รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

อุบัติการณ์และแนวทางเพื่อนำไปสู่การควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงของประเทศไทย

Incidence and Strategies for Controlling Lactic Acid Bacteria Contamination in Thailand Industrial Fuel Ethanol Production

ศิริโฉม ทุ่งเก้า

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้เงินอุดหนุนจากรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 176119
สัญญาเลขที่ 48/2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

อุบัติการณ์และแนวทางเพื่อนำไปสู่การควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงของประเทศไทย

Incidence and Strategies for Controlling Lactic Acid Bacteria Contamination in Thailand Industrial Fuel Ethanol Production

ปีที่ 1

ศิริโฉม ทุ่งเก้า

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มีนาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้เงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 48/2557 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความสนับสนุนด้านห้องปฏิบัติการ เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์สำหรับการวิจัย และขอบคุณโรงงานผลิตเอทานอลทั้ง 4 แห่งที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ศึกษาการปนเปื้อนแบคทีเรียกรดแลคติกของโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบจำนวน 4 แห่ง โดยนำตัวอย่างจากขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ กากน้ำตาลเข้มข้น สารอาหารเพิ่มเติม กากน้ำตาลที่ใช้เลี้ยงยีสต์ กากน้ำตาลจากท่อผสม กากน้ำตาลจากถังหมัก และน้ำหมักก่อนการกลั่น รวมทั้งสิ้น 67 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนสิงหาคม 2556 ถึงเดือนมิถุนายน 2557 ทำการแยกเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่เติม cycloheximide 100 mg/l พบว่าทุกโรงงานมีแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนในทุกจุดที่เก็บตัวอย่าง โดยมีปริมาณอยู่ในช่วงประมาณ 5-8 log cfu/ml ยกเว้นในกากน้ำตาลเข้มข้นที่พบน้อยกว่า 0.5 log cfu/ml และสามารถรวบรวมโคโลนีที่พบมากได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL พบว่าอยู่ใน 2 จีนัส ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* โดยไอโซเลตร้อยละ 88 เป็นจีนัส *Lactobacillus* สปีชีส์ของ *Lactobacillus* ที่พบ ได้แก่ *L. plantarum 1, L. pentosus, L. fermentum 2, L. brevis 1, L. rhamnosus* และ *L. buchneri* โดย *L. pentosus* เป็นสปีชีส์ที่พบได้บ่อยที่สุด และจากการศึกษาซ้ำในบางโรงงานพบการปนเปื้อนในระดับที่ใกล้เคียงกันรวมทั้งพบแบคทีเรียสปีชีส์เดิมด้วย ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าโรงงานผลิตเอทานอลในประเทศไทยที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบมีแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนในระดับค่อนข้างสูงและแพร่กระจายอยู่ในทุกขั้นตอนของกระบวนการหมัก จึงควรมีการศึกษาถึงผลกระทบต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรียเหล่านี้รวมทั้งหาแนวทางในการลดการปนเปื้อนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลต่อไป

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก; การปนเปื้อน; เอทานอล; กากน้ำตาล; ประเทศไทย

Abstract

This research studied the contamination of lactic acid bacteria in the process for ethanol production in four commercial plants employing molasses as the raw material. A total of 67 samples collected were concentrated molasses, additional nutrients, yeast cultivation molasses, molasses in mixing lines, as well as fermentation molasses between August, 2013 to June, 2014. Isolations of lactic acid bacteria were performed by cultivating on MRS agar containing 100 mg/l cycloheximide. It was found that all four ethanol plants were contaminated with lactic acid bacteria in a range of ca.5-8 log cfu/ml except the molasses raw material which contained less than 0.5 log cfu/ml. A total of 26 predominated isolates of lactic acid bacteria were identified using API 50CHL biochemical tests to be in two genera, *Lactobacillus* and *Pediococcus* with *Lactobacillus* accounted for 88 % of total isolates. The species of *Lactobacillus* found were *L. plantarum 1, L. pentosus, L. fermentum 2, L. brevis 1, L. rhamnosus,* and *L. buchneri* with *L. pentosus* being the most common species. Moreover, re-examination in some plants revealed similar numbers and same species of bacteria. The data verify contamination with lactic acid bacteria throughout the processes to produce ethanol from molasses in Thailand. Further studies on effects of contamination on ethanol production as well as strategies for reducing such contamination should be conducted in order to increase the production efficiency.

Keywords : Lactic acid bacteria; Contamination, Ethanol; Molasses, Thailand

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ i

บทคัดย่อ..... ii

สารบัญ iv

สารบัญตาราง v

สารบัญภาพ vii

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารทีเกี่ยวข้อง 4

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 24

บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 32

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล 57

เอกสารอ้างอิง 64

ภาคผนวก..... 67

-ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 68

-ภาคผนวก ข การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ API 50CHL..... 70

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เปรียบเทียบเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบแป้งและน้ำตาล 13
2 ลักษณะเด่นของเทคโนโลนีการผลิตเอทานอลที่ใช้ในประเทศไทย 14
3 รายชื่อโรงงานผลิตเอทานอลของไทยและกำลังการผลิต 15
4 วันที่เก็บตัวอย่างและจำนวนตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้ .....
ในการศึกษา 33
5 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก .....
โรงงานผลิตเอทานอล PK1 ครั้งที่ 1 37
6 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล .....
PK1 ครั้งที่ 1 38
7 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก .....
โรงงานผลิตเอทานอล PK1 ครั้งที่ 2 39
8 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล .....
PK1 ครั้งที่ 2 40
9 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก .....
โรงงานผลิตเอทานอล KL 41
10 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล KL... 42
11 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก .....
โรงงานผลิตเอทานอล PK2 43
12 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงาน .....
ผลิตเอทานอล PK2 45
13 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก .....
โรงงานผลิตเอทานอล DC ครั้งที่ 1 47
14 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล .....
DC ครั้งที่ 1 48
15 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก .....
โรงงานผลิตเอทานอล DC ครั้งที่ 2 50

สารบัญตาราง (ต่อ)

16 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล .....
DC ครั้งที่ 2 52
17 สรุปปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการผลิตเอทานอล.....
ของโรงงานที่ทำการศึกษา 53
18 จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในโรงงานเอทานอล .....
ที่นำมาศึกษา 54
19 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในโรงงานผลิตเอทานอล .....
โดยใช้ชุดทดสอบ API 50CHL 55

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด 9

2 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล 10

3 ขวดบรรจุตัวอย่างกากน้ำตาลจากถังหมักของโรงงานเอทานอลที่ใช้ในการศึกษา 32

4 ลักษณะเซลล์ยีสต์ (ลูกศรสีดำ) และเซลล์แบคทีเรีย (ลูกศรสีขาว) ที่พบใน ……..
กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ ถังหมักเอทานอล และถังน้ำหมักก่อนกลั่น เมื่อ ……..
ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า …… 34

5 โคโลนีแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงงานเอทานอลที่ศึกษา เมื่อนำมาแยกเชื้อบน ……..
MRS agar ที่มี cycloheximide เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และบ่มนาน 48 ชั่วโมง ..35

6 การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมาก .....
ในโรงงาน เอทานอล PK2 (กำลังขยาย 1,000 เท่า) …… 44

7 การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมาก .....
ในโรงงานเอทานอล DC ครั้งที่ 1 (กำลังขยาย 1,000 เท่า) …… 47

8 การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมาก .....
ในโรงงานเอทานอล DC ครั้งที่ 2 (กำลังขยาย 1,000 เท่า) …… 51

9 ลักษณะของหลอดทดสอบใน API 50CHL หลังเติมเชื้อแบคทีเรีย ……
กรดแลคติกและบ่มนาน 48 ชั่วโมง 70

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนพลังงานจากฟอสซิลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเกือบทั่วโลก โดยเอทานอลดังกล่าวได้จากการหมักวัตถุดิบที่มีน้ำตาลด้วยยีสต์หรือเรียกว่า “เอทานอลชีวภาพ” (bioethanol) จึงมีการขยายการผลิตเอทานอลเพื่อตอบสนองความต้องการในการใช้ ตัวอย่างเช่น ในสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 2000 มีปริมาณการผลิตเอทานอล 1.63 พันล้านแกลลอน และเพิ่มขึ้นเป็น 4.89 ล้านแกลลอนในปี 2006 และในประเทศจีนและอินเดียก็มีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน (Bai, et. al., 2008)

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ได้มีการกำหนดนโยบายเกี่ยวกับการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนเช่นเดียวกัน โดยได้มีการอนุญาตให้จัดตั้งโรงงานผลิตเอทานอลชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ปัจจุบันมีโรงงานที่ดำเนินการผลิตแล้วจำนวนกว่า 21 แห่ง มีกำลังการผลิตเอทานอลรวมกว่า 4 ล้านลิตรต่อวัน โดยวัตถุดิบที่ใช้ ได้แก่ อ้อยและมันสำปะหลัง และกำหนดเป้าหมายการใช้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนเพิ่มขึ้นเป็น 9 ล้านลิตรต่อวัน ภายในปี 2564 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557ก) โดยในแถบเอเชียประเทศไทยนับว่าเป็นตลาดที่สำคัญอันดับ 3 รองจากจีนและอินเดียที่ใช้เอทานอลชีวภาพเพื่อเป็นพลังงานทดแทน (Nguyen, et. al., 2008)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าในปัจจุบันกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจะมีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีเพิ่มมากขึ้น แต่การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลทั่วโลกเนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลดำเนินการในสภาวะไม่ปลอดเชื้อทำให้มีโอกาสมีจุลินทรีย์อื่นสามารถเจริญแข่งขันกับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลได้ จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนนี้จะก่อให้เกิดผลกระทบเชิงลบต่อต้นทุนการผลิตเอทานอล เนื่องจากจะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของยีสต์ต่ำลง หรือบางครั้งอาจทำให้กระบวนการผลิตล้มเหลว เกิดการสูญเสียค่าใช้จ่ายและเวลา จุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนมีทั้งยีสต์ชนิดอื่นและแบคทีเรีย โดยในกลุ่มแบคทีเรียนั้นที่พบได้บ่อย ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถปรับตัวให้เจริญในสภาวะการหมักเอทานอลได้ดี มีรายการการตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนในขั้นตอนต่างๆ ในโรงงานการผลิตเอทานอลทั่วโลกรวมทั้งโรงงานเอทานอลของไทย (ศิริโฉม ทุ่งเก้า, 2554) โดยจีนีสที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Weisella* เป็นต้น (Lushia & Heist, 2005; Heist, 2009)

ด้วยเหตุดังกล่าว จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เหล่านี้เพื่อไม่ให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการหมักโดยใช้วิธีการต่างๆ เช่น การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อถังหมักและอุปกรณ์การผลิตก่อนการหมัก ตลอดจนการเติมสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำหมัก เช่น สารกลุ่ม carbamates, quaternary ammonium compounds และ halogenated phenols รวมถึงการเติมยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เช่น penicillin, virginiamicin และ Kamoran เป็นต้น (de Oliva-Neto & Yokoya, 2001) อย่างไรก็ตาม การที่จะควบคุมจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ สิ่งสำคัญอันดับแรกก็คือการระบุปัญหา กล่าวคือ จะต้องมีองค์ความรู้เรื่องการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเอทานอลทั้งในแง่ของปริมาณเชื้อและชนิดของเชื้อที่พบ ในประเทศไทยแม้ว่าจะมีการจัดตั้งโรงงานผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเพื่อตอบสนองต่อนโยบายด้านการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนของประเทศ แต่ยังมีการศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโดยการลดการปนเปื้อนในกระบวนการหมักจากจุลินทรีย์อื่นไม่มากนัก ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงต้องการสำรวจแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลของประเทศไทย โดยเลือกศึกษาในโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากวัตถุดิบชนิดนี้ใช้มากในการผลิตเอทานอลของไทย ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในอันจะนำไปสู่การแก้ปัญหาและควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมของประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อสำรวจการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพของโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ

ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะนำตัวอย่างจากขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตเอทานอลชีวภาพในโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิต จำนวน 4 แห่ง โดยมีการเก็บตัวอย่างซ้ำในโรงงานบางแห่ง นำตัวอย่างมาแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการเพาะด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการจัดจำแนกเชื้อที่พบมากโดยใช้ชุดทดสอบ API 50CHL

ประโยชน์ที่จะได้รับ

โครงการวิจัยนี้จะทำให้ทราบอุบัติการณ์การปนเปื้อนแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอลชีวภาพของไทย ซึ่งยังมีการศึกษาไม่มากนัก โดยทราบถึงระดับปริมาณเชื้อรวมทั้งสปีชีส์ของ

แบคทีเรียที่พบในปริมาณมาก ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการควบคุมเพื่อลดการปนเปื้อนในกระบวนการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลชีวภาพต่อไป

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. เอทานอล

เอทานอล (ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นสารประกอบที่มีสูตรโมเลกุล C_2H_2OH อาจได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เอทิลีน (ethylene) เป็นสารตั้งต้น หรือได้จากการหมักน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ โดยเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักอาจเรียกว่า เอทานอลชีวภาพ (bioethanol) เอทานอลเป็นสารเคมีที่มีประโยชน์มากชนิดหนึ่ง โดยอาจใช้เป็นตัวทำละลาย ใช้เตรียมสารประกอบเคมีชนิดต่างๆ และใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ ในขณะที่เอทานอลชีวภาพใช้ในรูปของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ รวมทั้งใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับยานพาหนะซึ่งเรียกว่าเอทานอลเชื้อเพลิง (fuel ethanol)

การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงเริ่มต้นมานานแล้ว มีบันทึกว่าในปี 1826 ชาวอเมริกันได้ทดลองเติมเครื่องยนต์ด้วยเอทานอล และในปี 1908 บริษัทฟอร์ดได้ผลิตรถยนต์ต้นแบบที่ขับเคลื่อนด้วยเอทานอล ในปี 1925 ประเทศบราซิล ฝรั่งเศสและเยอรมนีเริ่มจำหน่ายน้ำมันเบนซินที่ผสมเอทานอล อย่างไรก็ตามการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในระยะนั้นก็ไม่สามารถแข่งขันด้านราคากับเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมได้ จนกระทั่งเกิดปัญหาวิกฤติการขาดแคลนน้ำมันดิบทำให้การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงทดแทนเริ่มมีความเป็นไปได้มากขึ้น ส่งผลให้รัฐบาลบราซิลประกาศแผน “Pro-alcohol” ขึ้นในปี 1975 เพื่อส่งเสริมการผลิตและการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกสำหรับเครื่องยนต์โดยกำหนดให้น้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ต้องมีเอทานอลผสมอยู่อย่างน้อย 10 % รวมทั้งสนับสนุนให้ใช้ hydrous ethanol (ethanol 96% + น้ำ 4%) แทนน้ำมันเบนซินอีกด้วย (Balat & Balat, 2009) ในสหรัฐอเมริกาก็ได้ประกาศมาตรการทางภาษีพลังงานในปี 1978 โดยยกเว้นการเก็บภาษีน้ำมัน E10 (น้ำมันเบนซินที่มีเอทานอล 10%) และให้เงินกู้สำหรับลงทุนสร้างโรงงานผลิตเอทานอล และผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงในรูป E85 (ethanol 85% + gasoline 15%) (Balat & Balat, 2009) ส่งผลให้ปัจจุบันบราซิลและสหรัฐอเมริกาเป็นผู้ผลิตและผู้ใช้เอทานอลชีวภาพรายใหญ่ของโลก

การใช้เอทานอลเพื่อเป็นพลังงานนั้นนอกจากจะมีข้อดีในการเป็นแหล่งพลังงานทดแทนเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมที่กำลังจะหมดไปแล้ว ยังมีข้อดีในด้านสิ่งแวดล้อมอีกด้วย กล่าวคือ ทำให้การเผาไหม้ของเครื่องยนต์สะอาด ลดการปลดปล่อยเขม่าและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ลดความ

