released after hydrolysis by cellulase GC220 (63 FPU/g, DS) for 72 h at 50 °C.

197

### 198 3.3. Calcium hydroxide pretreatment

199 With respect to the alkali pretreatment, purple guinea grass, loaded at 3% (w/v, DS), was most  
200 susceptible to cellulase hydrolysis after pretreatment with 2.0% (w/v) Ca(OH)<sub>2</sub> (Fig. 4), which represents a  
201 substrate: Ca(OH)<sub>2</sub> (w/w) ratio of 1.5:1. Maintaining a substrate: Ca(OH)<sub>2</sub> (w/w) ratio of 1.5: 1, the apparent  
202 susceptibility to cellulase hydrolysis of the pretreated purple guinea grass increased when the loading increased  
203 to 6% (w/v; DS), although that observed at 8% (w/v; DS) was essentially the same and statistically not  
204 significantly different to that at 6% (w/v; DS) (Fig. 5).

205 Finally, at a 6% (w/v; DS) loading and a Ca(OH)<sub>2</sub> (w/w) ratio of 1.5:1, the maximum reducing sugar  
206 release occurred after 5 min autoclaving, remained essentially the same at 10 and 15 mins autoclaving and then  
207 decreased significantly (~1.3- to ~2-fold) with increasing autoclave times from 30 to 60 minutes (Fig. 6). That  
208 autoclave periods for the Ca(OH)<sub>2</sub> pretreatment of longer than 15 min lowered the observed saccharification  
209 efficiency is likely to be because the hot alkali conditions dissolves the lignin which then acts to inhibit  
210 cellulose hydrolysis. Thus, from this univariate analysis, the partially optimized alkali pretreatment conditions  
211 were selected as a purple guinea grass loading of 6% (w/v, DS) suspended in 4% (w/v) Ca(OH)<sub>2</sub> and heated at  
212 121°C, 103.4 kPa for 5 min. Under these conditions 110.5 mg/g (DS) reducing sugars were released after  
213 hydrolysis by cellulase GC220 (63 FPU/g, DS) for 72 h., which is ~1.56-fold lower than that obtained by the  
214 partially optimized acid-pretreatment (section 3.2).

215 3.4. Pretreatment sugars and byproducts

216 The hydrolysate obtained after pretreatment of purple guinea grass at the optimized alkali or acid  
217 pretreatment conditions (sections 3.2 and 3.3) was analyzed for the level of furfural, hydroxymethylfurfural, 4-  
218 hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin, which are known to inhibit ethanolic fermentation by *S.*  
219 *cerevisiae*. The concentration of four of the five byproducts was higher in the acid pretreatment than the alkali  
220 pretreatment, with only syringaldehyde being higher in the alkali pretreatment (Table 1). However, in all cases  
221 the levels found were much lower than the concentration required for the effective inhibition of the growth of  
222 and ethanolic fermentation by *S. cerevisiae* [3,8]. In contrast to the alkali pretreatment, the dilute sulfuric acid  
223 pretreatment released fermentable levels of xylose (not by wild type *S. cerevisiae*), and lower but still useful  
224 levels of glucose (Table 1). However, the fermentation of the acid pretreatment hydrolysate was not investigated  
225 here.

226

227 3.5. Cellulase hydrolysis of the pretreated purple guinea grass

228 Dried and milled purple guinea grass particles were pretreated with dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or Ca(OH)<sub>2</sub> at the  
229 respective optimized condition (sections 3.2 and 3.3, respectively), and then the particles were hydrolyzed by  
230 Accellerase™ 1000 (45 FPU/g (DS) for 6 h. The level of glucose released from the Ca(OH)<sub>2</sub>-pretreated purple  
231 guinea grass (11.9 g/l) was slightly (1.18-fold) higher than that released from the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-pretreated samples  
232 (10.1 g/l), and so alkali-pretreatment was chosen for subsequent further optimization.

233 Ca(OH)<sub>2</sub>-pretreated purple guinea grass was then hydrolyzed by various dose of Accellerase™ 1000  
234 (9, 18, 27, 36 FPU/g (DS) at 50 °C, pH 5.0 for 6 h. The maximum level of released glucose (13.1 mg/ml;  
235 218.3 mg/g, DS) was obtained using 27 FPU/ g (DS) of enzyme, but the highest glucose liberation efficiency  
236 of the enzyme (11.2 mg glucose/ FPU) was obtained with an enzyme dose of 9 FPU/g (DS), being 1.9-fold  
237 higher than the next best enzyme dose (Table 2). With respect to the reaction time, hydrolysis of the Ca(OH)<sub>2</sub>-  
238 pretreated purple guinea grass by Accellerase™ 1000 at the optimized dose of 9 FPU/g (DS) released a  
239 maximum glucose level (213.3 mg/g, DS) after 12 h, but the glucose liberation rate was highest (99.2 mg  
240 glucose/h) during the first 6 hours of hydrolysis, declining 1.86- and 2.82-fold by 12 and 18 hours,  
241 respectively (Table 3). To reduce the risk of glucose loss due to contamination during the cellulase hydrolysis,

242 the optimal time for cellulose digestion of the  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -pretreated purple guinea grass was chosen as 6 h.  
243 Under these conditions, the hydrolysate obtained contained 11.9 g/l glucose.

244

### 245 3.6. Ethanol fermentation in flask scale

#### 246 3.6.1. Separate hydrolysis and fermentation (SHF)

247 The hydrolysate obtained after cellulase hydrolysis, which contained 11.9 mg/l glucose (section 3.5),  
248 was used as the substrate for ethanolic fermentation by *S. cerevisiae* (initial inoculum of 10% (v/v)) for 72 h.  
249 The level of ethanol produced in the fermentation broth was analyzed every 12 h, revealing a maximum  
250 ethanol level (5.9 g/l) at 48 h (data not shown). Supplementation of the hydrolysate with 30 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
251 did not increase the ethanol yield (data not shown), whilst avoiding the introduction of the residual glucose in  
252 the yeast inoculum by exchanging the YPDB for glucose free, YPDB-G, reduced the ethanol yield obtained  
253 1.13-fold to 5.24 g/l (equivalent to 0.44 g ethanol/g glucose or 0.21 g ethanol/g cellulose).

254

#### 255 3.6.2. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

256 The partial optimization of the SSF of the  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -pretreated purple guinea grass was attained by the  
257 sequential univariate analysis of the optimal fermentation temperature, pH and fermentation period (section  
258 2.5.2). With respect to temperature and pH, the maximum ethanol yield (3.85 g/l) was produced at 30 °C, pH 5.0  
259 (data not shown), and this increased to 4.65 g/l when the fermentation period was prolonged to 96 h onwards  
260 (Fig. 7). Supplementation of the hydrolysate with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  up to 30 mM did not significantly alter the ethanol  
261 yield (data not shown), whilst avoidance of addition of residual glucose from the YPDB media of the yeast  
262 inoculum by using yeast resuspended in YPDB-G media decreased the ethanol yield ~1.04-fold to 4.45 g/l.  
263 However, the cellulase hydrolysis and ethanol fermentation in this SSF process may not have been performed at  
264 the optimal condition [13], and so may well represent a lower and non-optimal ethanol yield.

265

### 266 3.7. Ethanol fermentation in a 5 l fermentor

267 Purple guinea grass loaded at 6% (w/v; DS) was pretreated by  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  at the partially optimized  
268 conditions (section 3.3) and then further hydrolyzed with Accellerase<sup>TM</sup>1000 at 9 FPU/g (DS) for 6 h. The  
269 hydrolysate obtained after cellulase hydrolysis, which was found to contain 12.0 g/l glucose, was used as

270 substrate for ethanol fermentation in an *in situ* sterilizable 5 l fermentor. *S. cerevisiae*, resuspended in glucose  
271 free, YPDB-G, was used as the inoculum at 10% (v/v). Under these conditions the maximum ethanol yield (5.92  
272 g/l; equivalent to 0.497 g ethanol/g glucose or 0.24 g ethanol/g cellulose) was produced after 9 h of fermentation,  
273 and declined slightly to an almost stable level at 12 hours onwards (Fig. 8).

274 The theoretical ethanol production yield from glucose is 0.51 g ethanol/g glucose. Depending on the  
275 feedstock and process the actual yield obtained can vary from 60% to 90% of the theoretical yield [9]. The  
276 ethanol production yields (g ethanol/g glucose) in this report were 0.44 (flask scale) and 0.49 (5 l fermentor),  
277 which are 86% (flask scale) and 96% (5 l fermentor) of the theoretical yields, respectively. The ethanol  
278 production yield of purple guinea grass obtained here (0.497 g/g glucose) was higher than that reported for sweet  
279 sorghum (0.40 g/g glucose) [7], corncob (0.48 g/g glucose) [2] and *Prosopis juliflora* (0.49 g/g glucose) [5].  
280 However, the pretreatment process for *P. juliflora*, a hardwood substrate, is very complicated. It is likely that the  
281 ethanol yield from purple guinea grass in this method reported here could be improved by maximization of the  
282 glucose liberation of the cellulase hydrolysis via optimization of the endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase ratio in  
283 the cellulase, Accellerase™ 1000.