เสี่ยงจากปัญหาโลกร้อน นอกจากนั้นยังทำให้เกิดความมั่นคงทางพลังงานของประเทศอีกด้วย การนำเอทานอลมาใช้ในรูปเชื้อเพลิงนั้นอาจใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงหรือนำมาผสมกับน้ำมันเบนซิน ซึ่งเรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (gasohol) หรืออาจผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ (diesohol) เพื่อเป็นสารเพิ่มค่าออกเทน โดยผสมกับน้ำมันเบนซินในสัดส่วน 5-30 % โดยปริมาตร โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ หรือดัดแปลงเพียงเล็กน้อย นอกจากนั้นยังใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนของน้ำมันให้กับเครื่องยนต์ในรูปของ Ethyl tertiary butyl ether (ETBE) สำหรับประเทศไทยการใช้เอทานอลในรูปแก๊สโซฮอลล์เกิดจากแนวพระราชดำริในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวเมื่อปี พ.ศ.2528 โดยโครงการส่วนพระองค์ได้ศึกษาการผลิตแก๊สโซฮอล์เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน โดยผลิตเอทานอลจากอ้อย หลังจากนั้นก็เกิดความตื่นตัวทั้งจากภาครัฐและเอกชนเข้ามาร่วมพัฒนาและนำไปทดสอบกับเครื่องยนต์แต่ยังไม่เกิดการใช้กันอย่างแพร่หลาย จนกระทั่งราคาน้ำมันโลกเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก เมื่อปี พ.ศ.2546 รัฐบาลจึงได้หันมาผลักดันการผลิตและการใช้แก๊สโซฮอล์อย่างจริงจัง โดยได้กำหนดเป้าหมายส่งเสริมการใช้เอทานอล 2.4 ล้านลิตร/วัน จัดทำยุทธศาสตร์การส่งเสริมแก๊สโซฮอล์ขึ้นซึ่งกำหนดให้มีการใช้เอทานอลวันละ 1 ล้านลิตรในปี 2549 เพื่อทดแทนสาร MTBE ในน้ำมันเบนซิน 95 และเพื่อทดแทนเนื้อน้ำมันในน้ำมันเบนซิน 91 ภายในปี 2554 และต่อมาได้ปรับเป้าหมายเพิ่มเป็นวันละ 2.4 ล้านลิตร และในปี 2554 เพิ่มการใช้เอทานอลเป็นวันละ 2.95 ลิตร นอกจากนั้นในแผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี (พ.ศ. 2551-พ.ศ. 2565) ยังได้กำหนดเป้าหมายการใช้เอทานอลเพิ่มขึ้นเป็นวันละ 9 ล้านลิตรในปี 2565 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557ข) โดยเอทานอลที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงนั้นต้องมีความบริสุทธิ์ 95% ขึ้นไป และใช้ใน 3 รูปแบบ ดังนี้

1) เอทานอล 95% ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซล โดยใช้กับเครื่องยนต์ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง
2) เอทานอล 99.5-99.6% นำมาผสมกับน้ำมันเบนซินในสัดส่วน 10% เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ ซึ่งจะช่วยรักษาค่าออกเทนของน้ำมันได้ หรืออาจเติมเอทานอลในสัดส่วนเพิ่มขึ้น เช่น 85% เรียกว่า E85 ซึ่งเป็นน้ำมันที่มีค่าออกเทนสูง โดยรถยนต์ที่ใช้น้ำมันประเภทนี้ได้เครื่องยนต์จะต้องทนต่อการกัดกร่อนได้ดี
3) ใช้เตรียม ethyl tertiary butyl ether (ETBE) ซึ่งเป็นสารเพิ่มค่าออกเทนที่ใช้แทนสาร MTBE ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมลภาวะของอากาศ

2. การผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ด้วยกัน คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และกระบวนการหมัก (fermentation) ปัจจุบันเอทานอลที่ใช้ในรูปของเชื้อเพลิงได้มาจากกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรประเภทที่มีแป้งและ

น้ำตาลโดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ในการผลิต และอาจเรียกเอทานอลที่ได้ว่า “เอทานอลชีวภาพ” หรือ “ไบโอเอทานอล (bioethanol)”

2.1 **จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอทานอล**

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยทั่วไปสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของยีสต์คือค่าพีเอช 3.0-5.0 และอุณหภูมิในช่วง 27-35 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ควรทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้ดีเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลที่สูง นอกจากยีสต์แล้วยังมีความสนใจผลิตเอทานอลจากแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* แต่ปัจจุบันการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียยังอยู่ในขั้นการศึกษาวิจัยเท่านั้นยังไม่มีการผลิตในอุตสาหกรรม (Bai, et. al., 2008)

2.2. **วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล**

วัตถุดิบ (raw material or feedstock) ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ ได้แก่ วัสดุทางการเกษตรที่มีน้ำตาลซูโครส เช่น อ้อยและหัวผักกาดหวาน (sugar beet) และวัตถุดิบที่มีพอลิแซค-คาไรด์ เช่น แป้ง (starch) จากเมล็ดธัญพืชและจากหัวมันสำปะหลัง นอกจากนั้นยังอาจใช้พอลิ-แซคคาไรด์จากลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloses) ซึ่งวัตถุดิบที่มีแป้งและลิกโนเซลลูโลสจะต้องนำมาผ่านการเตรียม (pretreatment) เพื่อย่อยพอลิแซคคาไรด์ให้กลายเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวก่อนจึงจะนำไปใช้หมักเพื่อผลิตเอทานอลได้

1. **วัตถุดิบที่มีซูโครส**

พืชที่เป็นแหล่งของน้ำตาลซูโครสที่นำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ที่สำคัญ ได้แก่ อ้อยและหัวผักกาดหวาน โดยนำมาใช้ทั้งในรูปน้ำหวาน (juice) และของเหลือที่ได้จากการสกัดน้ำตาลซึ่งเรียกว่ากากน้ำตาลหรือโมลาส (molasses) การเลือกใช้พืชให้น้ำตาลชนิดใดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับอุปทาน (supply) ภายในประเทศ เนื่องจากอ้อยเป็นพืชเมืองร้อน ดังนั้นประเทศในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย ปากีสถาน โคลอมเบีย รวมทั้งไทยจึงเลือกใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยใช้ในรูปกากน้ำตาลและน้ำอ้อย สำหรับประเทศในแถบทวีปยุโรปนิยมใช้กากน้ำตาลจากหัวผักกาดหวานในการผลิตเอทานอล นอกจากอ้อยและหัวผักกาดหวานแล้ว ปัจจุบันยังมีความสนใจวัตถุดิบที่มีซูโครสชนิดใหม่ ได้แก่ ข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) ซึ่งเป็นพืชที่ลำต้นมีน้ำหวานที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเหล่านี้มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบประเภทพอลิแซคคาไรด์เนื่องจากสามารถนำไปใช้ในการหมักได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลก่อน

ประเทศบราซิลนับว่าเป็นผู้นำในการใช้เอทานอลชีวภาพที่ผลิตจากอ้อยเป็นพลังงานทดแทน โดยตั้งแต่ปี 1990 กำหนดให้รถยนต์รุ่นใหม่เติมน้ำมันที่ผสมเอทานอล 90 % และสำหรับรถยนต์รุ่นเก่าให้ใช้น้ำมันที่เติมเอทานอล 20-22% (Demain, 2009) และมีการเพิ่มกำลังการผลิตเอทานอลเป็น 3.8 พันล้านแกลลอนในปี 2003-2004 สำหรับประเทศไทยนั้นดังที่กล่าวมาแล้วว่าก็มีนโยบายภาครัฐเกี่ยวกับการใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนสำหรับใช้ในยานพาหนะเช่นเดียวกัน รวมทั้งมีการก่อสร้างโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นวัตถุดิบจำนวนกว่า 10 แห่ง โดยมีกำลังการผลิตเอทานอลรวมกว่า 2 ล้านลิตรต่อปี มีรายงานว่าในปีการผลิตน้ำตาล พ.ศ. 2555/2556 ได้กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ประมาณ 4.6 ล้านตัน (บริษัทไทยชูการ์มิล , 2557) ซึ่งกากน้ำตาลมีราคาถูกกว่าน้ำตาลทรายมาก โดยราคากากน้ำตาลอยู่ในช่วงประมาณ 3 บาทต่อกิโลกรัม จึงทำให้วัตถุดิบชนิดนี้ได้รับความนิยมในการนำมาเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อผลิตเอทานอล

กากน้ำตาลหรือโมลาส (molasses) เป็นผลพลอยได้ (by product) จากการผลิตน้ำตาลทรายเป็นของเหลวที่เหลืออยู่หลังจากตกผลึกน้ำตาลซูโครส แต่ก็ยังมีน้ำตาลเหลืออยู่ในปริมาณสูงรวมทั้งมีแร่ธาตุหลายชนิด เช่น มีรายงานการวิเคราห์องค์ประกอบของกากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยพบว่าประกอบด้วยน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) 40.5 g/l เถ้า 99.7 g/l และมีเกลืออนินทรีย์หลายชนิด เช่น โปตัสเซียม โซเดียม แคลเซยม แมกนีเซียม เหล็กและซัลเฟต เป็นต้น (Kaseno & Kokugan, 1997) กากน้ำตาลมีราคาถูกกว่าน้ำตาลบริสุทธ์มากจึงนิยมใช้เป็นวัตถุดิบ ในการผลิตเอทานอลรวมทั้งผลิตภัณฑ์ชีวภาพอื่น ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย ในทุกๆ 1 ตันของน้ำตาลที่ผลิตได้จะมีผลพลอยได้เป็นกากน้ำตาลประมาณ 190 ลิตร โดยกากน้ำตาลนี้จะมีส่วนประกอบเป็นน้ำตาลที่ใช้หมักได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกซูโครส กลูโคส และฟรุกโทสประมาณ 50-55 % นอกจากนั้นยังมีสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ สำหรับให้ยีสต์ใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอล โดยกากน้ำตาล 1 ตันให้ผลผลิตเอทานอลประมาณ 280 ลิตร

2. วัตถุดิบที่มีแป้ง

แป้ง (starch) เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสจึงสามารถนำไปใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้ วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีแป้งที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้ ได้แก่ ข้าวโพดและข้าวสาลี ซึ่งนิยมใช้ในการผลิตเอทานอลในประเทศแถบอเมริกาเหนือ ในขณะที่ประเทศในเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทยใช้แป้งจากหัวมันสำปะหลัง โดยในประเทศไทยนั้น โรงงานเอทานอลที่ได้รับอนุญาตให้ใช้มันสำปะหลังในรูปมันเส้น มันสด หรือน้ำแป้งเป็นวัตถุดิบในการผลิตมีจำนวน 6 แห่ง รวมกำลังการผลิตเอทานอลประมาณ 1.28 ล้านลิตรต่อปี ในการผลิตเอทานอลจากแป้งจะต้องนำแป้งไปผ่านขั้นตอนการย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนโดยใช้เอนไซม์กลุ่มอะมัยเลส (amylases)

เพื่อให้ยีสต์สามารถนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งขั้นตอนการย่อยแป้งดังกล่าวอาจส่งผลให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

3. วัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลส (lignocelluloses) ประกอบด้วยลิกนิน (lignin) และเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลหลายๆ ชนิด เป็นวัตถุดิบอีกประเภทหนึ่งที่ได้รับความสนใจนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอลโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเภทที่เป็นของเหลือทิ้งจากการเกษตร ซึ่งมีราคาถูกมาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่ซับซ้อนจำเป็นต้องมีขั้นตอนในการย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนการนำไปใช้ ซึ่งขั้นตอนการเตรียมดังกล่าวมีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงส่งผลต่อต้นทุนการผลิตเอทานอลจึงยังไม่มีการนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามในปี 2002 ได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสในระดับโรงงานต้นแบบ (pilot plant) ขึ้นที่ประเทศแคนาดา โดยใช้ฟางข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบปริมาณ 25 ตันต่อสัปดาห์ และได้ผลผลิตเอทานอล 320,000 ลิตรต่อปี (Bai et. al., 2008)

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมสามารถแบ่งออกเป็นขั้นตอนใหญ่ๆ ได้ดังนี้

1. การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก

การเตรียมวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอลขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ ถ้าใช้กากน้ำตาลหรือน้ำหวานจากพืชให้น้ำตาล เช่น อ้อย หัวผักกาดหวาน หรือต้นข้าวฟ่างหวาน จะสามารถนำน้ำหวานมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลตามต้องการและนำไปใช้ได้ทันที ในขณะที่ถ้าเป็นวัตถุดิบประเภทแป้งและลิกโนเซลลูโลสจะต้องนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียม เช่น การลดขนาด การย่อยพอลิเมอร์ให้เป็นน้ำตาลโดยใช้กรดหรือเอนไซม์ก่อน จากนั้นจึงนำน้ำหวานที่ได้ไปปรับความเข้มข้นของน้ำตาลให้เหมาะสมเพื่อใช้ในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์หรือใช้ในการหมักเอทานอลต่อไป

2. การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

หัวเชื้อยีสต์ หรือกล้าเชื้อยีสต์ (yeast starter) ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลเตรียมโดยการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่เลือกใช้ให้ได้ปริมาณเพียงพอในการนำไปใช้ และเซลล์ควรมีความสมบูรณ์รวมทั้งควรมีจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อนน้อยที่สุดเพื่อไม่ให้เกิดผลเสียต่อการผลิตเอทานอล โดยส่วนใหญ่จะเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีสูตรคล้ายคลึงกับที่ใช้ในการหมักและมีการเติมออกซิเจนในรูปของอากาศเพิ่มลงไปเพื่อให้ยีสต์ใช้ในการเจริญเติบโตด้วย

3. การหมักเอทานอล

เทคโนโลยีการหมักเพื่อผลิตเอทานอลนั้นอาจใช้กระบวนการแบบครั้งคราว (batch fermentation) แบบกึ่งครั้งคราว (fed-batch fermentation) หรือแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) ก็ได้ โดยแต่ละแบบก็มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ในระหว่างการหมักยีสต์จะผลิตเอทานอลผ่านทางวิถีไกลโคไลซีส (glycolysis) หรือวิถี Embden-Mayerhof-Panas (EMP) โดยในวิถีดังกล่าวกลูโคส 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต (pyruvate) 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวตจะถูกรีดิวซ์เป็นเอทานอลภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนและมีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการต่อไปนี้

ยีสต์

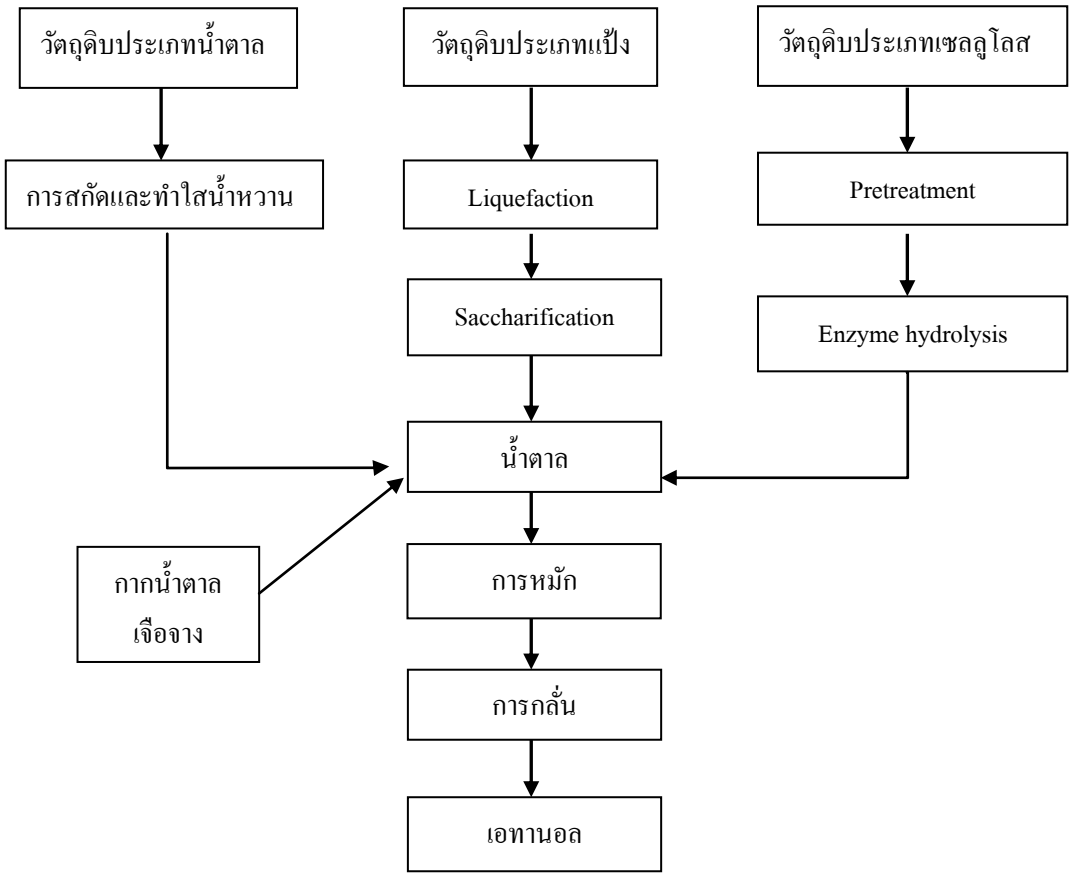
$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\quad 2 \quad} CH_3CH_2OH + 2CO_2$