284 In summary a schematic diagram of the experiments and their ethanol yield are shown in Fig. 9.

285

#### 286 4. Conclusion

287 The optimal acid and alkali pretreatment conditions using dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and Ca(OH)<sub>2</sub> which maximized  
288 the susceptibility to cellulase hydrolysis of purple guinea grass residue were 3.0% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6% (w/v; DS)  
289 substrate loading and a 30 min autoclaving period for acid pretreatment, and a 1.5 g (DS)/g Ca(OH)<sub>2</sub>, 6% (w/v)  
290 substrate loading and 5 min autoclaving period for the alkali pretreatment. Purple guinea grass pretreated with  
291 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or Ca(OH)<sub>2</sub> under the above conditions, then hydrolyzed by Accellerase™ 1000 (9 FPU/g (DS) at 50 °C,  
292 pH 5.0 for 6 hours) released slightly (1.03-fold) more reducing sugar when acid pretreated (261 mg/g; DS) than  
293 when alkali pretreated (254 mg/g; DS), respectively. However, the level of released glucose was significantly  
294 different, being 1.18-fold higher in the alkali pretreatment (198.3 mg/g; DS) than with the acid pretreatment  
295 (168.3 mg/g; DS). Thus, Ca(OH)<sub>2</sub> pretreatment (5 min), which was faster, resulted in a higher efficiency at  
296 making purple guineas grass susceptible to cellulase hydrolysis than sulfuric acid pretreatment.

297 Cellulase hydrolysis of the Ca(OH)<sub>2</sub>-pretreated purple guinea by Accellerase™ 1000 (9 FPU/g, DS) for 6  
298 hours liberated 11.9 g/l glucose in hydrolysate.

299 Fermentation of the hydrolysate to ethanol, by the SHF approach using *S. cerevisiae* yielded 5.24 g/l of  
300 ethanol (equivalent to 0.44 g ethanol/g glucose or 0.21 g ethanol/g cellulose) after 48 hours. In contrast, the SSF  
301 of the Ca(OH)<sub>2</sub> pretreated purple guinea grass with Accellerase™ 1000 (9 FPU/g (DS)) and *S. cerevisiae*  
302 yielded only 4.45 g/l (0.18 g ethanol/g cellulose) after 96 hours, a 1.18-fold lower yield in twice the time.  
303 Scaling up of the SHF process to a 5 l fermentor (100 rpm agitation without aeration) resulted in a 1.13-fold  
304 increase in the ethanol yield to 5.92 g/l (0.497 g ethanol/g glucose or 0.24 g ethanol/g cellulose) after only 9  
305 hours of fermentation.

306

### 307 **Acknowledgements**

308 The authors thank Dr. Robert Butcher for critical reading of this manuscript. This study was financially  
309 supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand,  
310 Office of the Higher Education Commission (EN275B); the Thai Government Stimulus Package (TKK 2555)  
311 (under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovation Food, Health Products and  
312 Agriculture); the Ratchadapisek Somphot Endowment Fund (AG 001B) Chulalongkorn University; Graduate  
313 Scholarship to Commemorate the 72<sup>nd</sup> Anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadaj; and the Thailand  
314 Institute of Scientific and Technological Research (TISTR)

315



316 **References**

- 317 [1] Cameron AG, Lemcke B. Guinea Grass. Northern Territory Government 2008;E29:1-3.
- 318 [2] Chen M, Xia L, Xue P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic  
319 hydrolysate. Int Biodeterior Biodegrad 2007;59:85-89.
- 320 [3] Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol  
321 fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and  
322 *Candida shehatae*. Enz Microb Tech 1996;19:220-225.
- 323 [4] Ghosh P, Pamment NB, Martin WRB. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose:  
324 effect of  $\beta$ -D-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulases. Enz Microb Tech 1982;4:425-430.
- 325 [5] Gupta R, Sharma KK, Kuhad RC. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a  
326 wood substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM  
327 3498. Biores Tech 2009;100:1214-1220.
- 328 [6] Ho NWY, Chen ZD, Brainard A. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective  
329 cofermentation of glucose and xylose. App Environmental Microbiol 1998;64:1852-1859.
- 330 [7] Mamma D, Christakopoulos P, Koullas D, Kekos D, Macris BJ, Koukios E. An alternative approach to  
331 the bioconversion of sweet sorghum carbohydrates to ethanol. Biomass Bioenerg 1995;8:99-103.
- 332 [8] Olsson, L. and Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production.  
333 Enz Microb Tech 1996;18:312-331.
- 334 [9] Onsoy T, Thanonkeo P, Thanonkeo S, Yamada M. Ethanol production from Jerusalem artichoke by  
335 *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. KMITL Sci Tech J 2007;7:55-60.
- 336 [10] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates, II : inhibitors and  
337 mechanisms of inhibition. Biores Tech 2000;74:17-24.
- 338 [11] Ramos LP. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. Quimica  
339 Nova 2003;26:863-871.
- 340 [12] Ria T. Guinea grass. 2001, [http://www.naturia.per.sg/buloh/plants/guinea\\_grass/htm](http://www.naturia.per.sg/buloh/plants/guinea_grass/htm), 2001.
- 341 [13] Saha BC, Cotta MA. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to  
342 ethanol. Biomass and Bioenerg 2008;32:971-977.
- 343 [14] Somogy M. Note on sugar determination. J Biol Chem 1952;195:19-23.

- 344 [15] Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic  
345 materials. *BioRes* 2007;2:707-738.
- 346 [16] TAPPI-Technical Association Pulp and Paper Industry. Test method for determination of alpha-beta  
347 and gamma-cellulose in pulp. 1988.

1 **Table 1** - Pretreatment byproduct and sugar levels in the pretreatment hydrolysate obtained with the optimized  
2 pretreatment condition<sup>a</sup>

3

By products	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mg / g DS)	Ca(OH) <sub>2</sub> (mg / g DS)	MIC <sup>b</sup>
Hydroxymethylfurfural (HMF)	0.124 ± 0.024	ND	1
Furfural	0.303 ± 0.034	ND	1
4-Hydrobenzaldehyde	0.024 ± 0.003	0.010 ± 0.000	0.75
Vanillin	0.035 ± 0.003	0.008 ± 0.000	3
Syringaldehyde	ND	0.017 ± 0.001	0.75
Xylose	71.5 ± 5.9	ND	-
Glucose	23.0 ± 0.1	ND	-

4

5 <sup>a</sup>Data are shown as the mean ± 1 SD and are derived from 3 repeats.

6 <sup>b</sup>MIC = Minimum reported concentration required to inhibit the growth of and ethanolic  
7 fermentation by *S. cerevisiae*

8 ND = Not detected

9

10 **Table 2** - Effect of enzyme dose on the amount of glucose liberated by a 6 hour cellulase hydrolysis of  
11  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -pretreated purple guinea grass<sup>a</sup>.

12

Enzyme (FPU / g; DS) <sup>b</sup>	Glucose (mg / ml)	Glucose (mg / unit)
9	11.9 ± 0.2	11.2 ± 0.2
18	12.5 ± 0.1	5.90 ± 0.09
27	13.1 ± 0.3	4.12 ± 0.24
32	12.4 ± 0.1	2.92 ± 0.09

13

14 <sup>a</sup>Data are shown as the mean ± 1 SD, and are derived from 3 repeats

15 <sup>b</sup>Accellerase™ 1000 (265 FPU/ml, 236 pNPG β-glucosidase units/ml)

16

17

18 **Table 3** - Effect of the saccharification time on the glucose liberation rate by cellulase hydrolysis of Ca(OH)<sub>2</sub>-  
19 pretreated purple guinea grass<sup>a</sup>.

Enzyme (FPU/g DS) <sup>b</sup>	6 h	12 h	18 h
	Glucose (mg/h)	Glucose (mg/h)	Glucose (mg/h)
9	99.2 ± 0.2	53.3 ± 0.4	35.1 ± 0.2

21

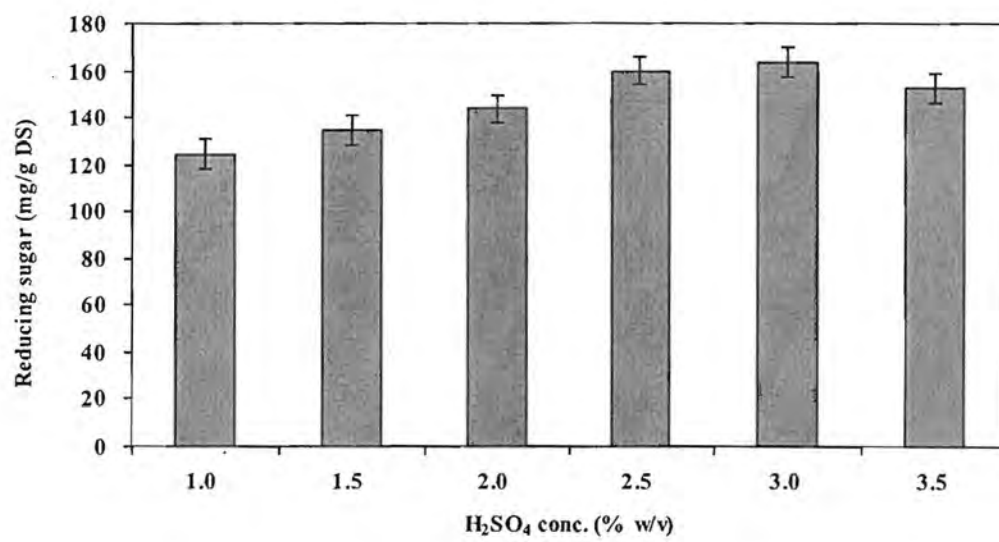
22 <sup>a</sup>Data are shown as the mean ± 1 SD, and are derived from 3 repeats