กลูโคส เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์

ในทางทฤษฎี กลูโคส 100 % จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล 48.9 และ 51.1 % โดยน้ำหนักตามลำดับ และมีการผลิต ATP 2 โมเลกุล ซึ่งยีสต์นำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียคาร์บอนและได้สารประกอบอื่นๆ (by products) เช่น กลีเซอรอล (glycerol) กรดอินทรีย์ และ higher alcohols (Bai, et. al., 2008) รวมทั้งใช้คาร์บอนในการสร้างเซลล์ยีสต์ ทำให้ได้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) เพียงประมาณ 50-90 % ของค่าตามทฤษฎี ในการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมสามารถพัฒนาจนได้ผลผลิตเอทานอลสูงถึง 90-93 % ของค่าตามทฤษฎี เมื่อคำนวณจากน้ำตาลทั้งหมดโดยไม่คิดน้ำตาลที่เหลืออยู่ ซึ่งโดยทั่วไปเมื่อสิ้นสุดการหมักจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักเหลืออยู่ไม่เกิน 2 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทั้งหมดเหลือไม่เกิน 5 กรัมต่อลิตร (Bai, et. al., 2008) ซึ่งถ้าควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสมจะได้เอทานอลความเข้มข้น 10-12% โดยปริมาตร ภายในเวลา 5 วัน (Demain, 2009)

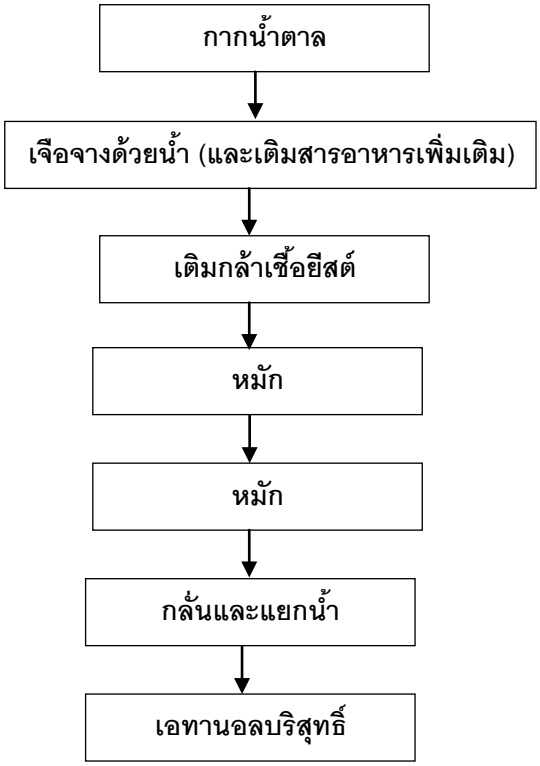
ในระหว่างการหมักยีสต์จะได้รับความเครียด (stress) ทั้งจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การขาดสารอาหาร (nutrient deficiency) อุณหภูมิของถังหมักที่สูงขึ้น ค่าพีเอชของอาหารหมักที่ต่ำลง รวมทั้งการมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่เป็นคู่แข่ง นอกจากนั้นยังมีความเครียดที่เกิดจากกิจกรรมเมตาบอลิซึมของยีสต์เอง เช่น การมีเอทานอลความเข้มข้นสูง ซึ่งส่งผลให้การเจริญของยีสต์และผลผลิตเอทานอลลดลงได้ (Bai, et. al., 2008) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมสภาวะในการหมักให้เหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดผลเสียต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้วในขั้นตอนต่อไปเป็นการทำให้เอทานอลมีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยการนำน้ำหมัก

ไปผ่านการกลั่นและการกำจัดน้ำจนได้เอทานอลเข้มข้น 99 % ขึ้นไป ซึ่งสามารถสรุปขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทต่างๆ ได้ดัง**ภาพที่** 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด
(ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต และคณะ, 2550, หน้า 42)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าการผลิตเอทานอลชีวภาพระดับอุตสาหกรรมของไทยจะใช้กากน้ำตาลและมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลัก โดยมีข้อมูลว่าเอทานอลที่ได้ 1 ลิตร จะใช้กากน้ำตาล 4-6 กิโลกรัม หรือมันสำปะหลัง 5.45-6.5 กิโลกรัม (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557ข) กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลสรุปเป็นแผนภูมิได้ดัง**ภาพที่** 2



ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

เทคโนโลยีการผลิตเอทานอล

ปัจจุบันเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมที่พัฒนาขึ้นใช้แพร่หลายทั่วโลก มีดังต่อไปนี้ (นคร ทิพยาวงศ์, 2553)

1. “BOSTIL” พัฒนาโดยบริษัท Alfa-Laval AB ประเทศสวีเดน โรงงานแรกที่ใช้เทคโนโลยีนี้เป็นโรงงานกลั่นเอทานอลในประเทศออสเตรเลีย ด้วยกำลังการผลิต 12,000 ลิตรต่อวัน และต่อมามีการนำเทคโนโลยีนี้เข้าสู่ประเทศอินเดีย ฝรั่งเศส เยอรมนี บราซิล และปากีสถาน จุดเด่นของเทคโนโลยีนี้คือ ใช้ยีสต์สายพันธุ์พิเศษ *Schizosaccharomyces pombe* ซึ่งสามารถใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูง (40-45 °Brix) ได้ ซึ่งความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงจะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้ ภายหลังการหมักสิ้นสุดลง สารละลายที่ได้จะผ่านเข้าเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงเพื่อแยกครีมยีสต์ออกมา หมุนเวียนกลับเข้าถังหมักใหม่ ทำให้ได้ยีสต์ที่มีการเจริญเต็มที่แล้ว จึงไม่ต้องเติมสารอาหารเข้าในระบบและยังได้ผลผลิตสูง ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลและการกลั่นมีค่าเป็น 91-92 % และ 99 % ตามลำดับ นอกจากนี้ระบบจะใช้ถังหมักเพียงถังเดียว จึงใช้พื้นที่น้อย มีระบบควบคุมอัตโนมัติทำให้ง่ายต่อการควบคุม มีการใช้เครื่องมือน้อยทำให้ต้นทุนต่ำ แต่มีข้อจำกัดคือ

ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ต่ำ มีค่าเพียง 5-7 % โดยปริมาตร เพียงเท่านั้น ทำให้ต้องใช้พลังงานมากในการกลั่นเอทานอล

2. “HIFERM-GR” หรือ “CASCADE” เป็นระบบที่พัฒนาโดยบริษัท Vogelbusch GmbH ประเทศออสเตรีย จุดเด่นของเทคโนโลยีนี้คือประสิทธิภาพในการหมักสูง 90 % ได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง 8.5-9.5 % โดยปริมาตร ทำให้ใช้พลังงานในการกลั่นต่ำ ต้นทุนการผลิตต่ำ ทนต่อเกลือแคลเซียมที่ความเข้มข้นสูงได้และใช้เวลาในการหมักสั้น

3. “HOECHST-UHDE” มีจุดเด่นคือ ยีสต์ที่ใช้เป็นชนิดลอยตัวขึ้น (flocculating yeast) และถังหมักเป็นชนิด Loop reactor ซึ่งทำให้การหมักสิ้นสุดรวดเร็วและรักษาความเข้มข้นของยีสต์ให้สูงสุดตลอดการหมักได้ และได้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ 7.5-8.0 % โดยปริมาตร โรงงานที่ใช้เทคโนโลยีนี้คือ โรงกลั่น Diana ซึ่งเป็นโรงกลั่นขนาดใหญ่ที่ประเทศบราซิล ผลิตได้ 75,000 ลิตรต่อวัน ข้อดีและข้อเสียของระบบนี้จะคล้ายคลึงกับระบบ BIOSTIL

4. “LURGI” พัฒนาโดยบริษัท Lurgi เป็นระบบต่อเนื่องที่ใช้ถังหมัก 6 ถังเรียงกัน ซึ่งภายในมียีสต์ที่ตรึงไว้บน Sodium-alginate หรือ Calcium-alginate จึงทำให้เซลล์เคลื่อนที่ไม่ได้ (immobilized yeast) โดยวัตถุดิบจะไหลเข้าถังหมักใบที่ 1 ความเข้มข้นของเอทานอลจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและน้ำหมักที่ออกจากถังหมักที่ 6 จะเข้าสู่กระบวนการกลั่นต่อไป ยีสต์ในแต่ละถังจะมีการปรับตัวให้เข้ากับความเข้มข้นของเอทานอลที่เปลี่ยนไป ข้อจำกัดของเทคโนโลยีนี้คือ จะต้องมีการเติมสารอาหารให้ยีสต์ในแต่ละถังเจริญเติบโต เนื่องจากสารอาหารบางส่วนจะออกมาพร้อมกับน้ำหมัก และต้องไม่ให้มีซูโครสหรือน้ำตาลอินเวอร์ตออกมาด้วยเนื่องจากจะทำให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้ลดลง

5. “STARCOSA” เป็นระบบการหมักต่อเนื่อง 2 ขั้นตอนที่พัฒนาโดย STARCOSA ประเทศเยอรมนี ที่มีการนำ microfiltration membrane มาใช้เพื่อกำจัดเชื้อปนเปื้อนในวัตถุดิบก่อนเข้าถังหมักแทนการฆ่าเชื้อ รวมทั้งป้องกันไม่ให้เซลล์ยีสต์ออกจากถัง ขั้นตอนแรกเป็นถังที่ใช้เลี้ยงยีสต์เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ ซึ่งจะมีความเข้มข้นของยีสต์สูง ขั้นตอนที่ 2 จะเป็นการหมักเพื่อให้ได้เอทานอล ยีสต์จะหมุนเวียนระหว่าง 2 ถัง จนได้ความเข้มข้นเอทานอล 6.5-8% แต่เทคโนโลยีนี้มีข้อเสียคือต้นทุนสูง (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557) ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของแต่ละเทคโนโลยีเปรียบเทียบไว้ใน**ตารางที่** 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบแป้งและน้ำตาล

ปัจจัย	Batch	Cascade	BIOSTIL	UHDE	LURGI	STARCOSA
ความเข้มข้นยีสต์ (g/l)	3-8	6-10	40-55	50	35-45	120-150
ผลผลิต (% yield)	88-92	90-92	90-92	90-95	85-95	94
ความเข้มข้นเอทานอล (%v/v)	7-9	8-10	5-7	6.5-7.5	8-9	7-8
อัตราการผลิต ($l/m^3/h$)	1.5-7	3-30	7	15-17	12-15	21

ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2557ข)

สำหรับเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลที่ใช้ในโรงงานผลิตเอทานอลของไทยนั้นส่วนใหญ่เป็นเทคโนโลยีของบริษัทจากต่างประเทศ เช่น อินเดีย ฝรั่งเศสและจีน ทั้งนี้เนื่องจากบริษัทเหล่านั้นมีประสบการณ์ในการออกแบบและก่อสร้างโรงงานผลิตเอทานอลรวมทั้งมีราคาการก่อสร้างถูกกว่าของประเทศอื่น ซึ่งลักษณะเด่นของแต่ละเทคโนโลยีที่ใช้ในประเทศไทยแสดงใน **ตารางที่** 2

ตารางที่ 2 ลักษณะเด่นของเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลที่ใช้ในประเทศไทย

ผู้ผลิตเทคโนโลยี	ประเทศ	วัตถุดิบที่ใช้	
		กากน้ำตาล	มันสำปะหลัง
ALFA LAVAL	อินเดีย	-หมักแบบต่อเนื่องแบบถังเดียว (single fermenter continuous) -กลั่นแบบ 2 คอลัมน์แบบ multipressure	-หมักแบบ batch แบบ SSF (simultaneous saccharification and fermentation) -กลั่นแบบหลายคอลัมน์แบบ multipressure
KATZEN	สหรัฐอเมริกา	-หมักแบบ fed-batch แบบ SSF -กลั่นแบบหลายคอลัมน์แบบ multipressure	-หมักแบบ SSF -กลั่นแบบ 2 คอลัมน์แบบ multipressure
MAGUIN	ฝรั่งเศส	-หมักแบบหลายถังต่อเนื่อง (cascade continuous) -กลั่นแบบ 2 คอลัมน์	-หมักแบบหลายถังต่อเนื่อง (cascade continuous) -กลั่นแบบ 2 คอลัมน์
PRAJ	อินเดีย	-หมักแบบต่อเนื่อง (continuous) -กลั่นแบบ 2 คอลัมน์แบบ multipressure	-หมักแบบ continuous แบบ SSF -กลั่นแบบ 2 คอลัมน์แบบ multipressure
SHANDONG	จีน	-หมักแบบหลายถังต่อเนื่อง (cascade continuous) -กลั่นแบบ 2 คอลัมน์แบบ multipressure	-หมักแบบ continuous -กลั่นแบบ 2 คอลัมน์แบบ multipressure

ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2557ข)

3. สถานการณ์การผลิตเอทานอลของประเทศไทย

ปัจจุบันประเทศไทยมีโรงงานผลิตเอทานอลที่เปิดดำเนินการผลิตแล้วจำนวน 21 แห่ง กระจายอยู่ในจังหวัดต่างๆ ในทุกภูมิภาคยกเว้นในภาคใต้ โดยมีกำลังการผลิตที่จดทะเบียนกับกรมสรรพสามิตร 4.79 ล้านลิตรต่อวัน แต่มีกำลังการผลิตติดตั้งจริง 4.19 ล้านลิตรต่อวัน และโรงงานที่อยู่ระหว่างการดำเนินการก่อสร้างอีก 3 แห่ง รวมกำลังการผลิต 1.37 ล้านลิตรต่อวัน ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำอ้อย มันเส้นและมันสด โดยมีโรงงานที่ของอนุญาตใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเพียงชนิดเดียว 10 แห่ง โรงงานที่ใช้มันสำปะหลัง (มันเส้น/มันสด) 6 แห่ง โรงงานที่ใช้ทั้งกากน้ำตาลและมันสำปะหลัง 4 แห่ง และโรงงานที่ใช้น้ำอ้อยอีก 1 แห่ง รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 3

ตารางที่ 3 รายชื่อโรงงานผลิตเอทานอลของไทยและกำลังการผลิต

	ผู้ประกอบการ	จังหวัด	วัตถุดิบ	กำลังการผลิตจดทะเบียนกับกรมสรรพสามิตร (ลิตร/วัน)	กำลังการผลิตติดตั้งจริง (ลิตร/วัน)
วัตถุดิบกากน้ำตาล					
1	บริษัท ไทยอะโกร เอ็นเนอร์ยี่ จำกัด (มหาชน) (ด่านช้าง)	สุพรรณบุรี	กากน้ำตาล	150,000	150,000
2	บริษัท เอกรัฐพัฒนา จำกัด	นครสวรรค์	กากน้ำตาล	230,000	230,000
3	บริษัท น้ำตาลไทยเอทานอล จำกัด	กาญจนบุรี	กากน้ำตาล	200,000	100,000
4	บริษัท มิตรผลไบโอฟูเอล จำกัด (ชัยภูมิ)	ชัยภูมิ	กากน้ำตาล	500,000	500,000
5	บริษัท มิตรผล ไบโอฟูเอล จำกัด (กาฬสินธุ์)	กาฬสินธุ์	กากน้ำตาล	230,000	230,000
6	บริษัท เคไอเอทานอล จำกัด	นครราชสีมา	กากน้ำตาล	100,000	100,000
7	บริษัท ขอนแก่นแอลกอฮอล์ จำกัด	ขอนแก่น	กากน้ำตาล	150,000	150,000
8	บริษัทไทยรุ่งเรืองพลังงาน จำกัด เฟส 1	สระบุรี	กากน้ำตาล	120,000	120,000
9	บริษัท มิตรผลไบโอฟูเอล จำกัด (ด่านช้าง)	สุพรรณบุรี	กากน้ำตาล	200,000	200,000
10	บริษัท ขอนแก่นแอลกอฮอล์ จำกัด (บ่อพลอย)	กาญจนบุรี	กากน้ำตาล	300,000	200,000
11	บริษัท แม่สอดพลังงานสะอาด จำกัด	ตาก	น้ำอ้อย	230,000	230,000
รวม (1)				2,410,000	2,210,000

ตารางที่ 3 (ต่อ)

	ผู้ประกอบการ	จังหวัด	วัตถุดิบ	กำลังการผลิตจดทะเบียนกับกรมสรรพสามิตร (ลิตร/วัน)	กำลังการผลิตติดตั้งจริง (ลิตร/วัน)
วัตถุดิบมันสำปะหลังและกากน้ำตาล					
12	บริษัท ราชบุรีเอทานอล จำกัด	ราชบุรี	มันเส้น/กากน้ำตาล	150,000	150,000
13	บริษัท อี เอส เพาเวอร์ จำกัด	สระแก้ว	มันเส้น/กากน้ำตาล	150,000	150,000
14	บริษัท ไทยแอลกอฮอล์ จำกัด (มหาชน)	นครปฐม	มันเส้น/กากน้ำตาล	200,000	200,000
15	บริษัท ไทยอะโกร เอนเนอยี่ จำกัด (มหาชน) (ด่านช้าง) เฟส 2	สุพรรณบุรี	มันเส้น/กากน้ำตาล	200,000	200,000
รวม (2)				**700,000**	**700,000**
3. โรงงานเอทานอล (วัตถุดิบมันสำปะหลัง)					
บริษัท ทรัพย์ทิพย์ จำกัด		ลพบุรี	มันเส้น	200,000	200,000
บริษัท ไทยเอทานอล พาวเวอร์ จำกัด (มหาชน)		ขอนแก่น	มันสด	130,000	130,000
บริษัท ไท่ผิงเอทานอล จำกัด		สระแก้ว	มันสด	300,000	150,000
บริษัท พี เอส ซี สตาร์ช โปรดักส์ จำกัด (มหาชน)		ชลบุรี	มันสด/มันเส้น	150,000	150,000
บริษัท อี 85 จำกัด		ปราจีนบุรี	มันสด/น้ำแป้ง	500,000	250,000
บริษัท อุบล ไบโอ เอทานอล จำกัด		อุบลราชธานี	มันสด/มันเส้น	400,000	400,000
รวม (3)				**1,680,000**	**1,280,000**
รวมกำลังการผลิต (1) +(2) + (3)				**4,790,000**	**4,190,000**
4. โรงงานเอทานอลที่อยู่ระหว่างดำเนินการก่อสร้าง					
บริษัท ที พี เค เอทานอล จำกัด เฟส 1		นครราชสีมา	มันเส้น	340,000	340,000
บริษัท ที พี เค เอทานอล จำกัด เฟส 2, 3		นครราชสีมา	มันเส้น	680,000	680,000
บริษัท สีมาอินเตอร์โปรดักส์ จำกัด		ฉะเชิงเทรา	มันสด	150,000	150,000
บริษัท อิมเพรสเทคโนโลยี จำกัด		ฉะเชิงเทรา	มันสด/มันเส้น/กากน้ำตาล	200,000	200,000
รวมกำลังการผลิต				**1,370,000**	**1,370,000**

(ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557ก)

มีรายงานสถานการณ์การผลิตเอทานอลของประเทศพบว่าในเดือนตุลาคม 2557 ผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลได้ 58.97 ลิตร โดยใช้กากน้ำตาล 245,921.58 ตัน ผลิตจากอ้อยได้ 5.20 ล้าน

ลิตร โดยใช้อ้อย 69,316 ตัน และผลิตจากมันสำปะหลังได้ 28.84 ล้านลิตร โดยใช้มันสำปะหลัง 180,513.36 ตัน (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557ก)

ตัวอย่างกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

กระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบของโรงงานเอทานอลของไทย ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. **การเตรียมกากน้ำตาล**

เจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 12-16 ºBrix สำหรับใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อเตรียมกล้าเชื้อหรือหัวเชื้อ ซึ่งเรียกว่าขั้น prefermentation และเข้มข้น 30-35 ºBrix สำหรับใช้ในขั้นตอนการหมัก เติมสารอาหาร (diammonium phosphate และ diammonium sulfate) ประมาณ 0.1%

2. **การเตรียมหัวเชื้อยีสต์** (prefermentation)

เติมยีสต์ในรูปยีสต์แห้ง (active dry yeast) ในกากน้ำตาลที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1% w/v บ่มเป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง โดยมีการเติมอากาศเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่ยีสต์เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ จะได้ยีสต์ประมาณ 10^8 cell/ml

3. **การหมัก** (fermentation)

ถ่ายเซลล์ยีสต์จากขั้น prefermentation ลงในถังหมักที่มีกากน้ำตาลเจือจางที่เตรียมไว้ ควบคุมอุณหภูมิที่ 32-34ºซ โดยมีการกวนภายในถังหมักแต่ไม่มีการให้อากาศ เมื่อครบ 6 ชั่วโมง ถ่ายน้ำหมักส่วนหนึ่งลงในถังหมักใบที่ 2 และเติมกากน้ำตาลลงไปเพิ่ม บ่มต่ออีก 6 ชั่วโมง และถ่ายน้ำหมักลงในถังหมักถังต่อไปเป็นลำดับเช่นเดียวกันจนครบ 6 ถัง รวมระยะเวลาการหมักทั้งหมดประมาณ 36 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นเอทานอลประมาณ 8-9% จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้ไปกลั่นและกำจัดน้ำเพื่อให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ต่อไป

4. แบคทีเรียปนเปื้อนกับการผลิตเอทานอล

เนื่องจากการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงมีการดำเนินการผลิตขนาดใหญ่จึงเป็นการยากที่จะควบคุมสภาวะในการผลิตให้ปราศจากเชื้ออื่น ดังนั้นปัญหาการมีแบคทีเรียเจริญร่วมกับยีสต์ที่ใช้ในการผลิตจึงยังคงเป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเนื่องจากส่งผลเสียด้านเศรษฐศาสตร์การผลิต โดยเชื้อปนเปื้อนจะแข่งขันใช้น้ำตาลและสารอาหารกับยีสต์ รวมถึงยับยั้งการเจริญของยีสต์อีกด้วย จนในที่สุดเชื้อปนเปื้อนอาจเพิ่มจำนวนขึ้นจนมีจำนวนมากกว่ายีสต์ส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลของยีสต์ลดต่ำลง (Muthaiyam & Ricke, 2010) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบกระบวนการอย่างสม่ำเสมอเพื่อควบคุมระดับการปนเปื้อนให้ไม่เกิดการสูญเสียทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย

จุลินทรีย์อื่นที่พบในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงมีทั้งยีสต์ชนิดอื่นและแบคทีเรีย แหล่งที่มาของจุลินทรีย์อาจแบ่งออกเป็นแหล่งทางตรงและแหล่งทางอ้อม แหล่งที่จัดเป็นแหล่งทางตรง ได้แก่ สิ่งที่เติมลงไปในถังหมัก เช่น วัตถุดิบที่มีน้ำตาล สารอาหารเพิ่มเติม (ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส) และหัวเชื้อยีสต์ สำหรับแหล่งที่มาทางอ้อม ได้แก่ ถังหมักและท่อขนถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งน้ำที่ใช้ในการควบคุมการทำงานของเครื่องจักร ซึ่งแม้ว่าอุปกรณ์เหล่านี้จะมีการล้างและฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนเป็นครั้งคราวแต่ก็เป็นการยากที่จะกำจัดเชื้อให้หมดไป เชื้อปนเปื้อนเหล่านี้จึงอาจสะสมอยู่และแพร่กระจายอยู่ในระบบการผลิต และเนื่องจากการหมักเอทานอลเป็นกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจน ดังนั้นเชื้อปนเปื้อนส่วนใหญ่จึงเป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic) หรือพวกที่ต้องการออกซิเจนหรือไม่ก็ได้ (facultative anaerobic) นอกจากนั้นยังต้องทนต่อสภาะในถังหมัก เช่น การมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ความเป็นกรด ฯลฯ จุลินทรีย์ปนเปื้อนที่นับว่ามีความสำคัญ ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เซลล์รูปท่อนหรือรูปกลม ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส และสามารถเมตาบอไลซ์น้ำตาลและได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในปริมาณมาก แบคทีเรียกลุ่มนี้ที่มีรายงานพบในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอล ได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Weisella* (Muthaiyam & Ricke, 2010) โดยจีนัส *Lactobacillus* มีการศึกษากันมากที่สุดถึงผลกระทบต่อการผลิตเอทานอล โดยเชื่อกันว่าแบคทีเรียยับยั้ง *Saccharomyces* หรือยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยอาศัยกลไกหลัก 2 กลไก คือ กลไกที่เกิดจากกรดแลคติกและกรดอะซิติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นและกลไกที่เกิดจากการแข่งขันใช้สารอาหารกับยีสต์ รวมทั้งอาจมีกลไกอื่นที่นอกเหนือจากนี้ (Muthaiyam & Ricke, 2010)

การควบคุมการปนเปื้อน

ดังที่กล่าวมาแล้วถึงผลกระทบที่เกิดจากเชื้อปนเปื้อนต่อการผลิตเอทานอล ดังนั้นจึงจำเป็นต้องป้องกันและลดระดับการปนเปื้อนไม่ให้ส่งผลเสียต่อการผลิต วิธีการควบคุมเชื้อปนเปื้อนทำได้หลายแนวทาง แต่ที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอล คือการเติมยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย และการล้างเซลล์ยีสต์ด้วยกรดซัลฟุริก (acid treatment) หรือแอมโมเนียก่อนการนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในถังหมักเอทานอล ได้แก่ penicillin, verginiamycin และ ยาในกลุ่ม ionophore เช่น Kamoran นอกจากนั้นยังมีการทดลองใช้สารเคมีชนิดต่างๆ เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน เช่น urea hydrogen peroxide, chitosan, hydroxycinnamates และ membrane active peptides เป็นต้น (Beckner et. al, 2011) รวมทั้งยังควรมีการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อถังหมักและอุปกรณ์ก่อนการใช้งานเพื่อ

ลดการสะสมของจุลินทรีย์ในรูปของไบโอฟิล์ม (biofilm) เพื่อช่วยลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนแบบเรื้อรังด้วย

5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

ศิริโฉม ทุ่งเก้า (2554) สำรวจแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปนเปื้อนในโรงงานเอทานอลแห่งหนึ่งที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ โดยใช้กระบวนการ sequential-batch ที่ประกอบด้วยถังหมักจำนวน 6 ถังต่อเนื่องกัน นำตัวอย่างมาจากถังหมักจำนวน 3 ถัง รวมทั้งกากน้ำตาลเข้มข้น กากน้ำตาลหลังการตกตะกอน น้ำที่ใช้ในการผลิต ตัวอย่างจากถังเตรียมสารอาหาร (diammonium phosphate, diammonium sulfate) รวม 7 ตัวอย่าง นำมาเพาะแยกแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar ที่เติม cycloheximide 100 mg/L พบว่าน้ำหมักจากถังหมักทั้ง 3 ถังมีแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับ 10^5 cfu/ml ในขณะที่ตัวอย่างที่เหลือไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยโคโลนีที่พบมากมี 3 ไอโวเลต เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50CHL พบว่า 2 ไอโซเลตเป็น *Lactobacillus. plantarum* และอีก 1 ไอโซเลตเป็น *L. fermentum*

In-Seop et. al. (1995) รายงานการสำรวจแบคทีเรียในโรงงานในประเทศเกาหลี 1 แห่ง ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังและข้าวบาร์เลย์เป็นวัตถุดิบ โดยใช้กระบวนการแบบ batch โดยเก็บตัวอย่างจากขั้นตอนการย่อยแห้งเป็นน้ำตาล ได้แก่ ขั้น liquefaction ขั้น cooking ขั้นก่อนและหลัง sacharification ขั้นหลังการหมัก และขั้นการเก็บ โดยนำมาแยกแบคทีเรียบน MRS agar พบว่าขั้นตอนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลมีแบคทีเรียปนเปื้อนในช่วง 10-10^4 cfu/ml หลังจากการหมักและระหว่างการเก็บน้ำหมักแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็นมากกว่า 10^8 cfu/ml จากการจัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้พบว่าเมื่อใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบพบ *Lactobacillus fermentum* และ *L. casei* ได้มากที่สุด ในขณะที่เมื่อใช้ข้าวบาร์เลย์พบ *L. fermentum* และ *S. salivarius*

Skinner and Leathers (2004) ศึกษาแบคทีเรียปนเปื้อนในโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในสหรัฐอเมริกา 3 แห่ง โดยแบ่งเป็นโรงงานที่ใช้กระบวนการย่อยแป้งแบบ wet mill 1 แห่ง และที่ใช้กระบวนการ dry grind อีก 2 แห่ง โดยโรงงาน wet mill ใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้ถังหมักชุดละ 5 ถัง 2 ชุด โดยจะมารวมกันใน 2 ถังสุดท้าย ในขณะที่โรงงาน dry grind โรงงานที่ 1 ใช้ถังหมัก 3 ถัง และหมักแบบ batch และโรงงาน dry grind แห่งที่ 2 ใช้ถังหมักแบบ batch 1 ถัง เก็บตัวอย่างจากสายการผลิต ได่แก่ ถังเลี้ยงยีสต์ ถังหมัก และน้ำ นำมาเพาะแยกแบคทีเรียบน MRS agar ที่เติม cycloheximide 0.001% สุ่มเลือกโคโลนีนำมาจัดจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบ API50CHL และชุดทดสอบ Biolog และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ผลการศึกษาพบว่าโรงงาน wet mill ซึ่งตัวอย่างเก็บระหว่างธันวาคม 2002 กุมภาพันธ์ เมษายน และกันยายน 2003 รวม 9 เดือน มีแบคทีเรียในทุกตัวอย่าง โดยน้ำหวานที่สกัดได้จากข้าวโพดมีแบคทีเรียอยู่ในช่วง 10^4-10^5 cfu/ml ในขณะที่หลังผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ยังคงพบแบคทีเรียในระดับ 10^4-10^6 cfu/ml โดยบางตัวอย่างพบปริมาณเพิ่มขึ้นกว่าก่อนผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ซึ่งคาดว่าน่าจะเนื่องมาจากมีการปนเปื้อนเพิ่มจากเครื่องฆ่าเชื้อ (heat exchanger) และเมื่อน้ำหมักถูกส่งไปถึงถังสุดท้าย (ถังที่ 5) จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นมากกว่า 10^6 cfu/ml จากการจัดจำแนกแบคทีเรียพบว่า *Lactobacillus* มีสัดส่วนถึง 44-60% ของไอโซเลตทั้งหมด โดยพบ *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* มากที่สุด โดยมีสัดส่วน 21-45% ของ *Lactobacillus* ทั้งหมด นอกจากนั้นยังพบ *L. acidophilus, L. crispatus* ได้บ่อย รวมทั้งพบ *Bifidobacterium* ด้วยในตัวอย่างที่เก็บในเดือนกุมภาพันธ์ 2003 สำหรับแบคทีเรียจีนัสอื่นนั้นที่พบได้แก่ *Clostridium, Eubacterium, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Weisella*

ในโรงงาน dry grind แห่งที่ 1 เก็บตัวอย่างจากทั้ง 3 ถังหมักในเดือนกุมภาพันธ์และเมษายน 2003 ตลอดระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่า เริ่มต้นมีแบคทีเรียปริมาณค่อนข้างต่ำ คือ 10^4 cfu/ml และที่ระยะเวลาการหมัก 12-18 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 10^5-10^8 cfu/ml จากนั้นจะลดลงจนเหลือต่ำกว่า 10^6 cfu/ml เมื่อสิ้นสุดการหมัก และจากการจัดจำแนกแบคทีเรียที่พบทำให้ทราบว่าเป็นชนิดที่คล้ายกันในทุกครั้งของการเก็บตัวอย่าง โดย *Lactobacillus* มีสัดส่วนมากที่สุดเช่นเดียวกัน คือพบ 37-39% ของแบคทีเรียที่พบทั้งหมด โดยเป็น *L. delbrueckii* subsp. *lactis* มากที่สุด แต่ไม่พบ *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* ที่พบในโรงงาน wet mill นอกจากนั้นในโรงงาน dry grind ยังพบ *Pediococcus* และ *Weisella confosa* มากกว่าในโรงงาน wet mill โดยพบในสัดส่วน 18 และ 24% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบบของการหมักที่แตกต่างกันมีผลต่อชนิดของแบคทีเรียที่พบในโรงงานเอทานอล