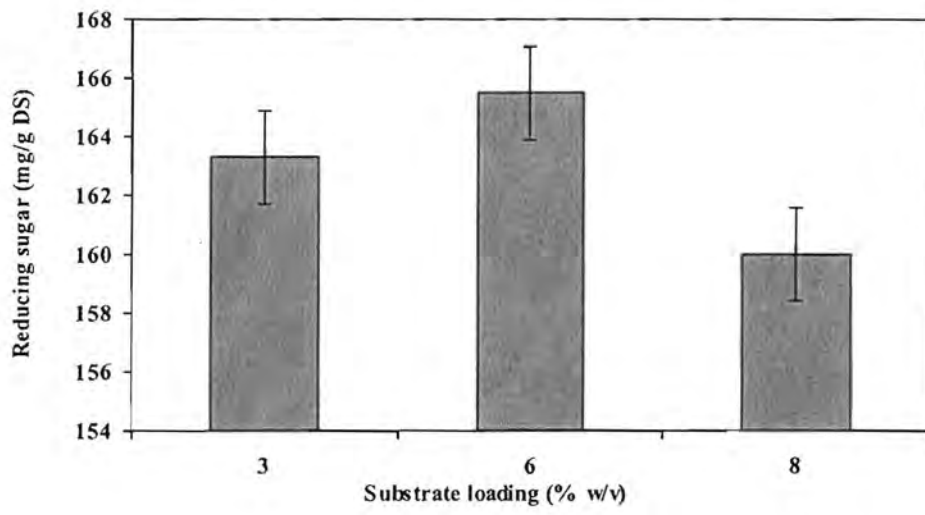
23 <sup>b</sup>Accellerase™ 1000 (265 FPU/ml, 236 pNPG β-glucosidase units/ml)