สำหรับโรงงาน dry grind แห่งที่ 2 นั้นทำการเก็บตัวอย่างนาน 9 เดือน คือ ธันวาคม 2002 กุมภาพันธ์ พฤษภาคม และกันยายน 2003 โดยนำมาจาก batch ที่ 2 ซึ่งมีการเติมยา verginiamycin ลงในถังหมักเป็นระยะๆ ตลอดการหมักด้วย โดยโรงงานแห่งนี้ใช้ถังหมักถังเดียว ทำการหมักนาน 50-55 ชั่วโมง พบว่าในน้ำหมักเริ่มต้นมีแบคทีเรียในช่วง 10^6 cfu/ml และเมื่อสิ้นสุดการหมักจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 10^8 cfu/ml และพบว่าแบคทีเรีย 69-87% เป็น *Lactobacillus* โดยอยู่ในสปีชีส์ *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* มากที่สุด รวมทั้งพบ *L. crispatus, L. brevis, L. fermentum* และ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าการเติมยาปฏิชีวนะเป็นระยะๆ ส่งผลให้ประชากรแบคทีเรียในน้ำหมักไม่มีความหลากหลาย ซึ่งจากผลทั้งหมดผู้วิจัยได้สรุปว่าปริมาณและ

ความหลากหลายของแบคทีเรียที่พบในโรงงานเอทานอลที่ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบเกี่ยวข้องกับวิธีการเตรียมน้ำหวานจากข้าวโพด ฤดูกาลรวมทั้งประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะ โดย *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้มากที่สุด

Passoth et. al. (2007) รายงานการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบประชากรยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานเอทานอลของประเทศสวีเดนแห่งหนึ่ง ที่ใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องที่มีการนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ซ้ำ และใช้แป้งจากข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบโดยนำมาผ่านขั้นตอนการย่อยสลายแห้งให้เป็นน้ำตาลก่อน 2 ขั้นตอน คือที่อุณหภูมิ 90 ºซ ตามด้วยอุณหภูมิ 60ºซ เริ่มกระบวนการหมักเอทานอลโดยการเติม baker's yeast 1 ตัน ลงในถังหมักขนาด 100 ลูกบาศก์เมตร และใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ระบบจึงจะคงที่และเข้าสู่กระบวนการแบบต่อเนื่อง ซึ่งสามารถดำเนินการหมักไปได้ยาวนานจนถึง 2 ปี หรือมากกว่านั้น โดยผู้วิจัยเก็บตัวอย่างในเดือนมกราคม มีนาคมและมิถุนายน 2006 จากถังหมัก ซึ่งระบบมีความคงที่ตั้งแต่กรกฎาคม 2005 นำมาเพาะแยกแบคทีเรียบน MRS agar ที่เติม Delvocid 0.1 g/L พบว่าตัวอย่างจากเดือนมกราคม และมีนาคมมีแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนในระดับสูง คือ 6.0×10^7 และ 7.0×10^7 cfu/ml ตามลำดับ โดยคิดเป็นสัดส่วนถึง 70% ของปริมาณเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียรวมกัน ในขณะที่ตัวอย่างจากเดือนมิถุนายนมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกลดลงเป็น 1.2×10^7 cfu/ml ซึ่งคิดเป็นสัดส่วน 10% ของเซลล์ทั้งหมด และจากการสุ่มนำโคโลนีของแบคทีเรียที่พบตัวอย่างละ 20 โคโลนี นำไปจัดจำแนกด้วยวิธี PCR fingerprint พบว่าทั้ง 20 ไอโซเลตจากตัวอย่างแรก (เดือนมกราคม) จัดจำแนกได้เป็น *Lactobacillus vini* ในขณะที่อีก 2 ตัวอย่าง (มีนาคมและมิถุนายน) มี 19 ไอโซเลตที่จัดจำแนกได้เป็น *L. vini* และมีอีก 1 ไอโซเลตจากแต่ละเดือนที่พบว่าเป็น *L. fermentum* และ *L. panis* ตามลำดับ นอกจากนั้นยังมีการตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนใน baker's yeast น้ำ และในขั้นตอนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล พบว่า baker's yeast มี *Lactococcus lactis, Leuconostoc pseudomesenteroides* และ *Pediococcus* sp. ปนเปื้อน แต่พบในปริมาณน้อย ในน้ำพบ *L. fermentum, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Weisella confosa* และ *L. salivarius* ในขณะที่ในขั้นตอนการย่อยแป้งพบ *L. parabuchneri* และ *L. casei* ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามไม่พบ *L. vini* ในตัวอย่างเหล่านี้และผู้วิจัยได้สรุปว่า วัตถุดิบ น้ำและหัวเชื้อยีสต์เป็นแหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการผลิตเอทานอล

Leja and Broda (2009) รายงานการสำรวจแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในโรงงานเอทานอลในประเทศโปแลนด์ 5 แห่ง ได้แก่โรงงาน a, b, c, d และ e โดยโรงงาน a, b, c ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ โรงงาน d ใช้ข้าวฟ่าง (triticale) เป็นวัตถุดิบ และโรงงาน e ใช้ข้าวไรน์เป็นวัตถุดิบ โดยการหมักใช้

เวลา 3 วัน นำตัวอย่างมาแยกเชื้อแบคทีเรียบน MRS agar, Lab-agar, Thioglycollate Fluid Medium และ Chloramphenicol Lab-agar จัดจำแนกโคโลนีที่พบโดยวิธีเปรียบเทียบลำดับเบสของ ribosomal RNA gene กับลำดับเบสอ้างอิง ผลการศึกษาพบว่าวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลทุกชนิดมีแบคทีเรียปนเปื้อนทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรีย anaerobic โดยโรงงาน b และ c ซึ่งใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบพบแบคทีเรียในระดับ 10^7 cfu/g ในขณะที่โรงงาน a ที่ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบเช่นเดียวกันมีแบคทีเรียปนเปื้อนในวัตถุดิบระดับต่ำกว่านี้ ซึ่งผู้วิจัยได้เสนอว่าน่าจะเป็นผลมาจากสภาพการเก็บรักษาข้าวโพดของแต่ละโรงงานที่แตกต่างกัน สำหรับโรงงาน e นั้น พบแบคทีเรียในวัตถุดิบ (ข้าวไรน์) ปริมาณต่ำสุด คืออยู่ในช่วง 10^5-10^6 cfu/g และในน้ำหวานที่ได้จากการย่อยแป้งในระยะแรกที่ใช้ในการหมักเอทานอลนั้นพบแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 10^2-10^4 cfu/ml และเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นแบคทีเรียจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยมีปริมาณสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการหมัก ที่ระดับ 10^6-10^{10}cfu/ml โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณที่พบจากโรงงานต่างๆ พบว่ามีค่าสูงสุดในโรงงาน a ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียพบว่า *Bifidobacterium* มีสัดส่วนในแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุดในทุกโรงงาน รองลงมาคือ *Clostridium aerotolerans* สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นพบจีนัส *Lactobacillus* มากที่สุด โดยสปีชีส์ที่พบมาก คือ *L. delbrueckii* และ *L. fermentum* รวมทั้งยังพบแบคทีเรียกรดแลคติกจีนัส *Leuconostoc* และ *Pediococcus* ด้วย

Lucena et. al., (2010) ได้รายการการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานเอทานอล 4 แห่ง ทางตะวันออกเฉียงเหนือของบราซิล ระหว่างปี 2007-2008 โดยเก็บตัวอย่างทุกเดือนจากถังหมักตั้งแต่วันแรกของการหมักจนสิ้นสุดการหมักที่ 180 วัน โดยโรงงานที่ 1 ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ในขระที่อีก 3 โรงงานทีเหลือใช้น้ำอ้อย ทั้ง 4 โรงงานใช้วิธีล้างเซลล์ยีสต์ด้วยกรดซัลฟุริกเพื่อลดแบคทีเรียปนเปื้อนก่อนนำกลับมาใช้ซ้ำและมีการเติมยาปฏิชีวนะ (penicillin และ ionophore monensin) ลงไปเป็นครั้งคราว นำตัวอย่างมาแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar ที่เติม cycloheximide 0.1% และคัดเลือกมา 20 โคโลนีนำมาจัดจำแนกโดยวิธี DNA fingerprint ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเริ่มต้นการหมักทุกโรงงานมีแบคทีเรียกรดแลคติกในน้ำหมักอยู่ในช่วง 10^8 cfu/ml และพบตลอดระยะเวลาการหมัก 180 วัน โดยมีปริมาณเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 10^6-10^9 cfu/ml นอกจากนั้นยังพบว่าในน้ำอ้อยที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตมีแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับ 10^7-10^8 cfu/ml

แบคทีเรียที่รวบรวมได้มีทั้งหมด 489 ไอโซเลต นำมาตรวจสอบเบื้องต้นว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกหรือไม่ โดยการวิเคราะห์ rRNA operon ด้วย restriction enzyme จากนั้นจึงหาว่าเป็นจีนัสใดด้วยวิธี Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) พบว่าส่วนใหญ่เป็น

Lactobacillus โดยในระยะ 30 วันแรกของการผลิต มีแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสูง และพบสปีชีส์ L. plantarum ได้มากในระยะแรกในบางโรงงาน ในขณะที่โรงงานบางแห่งพบ *L. manihotivorans* และ *Weisella paramesenteriodes* แต่โดยรวมๆ แล้วในระยะแรก *L. fermentum* และ *L. vini* เป็นสปีชีส์เด่นหลังหมักที่ 60 ชั่วโมง และในช่วงท้ายของการหมักพบว่าความหลากหลายของสปีชีส์แบคทีเรียกรดแลคติกมีแนวโน้มลดลง ซึ่งคาดว่าเกิดจากการบางสปีชีส์เกิดการดื้อยาหรืออาจมีการติดเชื้อแบบถาวร (persistant endermic infection) ของบางสปีชีส์ โดยสภาวะที่รุนแรงของการหมัก เช่น การมียาปฏิชีวนะ การมีอุณหภูมิสูงขึ้น การที่น้ำหมักมีค่าพีเอชลดลง และการมีเอทานอลความเข้มข้นสูงขึ้นอาจส่งผลให้เกิดการคัดเลือกดังกล่าวขึ้น นอกจากนั้นยังพบ *L. ferintoshensis, L. diolivorans*-like, *L. nagelii*, unidentified lactic acid bacteria และ *Oenococcus kitahaerae*-like เมื่อสิ้นสุดการหมัก

จากข้อมูลพบว่าโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบมีความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลคติกแตกต่างจากของโรงงานที่ใช้น้ำอ้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปว่าอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งสำคัญของการแบคทีเรีย โดยขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูก ระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวด้วย และการพบ *L. vini* และ *L. fermentum* หลังหมักได้ 30 วัน แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 สปีชีส์นี้ปรับตัวได้ดีในสภาวะการหมัก โดยมีรายงานว่า *L. fermentum* มีผลทำให้เซลล์ยีสต์เกาะกลุ่มกันและลอยตัว (flocculation) และผู้วิจัยได้เสนอแนวทางการลดการปนเปื้อนในโรงงานเอทานอลโดยควรใช้วัตถุดิบ (อ้อย) ที่สดใหม่ มีสิ่งสกปรกติดมาน้อย มีการล้างต้นอ้อยด้วยน้ำสะอาดเพื่อลดปริมาณแบคทีเรีย ใช้น้ำอ้อยและกากน้ำตาลที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนน้อย รวมทั้งมีการเติมยาปฏิชีวนะที่เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียชนิดเป้าหมาย ตลอดจนมีการจัดการระบบการผลิตที่ดีเพื่อลดการปนเปื้อนเพิ่ม

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

- จานเพาะเชื้อพลาสติกขนาด 15 x 90 มิลลิเมตร
- ขวดแก้วฝาเกลียว (Duran) ปริมาตร 250 และ 500 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16×150 มิลลิเมตร
- ปิเปต ปริมาตร 1 และ 10 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง ขนาด 500 มิลลิลิตร
- แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (glass spreader)
- หลอดพลาสติกสำหรับแช่แข็ง (cryotube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- ซองบรรจุสารเคมีกำจัดออกซิเจน (AnaeroGen, Oxoid, United Kingdom)
- ชุดทดสอบชีวเคมี API 50 CH (BioMérieux, France)

เครื่องมือ

- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (SS-325, Tomy, Japan)
- เครื่องชั่ง (PG 802-S, Metler Toledo,USA)
- เครื่องไมโครเวฟ (Sharp)
- เครื่องเขย่า (บริษัท ไทยโพลี่เมดิค จำกัด)
- กล้องจุลทรรศน์ (CH30, Olympus, Japan)
- เครื่องนับจำนวนเซลล์ (Haemacytometer) (Boeco, USA)
- เครื่องวัดความหวาน (Refractometer) (N-1 α, Atago, USA)
- เครื่องวัดพีเอช (pH Meter) (Meter PP-50, Sartorius)
- โถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) (Anaerocult, Merck, USA)
- เครื่องวัดความขุ่น (Densimat K011100, BioMérieux, France)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 35°ซ (Memmert, Germany)
- ตู้แช่เยือกแข็ง อุณหภูมิ -70°ซ

อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) agar (Difco, 2003)
- de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Difco, 2003)
- MRS agar ที่มี Cycloheximide 10 mg/L
- MRS broth (Difco, 2003)

ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลัก จำนวน 4 แห่ง โดย 3 แห่ง ตั้งอยู่ในจังหวัดเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนอีก 1 แห่งตั้งอยู่ในจังหวัดเขตภาคกลาง โดยโรงงานทั้งหมดใช้กระบวนการผลิตแบบ sequential-batch ซึ่งประกอบด้วยถังหมักจำนวน 6 ถัง เก็บตัวอย่างแห่งละ 1-2 ครั้ง จำนวนตัวอย่างที่เก็บแห่งละ 9-13 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 66 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บมาประกอบด้วย กากน้ำตาลเข้มข้น กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงเชื้อยีสต์ (fermenter) กากน้ำตาลจากถังหมักเอทานอลแต่ละถัง น้ำหมักก่อนการกลั่น และสารอาหารเพิ่มเติม (diammonium phosphate, diammonium sulfate) โดยนำมาไม่น้อยกว่าตัวอย่างละ 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดพลาสติก ปิดฝา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 เขย่าภาชนะบรรจุตัวอย่างเพื่อผสมตัวอย่างให้เข้ากัน และใช้ปิเปตขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดบรรจุ 0.85 %NaCl ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างระดับความเจือจาง 10^{-1}

หมายเหตุ

สำหรับตัวอย่างกากน้ำตาลเข้มข้นใช้วิธีการชั่งน้ำหนัก 5 กรัม และผสมกับ 0.85 % NaCl แทนการวัดปริมาตรเนื่องจากกากน้ำตาลมีความหนืดสูง

1.2 ทำการเจือจางตัวอย่างต่อไป โดยใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดบรรจุ 0.85% NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างระดับความเจือจาง 10^{-2} และทำเช่นนี้ต่อไปเป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ

1.3 เพาะตัวอย่างระดับความเจือจางที่เหมาะสม โดยวิธีเกลี่ยตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม Cycloheximide ทำซ้ำ 2 จานเพาะเชื้อในแต่ละระดับความเจือจางของตัวอย่าง

1.4 บ่มจานเพาะเชื้อในโถบ่มเชื้อที่มีซองบรรจุสารเคมีกำจัดออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.5 นำโคโลนีที่มีลักษณะต่างกัน อย่างละ 3 โคโลนี ขีดแยกเชื้อแต่ละโคโลนีบนจานอาหาร MRS agar บ่มที่สภาวะเดิม

1.6 ทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้นของแต่ละโคโลนี ได้แก่ การย้อมสีแกรม การผลิตเอนไซม์คะตะเลส ดังนี้

<u>การย้อมแกรม</u>

1. ผสมเชื้อกับน้ำกลั่นให้ได้รอยเกลี่ยบางๆ บนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้งในอากาศ และตรึงเซลล์ด้วยเปลวไฟ

2. ย้อมด้วยสี crystal violet นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ

3. ย้อมด้วยสารละลาย Gram iodine นาน 1 นาที ล้างน้ำ

4. ชะด้วย 95% Ethanol ประมาณ 10 วินาที ล้างน้ำ

5. ย้อมด้วยสี Safranin O นาน 20 นาที ล้างน้ำ ซับให้แห้ง และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

แบคทีเรียกรดแลคติกเซลล์ติดสีม่วง (แกรมบวก) รูปร่างเป็นท่อน กลม หรือ coccobacilli อยู่เป็นคู่ เป็นสายหรืออยู่เดี่ยว ไม่มีสปอร์

<u>การทดสอบคะตะเลส</u>

1. ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อป้ายบนสไลด์ที่สะอาด

2. หยด 3% H_2O_2 1 หยดลงบนเชื้อ ถ้าเกิดฟองแสดงว่าให้ผลบวกกับการทดสอบ (เชื้อผลิตเอนไซม์คะตะเลส)

แบคทีเรียกรดแลคติกให้ผลลบ (ไม่ผลิตคะตะเลส)

1.7 คำนวณปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่าง (cfu/ml) ดังนี้

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จาน}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง x ความเจือจางของตัวอย่าง}}$$

นำค่าที่ได้เปลี่ยนให้อยู่ในรูป log cfu/ml

2. การศึกษาแบคทีเรียปนเปื้อนโดยตรงจากตัวอย่าง

เขย่าภาชนะบรรจุตัวอย่าง ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างนำมาหยดตัวอย่างบนสไลด์ที่สะอาด ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งถ่ายรูปไว้ด้วย

3. การเก็บเชื้อบริสุทธ์

เลือกโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีลักษณะต่างๆ กัน อย่างละ 2-3 โคโลนี ขีดแยกเชื้อบน MRS agar และบ่มใน anaerobic jar นาน 48-72 ชั่วโมง เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป ดังนี้

1. เพาะแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดขนาด 16x150 มิลลิเมตร ฝาปิดแบบเกลียว

2. บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ผสมเชื้อ 7 มิลลิลิตร กับกลีเซอรอลที่ปราศจากเชื้อ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ความเข้มข้นกลีเซอรอล 30% ใน MRS broth

4. แบ่งใส่ในหลอด cryotube หลอดละ 1 มิลลิลิตร และนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

4. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL ดังนี้

4.1 ชุดทดสอบ

ชุดทดสอบ ประกอบด้วยแผ่นทดสอบ (strip) ถาดพลาสติกสำหรับวาง strip พร้อมฝาปิด (incubation box) กระดาษบันทึกผล และคู่มืออ่านผล

4.2 แผ่นทดสอบ

แผ่นทดสอบ หรือแถบทดสอบ (strip) เป็นแถบพลาสติกที่มีหลอดขนาดเล็ก (microtube) จำนวน 50 หลอด โดย 49 หลอดมี substrate (สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์) ที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ของเชื้อ และอีก 1 หลอดที่เหลือเป็นหลอดควบคุมผลลบ (ไม่มี substrate ใดๆ) โดยแบ่งเป็นแถบย่อย 5 แถบ ดังนี้

- Strip 0-9 มีจำนวน 10 หลอด คือ หลอดที่ 0-9 โดยหลอด 0 เป็นหลอดควบคุม และอีก 9 หลอดที่เหลือมี substrate ชนิดต่างๆ
- Strip 10-19 มีจำนวน 10 หลอด คือ หลอดที่ 10-19 ซึ่งมี substrate ต่างชนิดกัน

- Strip 20-29 มีจำนวน 10 หลอด คือหลอดที่ 20-29 ซึ่งมี substrate ต่างชนิดกัน
- Strip 30-39 มีจำนวน 10 หลอด คือหลอดที่ 30-39 ซึ่งมี substrate ต่างชนิดกัน
- Strip 40-49 มีจำนวน 10 หลอด คือหลอดที่ 40-49 ซึ่งมี substrate ต่างชนิดกัน

รายละเอียดของ substrate ในหลอดขนาดเล็กของแต่ละแถบทดสอบย่อยแสดงในตารางต่อไปนี้

Strip 0-9		Strip 10-19		Strip 20-29	
Tube	Substrate	Tube	Substrate	Tube	Substrate
0	Control	10	Galactose	20	Þ-Methyl-D-mannoside
1	Glycerol	11	Glucose	21	Þ-Methyl-D-glucoside
2	Erythrytol	12	Fructose	22	N-Acetyl-glucosamine
3	D- Arabinose	13	Manose	23	Amygdalin
4	L-Arabinose	14	Sorbose	24	Arbutin
5	Ribose	15	Rhamnose	25	Esculin
6	D-Xylose	16	Dulcitol	26	Salicin
7	L-Xylose	17	Inocitol	27	Cellobiose
8	Adonitol	18	Mannitol	28	Maltose
9	ß-Methyl-D-xyloside	19	Sorbitol	29	Lactose
Strip 30-39					
Tube	Substrate	Tube	Substrate		
30	Melibiose	40	D-Turanose		
31	Sucrose	41	D-Lyxose		
32	Trehalose	42	D-Tagatose		
33	Inulin	43	D-Fucose		
34	Melezitose	44	L-Fucose		
35	Raffinose	45	D-Arabitol		
36	Starch	446	L-Arabitol		
37	Glycogen	47	Gluconate		
38	Xylitol	48	2-Keto-gluconate		
39	Gentobiose	49	5-Keto-gluconate		

4.3 วัสดุอุปกรณ์เพิ่มเติม

- API 50 CHL Medium
  มีส่วนผสมต่อลิตร ดังนี้ polypeptone (bovine/porcine origin) 10 g, yeast extract g, tween 80 1 ml, dipotassium phosphate 2 g, sodium acetate 5 g, diammonium citrate 2 g, magnesium sulfate 0.2 g, manganese sulfate 0.05 g, bromcresol purple 0.17 g, pH 6.7-7.1
- Mineral oil ปราศจากเชื้อ
- กล่องพลาสติกสำหรับวางแถบทดสอบ (กล่องบ่มเชื้อ)
- Densimat (เครื่องวัดค่าความขุ่นในหน่วย McFarland)
- พาสเจอร์ปิเปตพลาสติกชนิดใช้ได้ครั้งเดียว (disposable plastic Pasteur pipettes)
- ตะแกรงสำหรับวางหลอดบรรจุ medium (Ampule rack)
- ที่สวมหลอด medium สำหรับป้องกันอันตรายจากการแตก (Ampule protector)

4.4 การเตรียมแถบทดสอบ

1) เตรียมกล่องบ่มเชื้อสำหรับวางแถบทดสอบโดยนำส่วนฝาประกบกับส่วนถาด (มีหลุมตื้นขนาดเล็กกระจายทั่วไป) บันทึกรหัสของเชื้อทดสอบบนส่วนของถาดที่ยื่นออกมา

2) เปิดฝากล่องออก เติมน้ำกลั่น (หรือน้ำกำจัดอิออน) 10 มิลลิลิตร ลงในถาด เอียงถาดให้น้ำกระจายอยู่ในหลุมของถาดให้ทั่วถึง

3) วางแถบทดสอบลงในถาด โดยเรียงเป็นเป็นลำดับให้ครบ 5 แถบย่อย (0-9, 10-19, 20-29, 30-39, 40-49)

4.5 การเตรียมเซลล์แขวนลอย

1) เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยขีดให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใน โถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจนนาน 24 ชั่วโมง

2) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยสังเกตจากลักษณะโคโลนีและย้อมแกรม (ต้องเป็นแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์) และทดสอบ catalase (ต้องได้ผลลบ)

3) เปิดฝาหลอด (ampule) บรรจุ API 50 CHL Medium ดังนี้

- ถือหลอด medium ด้วยมือข้างที่ถนัดให้อยู่ในแนวดิ่ง (หลอด medium ทำด้วยแก้ว ด้านบนของหลอดคอดเว้าเข้าไป และส่วนปลายมีลักษณะเรียวแหลมครอบด้วยฝาพลาสติก โดยฝามีรูปทรงกระบอกด้านบนมีลักษณะคล้ายลิ่ม)

- ใช้นิ้วหัวแม่มือกดฝาพลาสติกของหลอดให้ส่วนปลายนิ้วมืออยู่บริเวณส่วนราบของฝา

- ออกแรงกดฝาในแนวออกจากตัวเพื่อทำให้ส่วนบนของหลอดแก้วที่เว้าเข้าไปซึ่งอยู่ข้างในฝาหักออก ดึงฝาพร้อมส่วนของขวดแก้วที่หักออกจากหลอด

4) ใช้พาสเจอร์ปิเปตปราศจากเชื้อเขี่ยโคโลนีบนจาน MRS agar นำมาแขวนลอยใน API 50 medium ดูดเชื้อขึ้นลงหลายๆ ครั้งเพื่อทำให้เซลล์กระจาย

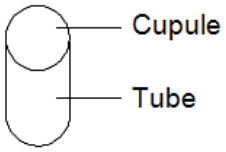
5) นำหลอด medium ไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Densimat ปรับให้ได้ค่า 2 McFarland ถ้ายังไม่ถึงให้เขี่ยโคโลนีลงไปเพิ่ม และวัดจนได้ค่า 2 McFarland ตามต้องการ

4.6 การเพาะเชื้อ

1) ใช้พาสเจอร์ปิเปตปราศจากเชื้ออันใหม่ดูดเซลล์แขวนลอยที่ได้ลงในหลอดขนาดเล็กบนแถบทดสอบ ดังนี้

-เอียงถาดของกล่องบ่มเชื้อมาด้านหน้าเล็กน้อย

-เติมเซลล์แขวนลอยลงในแต่ละหลอดของแถบทดสอบ โดยแตะปลายปิเปตที่ด้านข้างบริเวณส่วนเปิดของหลอดที่เรียกว่า cupule (ดังรูป) และค่อยๆ ปล่อยเซลล์แขวนลอยลงไปจนเต็ม ส่วนหลอดที่เรียกว่า tube (ดังรูป) ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทำจนครบทุกหลอด



2) ใช้พาสเจอร์ปิเปตอันใหม่ ดูด mineral oil ที่ปราศจากเชื้อเติมลงไปจนเต็มส่วน cupule ของทุกหลอด

3) ปิดฝากล่องและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

4.7 การอ่านผล

อ่านผลการทดสอบโดยหลอดที่ให้ผลบวกอาหารทดสอบจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (เนื่องจากเชื้อทดสอบใช้ substrate ที่อยู่ในหลอดและเกิดความเป็นกรดขึ้น ทำให้สีของ Bromcresol purple ซึ่งเป็น pH indicator เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ยกเว้นหลอดที่ 25 ซึ่งเป็นการทดสอบ esculin ผลบวกจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ)

-ถ้าอาหารทดสอบยังเปลี่ยนสีไม่ชัดเจนภายใน 24 ชั่วโมง ให้บ่มต่อไปอีกจนครบ 48 ชั่วโมง บันทึกผล (บวกหรือลบ) ลงในกระดาษบันทึกผล และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย software ใน api web ของบริษัทผู้ผลิต

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียแลคติก

งานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างจากขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ได้แก่ กากน้ำตาลที่ใช้เลี้ยงยีสต์ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ (prefermentation) กากน้ำตาลที่ใช้หมักเพื่อผลิตเอทานอลในขั้นตอนการหมัก (fermentation) กากน้ำตาลจากท่อผสม สารอาหารเพิ่มเติม (diammonium phosphate/diammonium phosphate) น้ำหมักจากถังเก็บก่อนนำไปกลั่นรวมทั้งกากน้ำตาลเข้มข้น โรงงานที่ศึกษามีทั้งหมด 4 แห่ง กำหนดรหัสของโรงงานเป็น PK1, PK2, KL และ DC โดยมี 2 โรงงานที่ทำการนำตัวอย่างมาศึกษา 2 ครั้ง ได้แก่ โรงงาน PK1 เก็บครั้งที่ 1 จำนวน 12 ตัวอย่าง ครั้งที่ 2 จำนวน 10 ตัวอย่าง และโรงงาน DC ครั้งที่ 1 นำมาจำนวน 13 ตัวอย่าง ครั้งที่ 2 จำนวน 10 ตัวอย่าง และมีโรงงานที่เก็บตัวอย่างมาศึกษา 1 ครั้งจำนวน 2 โรงงาน ได้แก่ โรงงาน KL นำมาจำนวน 9 ตัวอย่าง และโรงงาน PK2 จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาทั้งสิ้น 67 ตัวอย่าง รายละเอียดจำนวนตัวอย่างและวันที่เก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งแสดงใน**ตารางที่** 4 ตัวอย่างที่เก็บมาบรรจุในขวดพลาสติก มีฝาปิดแบบเกลียว แต่ละตัวอย่างมีปริมาตรไม่น้อยกว่า 100 มิลลิลิตร ดังแสดงใน**ภาพที่** 3

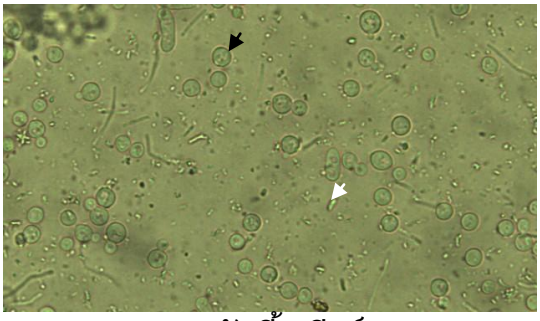
ภาพที่ 3 ขวดบรรจุตัวอย่างกากน้ำตาลจากถังหมักของโรงงานเอทานอลที่ใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 4 วันที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้ในการศึกษา

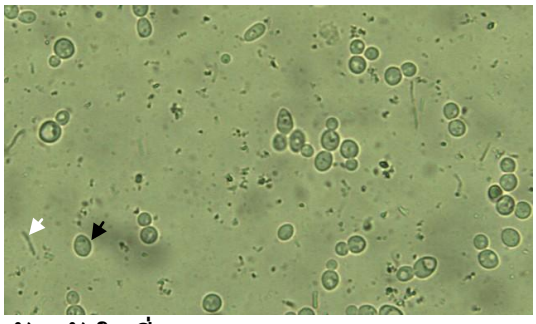
รหัสโรงงาน	**ครั้งที่ 1**		**ครั้งที่ 2**	
	วันที่เก็บ	**จำนวนตัวอย่าง**	**วันที่เก็บ**	**จำนวนตัวอย่าง**
PK1	15 สค. 56	12	29 สค. 57	10
KL	15 สค. 56	12	-	-
PK2	29 สค. 57	10	-	-
DC	25 เมย. 57	13	13 มิย. 57	10

นำตัวอย่างมาตรวจดูเซลล์แบคทีเรียโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าตัวอย่างทั้งหมดยกเว้นกากน้ำตาลเข้มข้น มีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ด้วยร่วมกับยีสต์ ดัง **ภาพที่ 4** ซึ่งแสดงลักษณะเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียในกากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ น้ำหมักจากถังหมักจำนวน 4 ถัง และน้ำหมักก่อนการกลั่น จะเห็นได้ว่าทุกตัวอย่างมีแบคทีเรียและยีสต์ โดยเซลล์แบคทีเรียที่พบมีรูปร่างหลายแบบทั้งรูปท่อนและรูปกลม และมีความหนาแน่นใกล้เคียงกับเซลล์ยีสต์ ยกเว้นในถังเก็บน้ำหมักก่อนการกลั่นซึ่งพบเซลล์ยีสต์จำนวนน้อยกว่าซึ่งอาจเนื่องจากเป็นน้ำหมักจากถังหมักถังสุดท้ายดังนั้นเซลล์ยีสต์บางส่วนจึงอาจแตกสลายไป หรือเกิดการตกตะกอนขณะเก็บตัวอย่างมาศึกษา