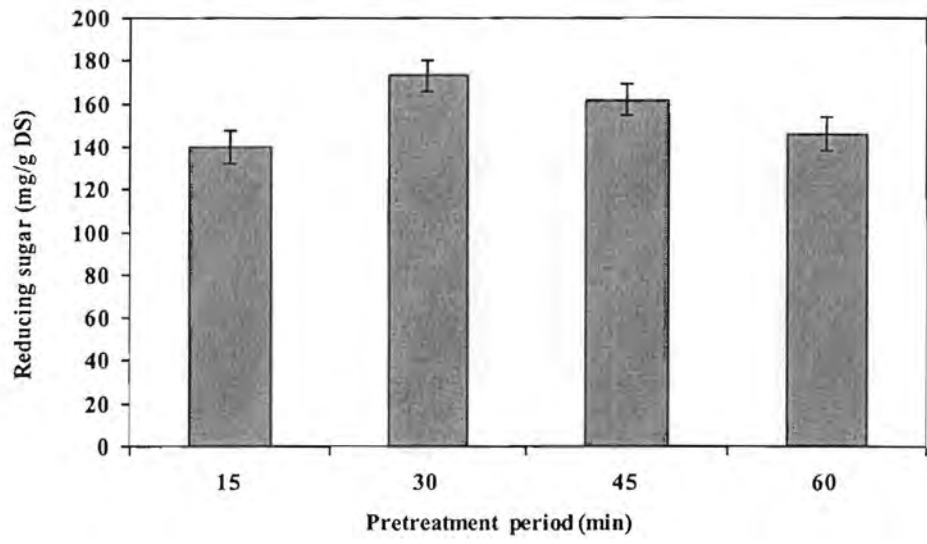
24

25

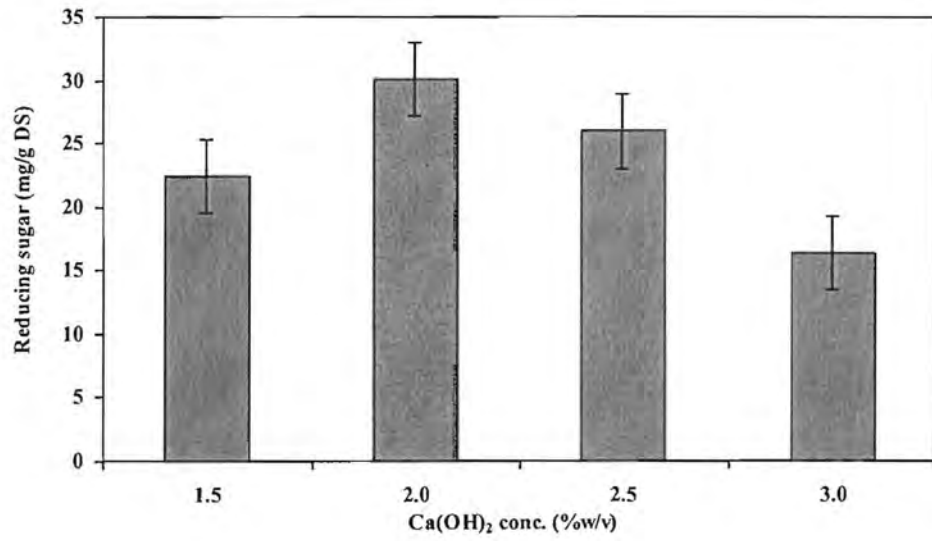
Figure

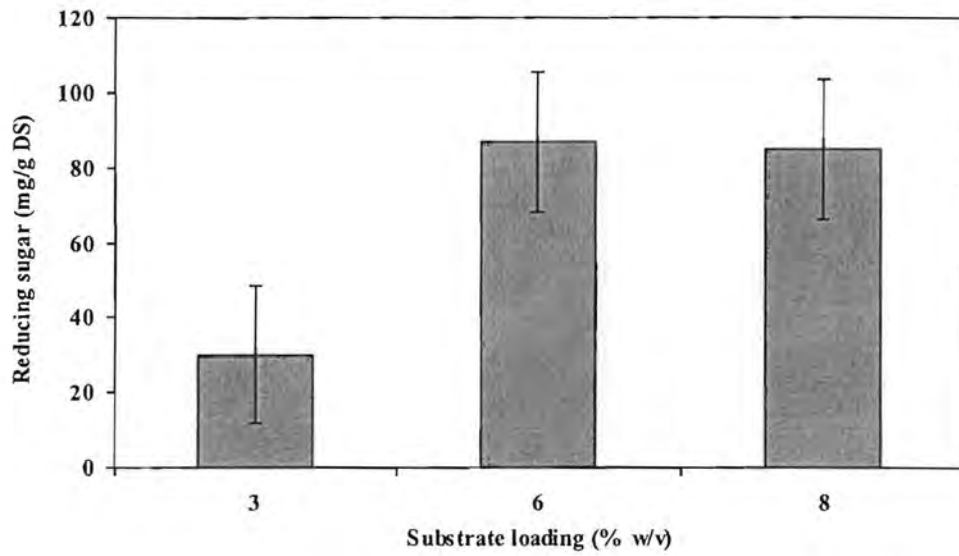


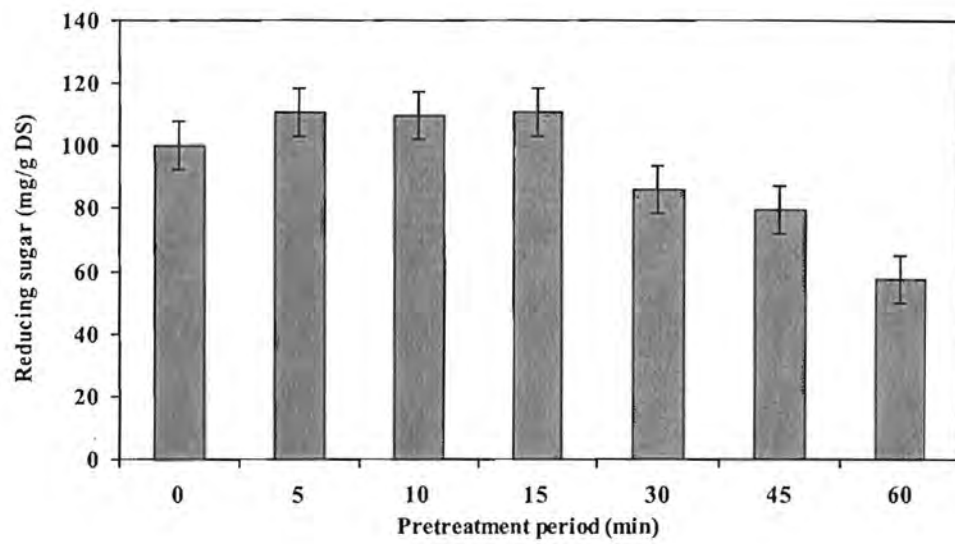


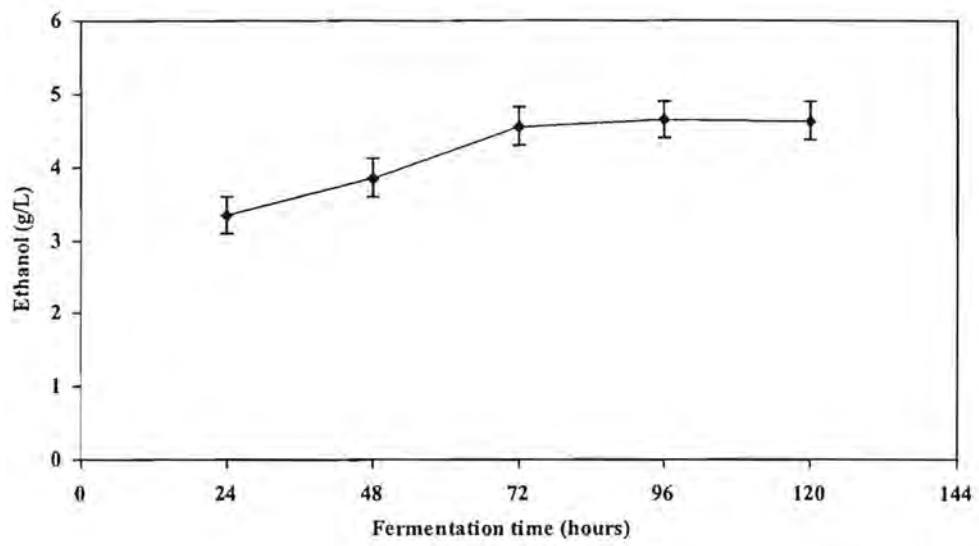


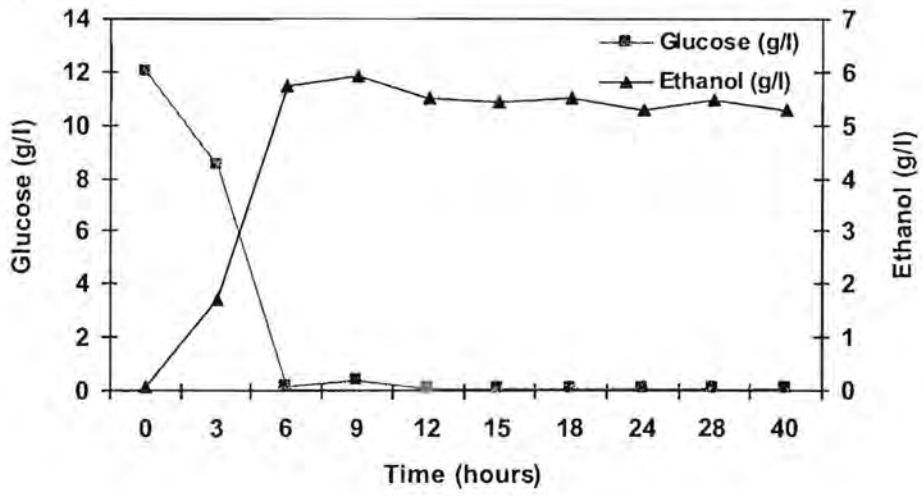


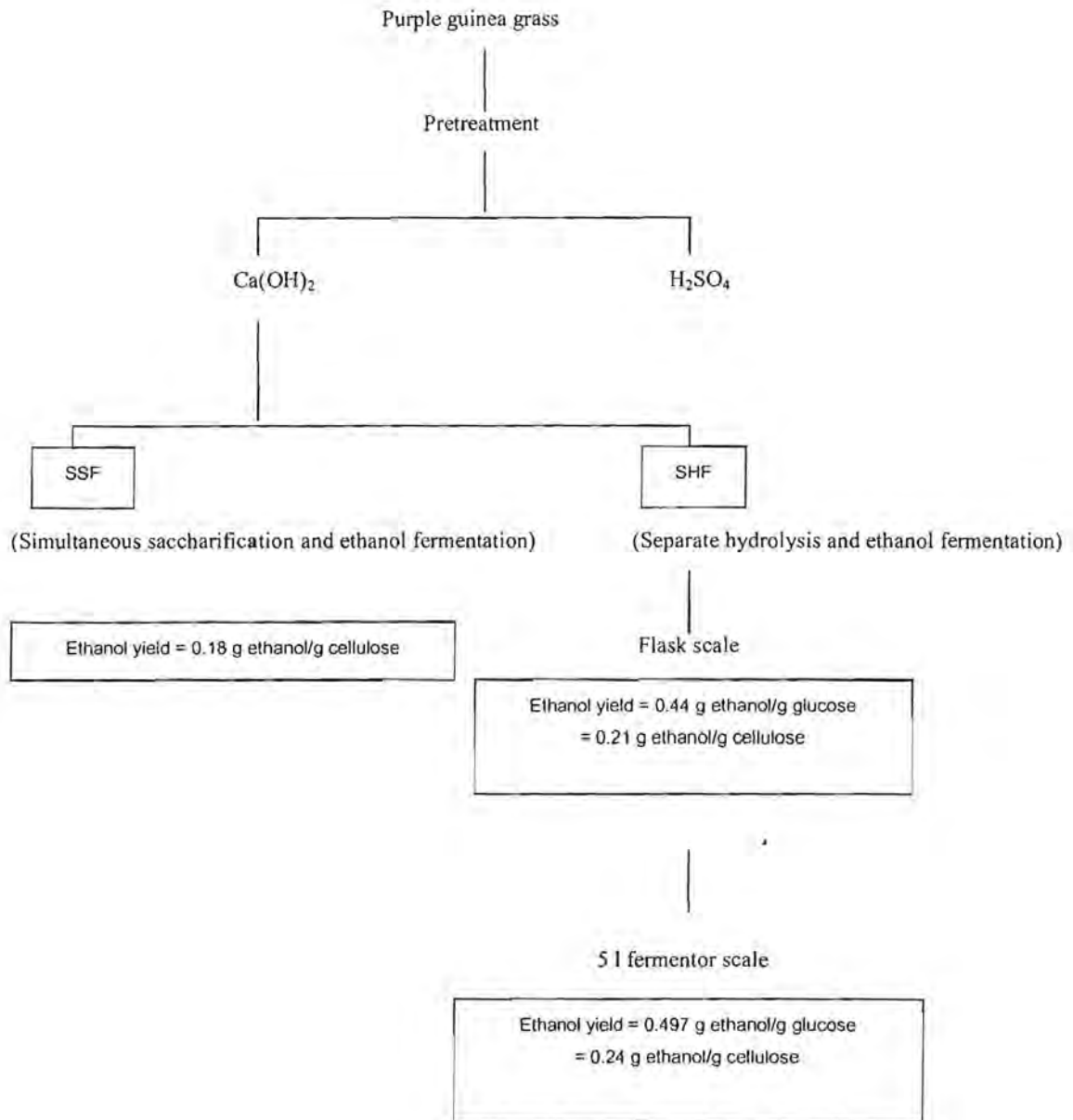












**Fig. 1 -** Effect of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pretreatment concentration on the subsequent susceptibility to cellulase hydrolysis. Purple guinea grass (3% (w/v, DS)) was pretreated with the indicated concentration of sulfuric acid for 30 mins at 121 °C, and then subjected to cellulase hydrolysis (63 FPU/g for 72 h at 50 °C) prior to determining the reducing sugar level. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments.

**Fig. 2 -** Effect of purple guinea grass loading level in the pretreatment process on the subsequent susceptibility to cellulase hydrolysis. Purple guinea grass was loaded at the indicated levels in 3% (w/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , autoclaved at 121 °C for 30 mins and then subjected to cellulase hydrolysis (63 FPU/g for 72 h at 50 °C) prior to determining the reducing sugar level. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments.

**Fig. 3 -** Effect of the pretreatment period on the subsequent susceptibility to cellulase hydrolysis. Purple guinea grass (6% (w/v, DS)) was pretreated in 3% (w/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at 121 °C for the indicated times and then subjected to cellulase (63 FPU/g for 72 h at 50 °C) prior to determining the reducing sugar level. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments.

**Fig. 4 -** Effect of the  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  pretreatment concentration on the subsequent susceptibility to cellulase hydrolysis. Purple guinea grass (3% (w/v, DS)) was pretreated with the indicated concentrations of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  at 121 °C for 30 min and then subjected to cellulase hydrolysis. (63 FPU/g for 72 h at 50 °C) prior to determining the reducing sugar level. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments.

**Fig. 5 -** Effect of the purple guinea grass loading level in the alkali pretreatment process on the subsequent susceptibility to cellulase hydrolysis. Purple guinea grass was pretreated by  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  at 1.5g/g  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  at 121 °C for 30 mins and then subjected to cellulase hydrolysis (63 FPU/g for 72 h at 50 °C) prior to determination of the reducing sugar level. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments.

**Fig. 6** - Effect of the alkali pretreatment period on the subsequent susceptibility to cellulase hydrolysis. Purple guinea grass (6% (w/v, DS)) was pretreated by  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  at 1.5g/g  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  at 121 °C for the indicated time periods and subsequently subjected to cellulase hydrolysis (63 FPU/g for 72 h at 50 °C) prior to determination of the reducing sugar level. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments.

**Fig. 7** - Time course of ethanol production at 30 °C, pH 5.0 by the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments.

**Fig. 8** - Separate hydrolysis and ethanol fermentation (SSF) of purple guinea grass in a 5 l fermentor. The data are displayed as the mean  $\pm$  1SD, and are derived from triplicate experiments.

**Fig. 9** - Ethanol production yield of each experimental step