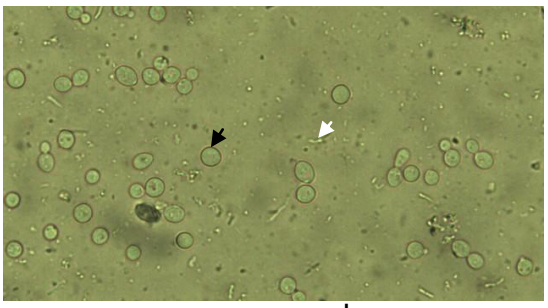
เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดเพาะแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธีเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม Cycloheximide 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของยีสต์ และบ่มภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง พบว่าทุกตัวอย่างยกเว้นกากน้ำตาลเข้มข้น มีโคโลนีแบคทีเรียเจริญบน MRS agar โดยโคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีสีขาวหรือสีเทา กลม นูน ทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ดังแสดงตัวอย่างใน**ภาพที่** 5



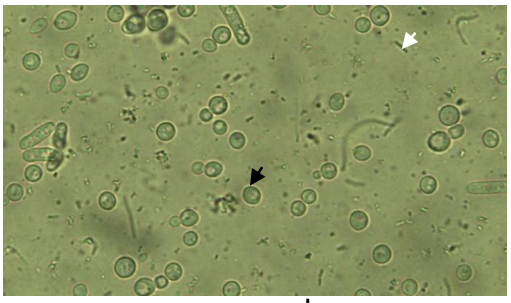
ถังเลี้ยงยีสต์



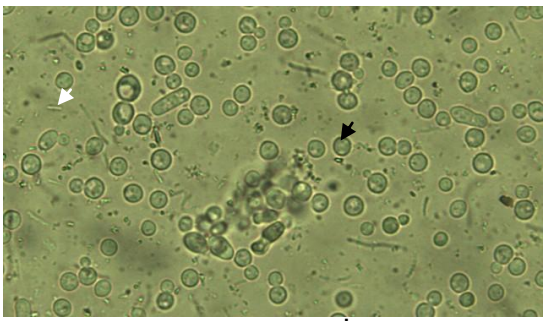
ถังหมักใบที่ 1



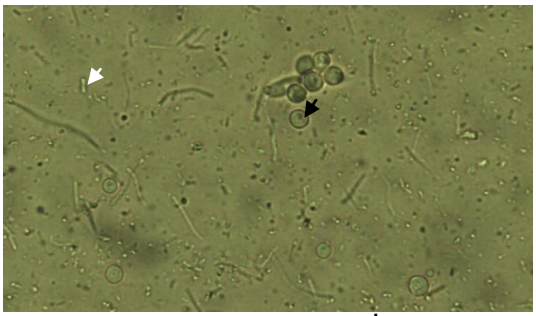
ถังหมักใบที่ 2



ถังหมักใบที่ 4



ถังหมักใบที่ 6

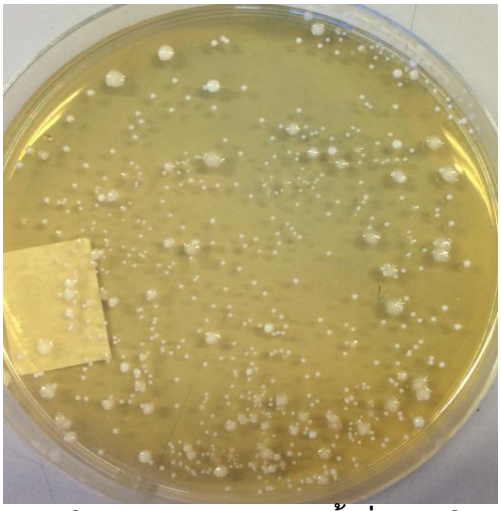


ถังรวมก่อนการกลั่น

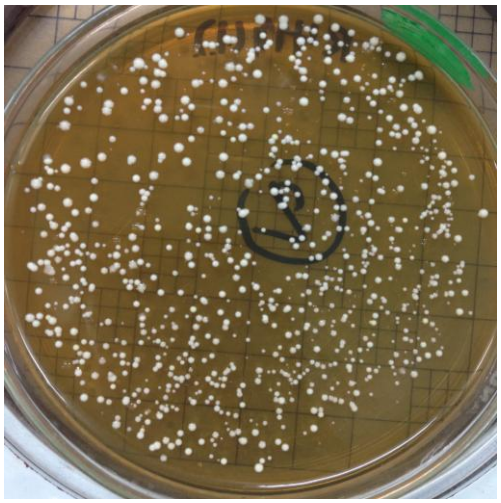
ภาพที่ 4 ลักษณะเซลล์ยีสต์ (ลูกศรสีดำ) และเซลล์แบคทีเรีย (ลูกศรสีขาว) ที่พบในกากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ ถังหมักเอทานอล และถังน้ำหมักก่อนกลั่น เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

โรงงาน PK1 ครั้งที่ 1

โรงงาน DC ครั้งที่ 1



โรงงาน DC ครั้งที่ 2



โรงงาน KL

ภาพที่ 5 โคโลนีแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงงานเอทานอลที่ศึกษา เมื่อนำมาแยกเชื้อบน MRS agar ที่มี cycloheximide เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และบ่มนาน 48 ชั่วโมง

เมื่อทำการเลือกโคโลนีบน MRS agar ที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทดสอบเบื้องต้นเพื่อให้ทราบว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกหรือไม่ โดยนำมาย้อมสีแกรมและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูรูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์และการติดสีแกรม รวมทั้งทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส พบว่า

แบคทีเรียทั้งหมดติดสีแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน หรือรูปท่อนเกือบกลม (coccobacilli) ไม่พบสปอร์ และให้ผลลบกับการทดสอบคะตะเลส (ไม่ผลิตคะตะเลส) ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก จึงสามารถคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้ ดังนี้

<u>โรงงาน PK1 ครั้งที่ 1</u>

ทำการเก็บตัวอย่างจากโรงงานเอทานอล PK1 จำนวน 2 ครั้ง การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 กำหนดรหัสเป็น PK11 มีจำนวนตัวอย่างรวม 12 ตัวอย่าง โดยเก็บมาจากจุดต่างๆ ของกระบวนการผลิตเอทานอล โดยเป็นกากน้ำตาลในถังหมักจำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เหลือ ได้แก่ กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ จากท่อผสมก่อนเข้าถังเลี้ยงยีสต์และท่อผสมก่อนเข้าถังหมัก น้ำหมักจากถังเก็บก่อนกลั่นเอทานอล และกากน้ำตาลเข้มข้น ผลการแยกเชื้อบน MRS agar พบโคโลนีแบคทีเรียที่มีปริมาณมาก (ตั้งแต่ 6 log cfu/ml ขึ้นไป) ทั้งหมด 5 แบบ (หรือ 5 ไอโซเลต) และกำหนดรหัสเป็น PK11-1 ถึง PK11-5 ดังนี้

-PK11-1 : โคโลนีกลม นูน สีขาว ขอบเรียบ ผิวมันวาว

-PK11-2 : โคโลนีกลม นูน สีเทาใส ขอบเรียบ ขนาดเล็กมาก (ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร)

-PK11-3 : โคโลนี กลม แบน สีเทา ขอบหยัก ผิวหยาบด้าน

-PK11-4 : โคโลนีกลม นูนเล็กน้อย สีขาว ขอบไม่เรียบ ผิวเยิ้ม ขนาดใหญ่

-PK11-5 : โคโลนีกลม นูน สีขาวตรงกลาง ขอบหยักสีเทา

เมื่อทำการย้อมแกรมและทดสอบคะตะเลสของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่าทั้งหมดจัดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากติดสีแกรมบวก ไม่มีสปอร์ และให้ผลลบกับการทดสอบคะตะเลส (ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส) โดยรายละเอียดผลการทดสอบแสดงใน**ตารางที่** 5

ตารางที่ 5 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอล PK1 ครั้งที่ 1

การทดสอบ	**รหัสเชื้อ**				
	PK11-1	PK11-2	PK11-3	PK11-4	PK11-5
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีกลมนูน สีขาว ขอบเรียบ ผิวมันวาว	โคโลนีกลมนูน สีเทาใส ขอบเรียบ ขนาดเล็กมาก	โคโลนีกลมแบน สีเทา ขอบหยัก ผิวหยาบด้าน	โคโลนีกลมนูนเล็กน้อย สีขาว ผิวเยิ้ม ขอบไม่เรียบ ขนาดใหญ่	โคโลนีกลมนูน ตรงกลางสีขาว ขอบหยัก สีเทา
การย้อมแกรม	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน ขนาดค่อนข้างใหญ่ ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนสั้นเกือบกลม ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนขนาดเล็ก ติดสีไม่สม่ำเสมอ ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนขนาดเล็ก ยาว ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนขนาดเล็ก ยาว ไม่มีสปอร์
คะตะเลส	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ

แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในตัวอย่างที่เก็บมาจากจุดต่างๆ ของกระบวนการผลิตของโรงงานเอทานอล PK1 ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 มีปริมาณอยู่ในช่วง 6.42-7.89 log cfu/ml โดยตัวอย่างกากน้ำตาลจากถังหมักทั้ง 6 ถัง พบแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 6.93-7.22 log cfu/ml หรือเฉลี่ย 7.12 log cfu/ml ถังเตรียมสารอาหารพบ 6.42 log cfu/ml ถังเลี้ยงยีสต์พบ 7.76 log cfu/ml และในท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์และท่อผสมของถังหมักพบ 7.89 และ 7.69 log cfu/ml ตามลำดับ น้ำหมักก่อนการกลั่นพบ 7.85 log cfu/ml สำหรับกากน้ำตาลเข้มข้นนั้นไม่พบโคโลนีใดๆ บน MRS agar เมื่อเจือจางตัวอย่าง 5 เท่า ซึ่งสามารถคำนวณได้ว่าในกากน้ำตาลเข้มข้นมีแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยกว่า 5 cfu/g หรือ น้อยกว่า 0.5 log cfu/g และเมื่อพิจารณาการแพร่กระจายของแบคทีเรียรหัสต่างๆ พบว่าแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างมีแบคทีเรียชนิดเด่นคล้ายคลึงกัน ตัวอย่างเช่น PK11-2 เป็นแบคทีเรียไอโซเลตที่พบมากในสารอาหารจากถังเตรียม ในกากน้ำตาลจากท่อผสมก่อนเข้าถังเลี้ยงยีสต์พบแบคทีเรียทุกไอโซเลตยกเว้น PK11-5 ในถังเลี้ยงยีสต์พบ PK11-1, PK11-2 และ PK11-4 ปริมาณมาก ในขณะที่ในถังหมักทั้ง 6 ถัง มีแบคทีเรีย PK11-1 ถึง PK11-4 เป็นชนิดเด่นเหมือนกัน แต่พบไอโซเลต PK11-5 ได้มากเฉพาะในบางถังหมักเท่านั้น รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 6

ตารางที่ 6 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล PK1 ครั้งที่ 1

ลำดับ	ชื่อตัวอย่าง	Log cfu/ml	รหัสเชื้อ**				
			PK 11-1	PK 11-2	PK 11-3	PK 11-4	PK 11-5
1	กากน้ำตาลเข้มข้นจากถังเก็บ	< 0.5*	-	-	-	-	-
2	ถังเตรียมสารอาหาร (Das/Dap)	6.42	-	+	-	-	-
3	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์	7.89	+	+	+	+	-
4	กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์	7.76	+	+	-	+	-
5	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังหมัก	7.69	+	+	-	+	-
6	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 1	7.07	+	+	+	+	-
7	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 2	7.22	+	+	+	+	-
8	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 3	7.17	+	+	+	+	-
9	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 4	7.13	+	+	+	+	+
10	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 5	7.18	+	+	+	+	+
11	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 6	6.93	+	+	+	+	+
12	น้ำหมักก่อนการกลั่น	7.85	+	+	+	+	-

หมายเหตุ

* มีหน่วยเป็น log cfu/g

** PK11-1 : กลม นูน สีขาว ขอบเรียบ ผิวมันวาว

PK11-2 : กลม นูน สีเทาใส ขอบเรียบ ขนาดเล็กมาก

PK11-3 : กลม แบน สีเทา ขอบหยัก ผิวหยาบด้าน

PK11-4 : กลม นูนเล็กน้อย สีขาว ขอบไม่เรียบ ผิวเยิ้ม ขนาดใหญ่

PK11-5 : กลม นูน สีขาวตรงกลาง ขอบหยักสีเทา

\+ หมายถึง พบในปริมาณมาก

\- หมายถึง ไม่พบหรือพบในปริมาณน้อย

โรงงาน PK1 ครั้งที่ 2

ตัวอย่างจากโรงงานผลิตเอทานอล PK1 ในการเก็บตัวอย่างมาศึกษาครั้งที่ 2 (กำหนดรหัสเป็น PK12) มีจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ กากน้ำตาลในท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์ กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ น้ำหมักจากถังหมัก 6 ถัง น้ำหมักก่อนการกลั่นและกากน้ำตาลเข้มข้น เมื่อนำมาเพาะแยกเชื้อบน MRS agar พบโคโลนีแบคทีเรียในทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างกากน้ำตาลเข้มข้นเช่นเดียวกัน โคโลนีที่พบมากมีทั้งหมด 4 แบบ และกำหนดรหัสแต่ละไอโซเลตเป็น PK12-1 ถึง PK12-4 ดังนี้

-PK12-1 : โคโลนีกลม นูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ

-PK12-2 : โคโลนีกลม สีเทาใส ขนาดเล็ก

-PK12-3 : โคโลนีกลม นูน สีเทาใส เยิ้ม

-PK12-4 : โคโลนีนูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก ผิวมัน

ลักษณะโคโลนี ผลการย้อมแกรมและผลการทดสอบคะตะเลสของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตทำให้สรุปได้ว่าทั้งหมดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากย้อมติดสีแกรมบวก ไม่มีสปอร์และให้ผลลบกับการทดสอบคะตะเลส รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 7

ตารางที่ 7 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจากโรงงานผลิตเอทานอล PK1 ครั้งที่ 2

การทดสอบ	**รหัสเชื้อ**			
	PK12-1	PK12-2	PK12-3	PK12-4
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีกลม นูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ	โคโลนีกลม สีเทาใส ขนาดเล็ก	โคโลนีกลม นูน สีเทาใส เยิ้ม	โคโลนีนูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก ผิวมัน
การย้อมแกรม	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน ปลายมน ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน เกือบกลม ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน ปลายมน ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน ไม่มีสปอร์
คะตะเลส	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ

จากการคำนวณปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างจากโรงงานผลิตเอทานอล PK1 ในการเก็บตัวอย่างมาศึกษาครั้งที่ 2 พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 6.97-8.38 log cfu/ml โดยพบในท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์ 8.38 log cfu/ml ในถังเลี้ยงยีสต์พบ 8.05 log cfu/ml ในถังหมัก 6 ถังพบในช่วง 7.18-8.28 log cfu/ml หรือเฉลี่ย 7.59 log cfu/ml ในถังเก็บน้ำหมักก่อนกลั่นพบ 6.97 log cfu/mlและพบน้อยกว่า 0.5 log cfu/g ในกากน้ำตาลเข้มข้น สำหรับแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตที่มีปริมาณมากนั้น มีการแพร่กระจายในตัวอย่างที่เก็บจากจุดต่างๆ ตัวอย่างเช่น ในท่อผสมก่อนเข้าถังเลี้ยงยีสต์พบแบคทีเรียทุกรหัส ยกเว้น PK12-4 โดยแบคทีเรียรหัส PK12-1 เป็นไอโซเลตเด่นในทุกตัวอย่าง รองลงมาคือ PK12-2 ที่มีปริมาณมากในถังหมักและท่อผสมรายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 8

ตารางที่ 8 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล PK1 ครั้งที่ 2

ลำดับ	**ตัวอย่าง**	Log cfu/ml	**รหัสเชื้อ****			
			PK 12-1	PK 12-2	PK 12-3	PK 12-4
1	กากน้ำตาลเข้มข้นจากถังเก็บ	<0.5*	-	-	-	-
2	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์	8.38	+	+	+	-
3	กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์	8.05	+	+	+	-
4	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 1	8.28	+	+	-	-
5	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 2	8.08	+	+	-	-
6	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 3	7.36	+	+	+	-
7	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 4	7.32	+	+	-	-
8	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 5	7.18	+	+	-	-
9	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 6	7.32	+	-	-	+
10	น้ำหมักก่อนการกลั่น	6.97	+	-	-	-

หมายเหตุ

* มีหน่วยเป็น log cfu/g

**PK12-1 : โคโลนีกลม นูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ PK12-2 : โคโลนีกลม สีเทาใส ขนาดเล็ก

PK12-3 : โคโลนีกลม นูน สีเทาใส เยิ้ม PK12-4 : โคโลนีนูน สีขาวขุ่น ขอบหยัก ผิวมัน

+ หมายถึง พบในปริมาณมาก - หมายถึงไม่พบ หรือพบในปริมาณน้อย

โรงงาน KL

โรงงานเอทานอลแห่งที่ 2 ได้แก่โรงงาน KL มีการเก็บตัวอย่างมาศึกษา 1 ครั้ง โดยนำมาจากถังเตรียมสารอาหาร ท่อผสมก่อนเข้าถังเลี้ยงยีสต์และก่อนเข้าถังหมัก ถังเลี้ยงยีสต์ ถังหมัก น้ำหมักก่อนการกลั่น และกากน้ำตาลเข้มข้น รวม 12 ตัวอย่าง จากการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างบน MRS agar พบโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกในทุกตัวอย่างยกเว้นในกากน้ำตาลเข้มข้นเช่นเดียวกัน โดยโคโลนีที่พบมากมีทั้งหมด 4 ไอโซเลต และกำหนดรหัสเป็น KL-1 ถึง KL-5 ดังนี้

-KL-1 : โคโลนีกลม นูน สีขาว ขอบเรียบ ผิวมันวาว

-KL-2 :โคโลนีกลม นูน สีเทาใส ขอบเรียบ ขนาดเล็กมาก

-KL-3 :โคโลนีกลม นูนเล็กน้อย สีขาว ขอบไม่เรียบ ผิวเยิ้ม ขนาดใหญ่

-KL-4 :โคโลนีกลม นูนสีขาวตรงกลาง ขอบหยักสีเทา

รายละเอียดลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงาน PK1 ครั้งที่ 1 แสดงใน**ตารางที่** 9 ซึ่งทั้งหมดให้ผลการทดสอบเบื้องต้นที่สรุปได้ว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก

ตารางที่ 9 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจากโรงงานผลิตเอทานอล KL

การทดสอบ	**ไอโซเลต**			
	KL-1	KL-2	KL-3	KL-4
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีกลม นูน สีขาว ขอบเรียบ ผิวมัน	โคโลนีกลม นูน สีเทาใส ขอบเรียบ ขนาดเล็กมาก	โคโลนีกลม นูนเล็กน้อย สีขาว ผิวเยิ้ม ขอบไม่เรียบ ขนาดใหญ่	โคโลนีกลม นูน สีขาวตรงกลาง ขอบหยัก สีเทา
การย้อมแกรม	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนขนาดค่อนข้างใหญ่ ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนสั้นเกือบกลม ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนขนาดเล็กยาว ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนขนาดเล็กยาว ไม่มีสปอร์
คะตะเลส	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ

แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจากจุดต่างๆ ของกระบวนการผลิตของโรงงานเอทานอล KL มีปริมาณอยู่ระหว่าง 5.85-7.87 log cfu/ml โดยพบในถังหมัก 6 ถัง ในช่วง 5.85-6.30 log cfu/ml (คิดเป็นค่าเฉลี่ย 6.10 log cfu/ml) พบในถังเตรียมสารอาหาร 6.18 log cfu/ml ถังเลี้ยงยีสต์พบ 7.60 log cfu/ml ในท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์และท่อผสมของถังหมักพบปริมาณ 7.84 และ 7.71 log cfu/ml ตามลำดับ และในน้ำหมักก่อนการกลั่นพบ 7.72 log cfu/ml สำหรับกากน้ำตาลเข้มข้นนั้นพบแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยกว่า 0.5 log cfu/g เช่นเดียวกับในโรงงาน PK1 แบคทีเรียทุกไอโซเลตที่พบปริมาณมากในทุกจุดที่เก็บตัวอย่างรายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 10

ตารางที่ 10 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล KL

ลำดับ	ตัวอย่าง	Log cfu/ml	รหัสเชื้อ**			
			KL-1	KL-2	KL-3	KL-4
1	กากน้ำตาลเข้มข้นจากถังเก็บ	< 0.5*	-	-	-	-
2	ถังเตรียมสารอาหาร (Das/Dap)	6.18	-	+	-	-
3	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์	7.84	+	+	+	-
4	กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์	7.60	+	+	+	-
5	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังหมัก	7.71	+	+	+	-
6	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 1	5.96	-	+	+	+
7	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 2	5.85	+	+	+	+
8	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 3	5.99	+	+	+	+
9	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 4	6.24	+	+	+	+
10	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 5	6.30	+	+	+	-
11	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 6	6.23	+	+	+	+
12	น้ำหมักก่อนการกลั่น	7.72	+	+	-	+

หมายเหตุ

* มีหน่วยเป็น log cfu/g

** KL-1 : โคโลนีกลม นูน สีขาว ขอบเรียบ ผิวมันวาว

KL-2 : โคโลนีกลม นูน สีเทาใส ขอบเรียบ ขนาดเล็กมาก

KL-3 : โคโลนีกลม นูนเล็กน้อย สีขาว ขอบไม่เรียบ ผิวเยิ้ม ขนาดใหญ่

KL-4 : โคโลนีกลม นูน สีขาวตรงกลาง ขอบหยักสีเทา

\+ หมายถึง พบในปริมาณมาก

\- หมายถึง ไม่พบ หรือพบในปริมาณน้อย

โรงงาน PK2

โรงงานเอทานอลแห่งที่ 3 ได้แก่โรงงาน PK2 นำตัวอย่างมาจากกระบวนการผลิตเอทานอลของโรงงานนี้เพียงรอบเดียว รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ประกอบด้วยกากน้ำตาลเข้มข้น กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ กากน้ำตาลจากถังหมักจำนวน 6 ถัง กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังหมัก และน้ำหมักก่อนการกลั่น เมื่อนำมาเพาะแยกแบคทีเรียบนอาหาร MRS agar สามารถแยกโคโลนีแบคทีเรียได้ในทุกตัวอย่าง ยกเว้นในกากน้ำตาลเข้มข้นเช่นเดียวกัน โดยโคโลนีที่พบมากมีทั้งหมด 3 แบบ และกำหนดรหัสเป็น PK2-1 ถึง PK2-3 ดังนี้

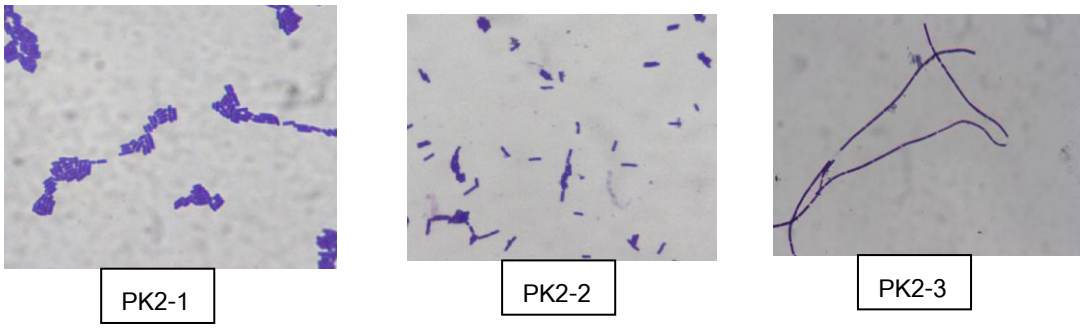
- PK2-1 : โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ
- PK2-2 : โคโลนีสีเทา ใส กลม นูน ผิวเยิ้ม
- PK2-3 : โคโลนีสีเทา แบน ขอบหยัก

เมื่อทดสอบแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตเบื้องต้นเพื่อยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกหรือไม่ โดยการย้อมแกรมและทดสอบคะตะเลส พบว่าไอโซเลตเหล่านี้ติดสีแกรมบวก ไม่มีสปอร์ และไม่ผลิตคะตะเลส ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 11

ตารางที่ 11 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจากโรงงานผลิตเอทานอล PK2

การทดสอบ	**รหัสเชื้อ**		
	PK2-1	PK2-2	PK2-3
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ	โคโลนีสีเทา ใส กลม นูน ผิวเยิ้ม	โคโลนีสีเทา แบน ขอบหยัก
การย้อมแกรม	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน ปลายมน ไม่มีสปอร์ อยู่เดี่ยว หรือเป็นคู่	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน ปลายมน ไม่มีสปอร์ อยู่เดี่ยว คู่หรือสายสั้น	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนยาว ต่อกันเป็นสาย
คะตะเลส	ลบ	ลบ	ลบ

ภาพที่ 6 แสดงเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละรหัส (PK2-1, PK2-2 และ PK2-3) ซึ่งพบมากในโรงงาน PK2 เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลตมาย้อมแกรมและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นได้ว่าทั้งหมดเป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมบวก ไม่มีสปอร์ เซลล์อยู่เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ยกเว้น PK2-3 ที่เซลล์ต่อเป็นสายยาว



ภาพที่ 6 การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในโรงงานเอทานอล PK2 (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในแต่ละจุดของกระบวนการผลิตของโรงงานแห่งนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 5.38-7.71 log cfu/ml โดยในถังเลี้ยงยีสต์พบ 6.11 log cfu/ml ในท่อผสมของถังหมักพบ 7.65 log cfu/ml ในถังหมัก 6 ถังพบระหว่าง 5.56-7.71 log cfu/ml หรือเฉลี่ย 6.45 log cfu/ml น้ำหมักก่อนการกลั่นพบ 5.38 log cfu/ml และในกากน้ำตาลเข้มข้นพบน้อยกว่า 0.5 log cfu/g แบคทีเรียกรดแลคติกรหัส PK2-1 พบมากในทุกจุดที่เก็บตัวอย่าง ในขณะที่แบคทีเรียรหัส PK2-2 และ PK2-3 พบมากในบางจุดเท่านั้นรายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 12

ตารางที่ 12 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในโรงงานผลิตเอทานอล PK2

ลำดับ	ตัวอย่าง	Log CFU/ml	รหัสเชื้อ**		
			PK2-1	PK2-2	PK2-3
1	กากน้ำตาลเข้มข้นจากถังเก็บ	<0.5*	-	-	-
2	กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์	6.11	+	+	-
3	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังหมัก	7.65	+	+	+
4	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 1	7.71	+	-	-
5	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 2	6.81	+	+	-
6	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 3	6.63	+	-	-
7	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 4	6.15	+	-	-
8	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 5	5.86	+	-	+
9	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 6	5.56	+	-	+
10	น้ำหมักก่อนการกลั่น	5.38	+	-	+

หมายเหตุ

*มีหน่วยเป็น log cfu/g

**PK2-1 : โคโลนีสีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ

PK2-2 : โคโลนีสีเทา ใส กลม นูน ผิวเยิ้ม

PK2-3 : โคโลนีสีเทา แบน ขอบหยัก

\+ หมายถึง พบในปริมาณมาก

\- หมายถึงไม่พบ หรือพบในปริมาณน้อย

<u>โรงงาน DC ครั้งที่ 1</u>

โรงงานเอทานอลแห่งที่ 4 ได้แก่โรงงาน DC การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 (กำหนดรหัสเป็น DC1) นำมาจากจุดต่างๆ ของกระบวนการผลิตเช่นเดียวกับ 3 โรงงานที่กล่าวมาแล้ว ได้แก่ สารอาหาร (Diammonium phosphate) กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์และของถังหมัก กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์และจากถังหมัก และกากน้ำตาลเข้มข้น โดยมีจำนวนตัวอย่างรวม 13 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อบน MRS agar พบว่าทุกตัวอย่างยกเว้นกากน้ำตาลเข้มข้นมีแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนเช่นเดียวกัน โดยโคโลนีที่พบมากมีทั้งหมด 6 แบบ และกำหนดรหัสแต่ละไอโซเลตเป็น DC1-1 ถึง DC1-6 ดังนี้

-DC1-1 : สีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ

-DC1-2 : สีเทา แบน ขอบหยัก ผิวไม่เรียบ

-DC1-3 : ใส นูน กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก

-DC1-4 : ขาวขุ่น นูน ผิวมัน ขอบหยัก

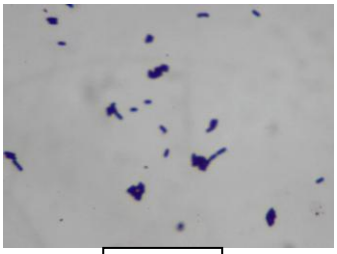
-DC1-5 : สีเทา กลม ของเรียบ ขนาดเล็ก

-DC1-6 : สีเทาขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ

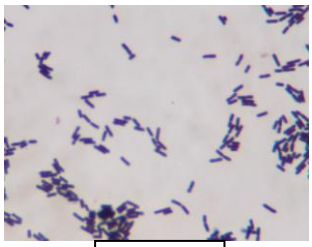
ลักษณะโคโลนี ผลการย้อมแกรมและการทดสอบคะตะเลสของแบคทีเรียแต่ละรหัสแสดงใน **ตารางที่** 13 ซึ่งสรุปได้ว่าทุกไอโซเลตจัดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก ลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียแต่ละไอโซเลต (DC1-1 ถึง DC1-6) เมื่อนำแต่ละไอโซเลตมาย้อมสีแกรมและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าทุกไอโซเลตเซลล์ติดสีแกรมบวก เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาดและความยาวแตกต่างกันไป และไม่มีสปอร์ ดังแสดงใน**ภาพที่** 7

ตารางที่ 13 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจากโรงงานเอทานอล DC ครั้งที่ 1

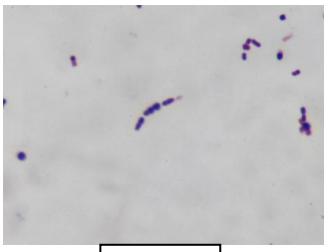
การทดสอบ	รหัสเชื้อ					
	DC1-1	DC1-2	DC1-3	DC1-4	DC1-5	DC1-6
ลักษณะโคโลนี	ขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ	เทา แบน ขอบหยัก ผิวไม่เรียบ	ใส นูน กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก	ขาวขุ่น นูน ผิวมัน ขอบหยัก	สีเทา กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก	สีเทาขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ
การย้อมแกรม	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน ขนาดเล็ก ปลายมน อยู่เดียว หรือเป็นคู่ ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ หรือสายยาว ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนสั้น เกือบกลม อยู่เดี่ยว เป็นคู่ หรือสายสั้น ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน ปลายมน ไม่มีสปอร์ อยู่เดี่ยวหรือเป็นคู่	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนสั้น ปลายมน อยู่เดี่ยวหรือเป็นคู่ ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อน อยู่เดียว ไม่มีสปอร์
คะตะเลส	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ



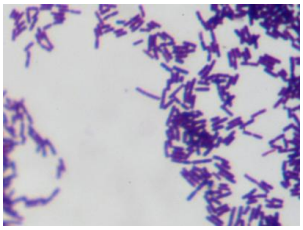
DC1-1



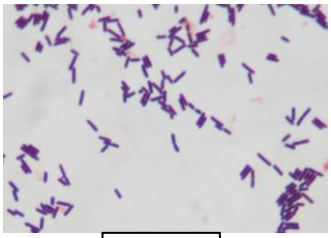
DC1-2



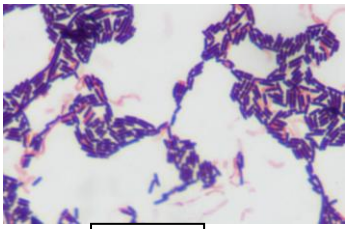
DC1-3



DC1-4



DC1-5



DC1-6

ภาพที่ 7 การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในโรงงานเอทานอล DC ครั้งที่ 1 (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

ตัวอย่างจากโรงงานเอทานอล DC ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 (DC1) แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมีปริมาณระหว่าง 5.50-8.54 log cfu/ml โดยในถังหมัก 6 ถัง พบในช่วง 5.50-8.04 log cfu/ml (ค่าเฉลี่ย 7.13 log cfu/ml) ในถังสารอาหารพบ 7.92 log cfu/ml ถังเลี้ยงยีสต์ 2 ถังพบ 8.54 และ 8.32 log cfu/ml ตามลำดับ ท่อผสมกากน้ำตาลของถังเลี้ยงยีสต์และของถังหมักพบ 7.62 และ 7.15 log cfu/ml ตามลำดับ และถังน้ำหมักก่อนการกลั่นพบ 7.04 log cfu/ml สำหรับกากน้ำตาลเข้มข้นนั้นพบแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยกว่า 0.5 log cfu/g เช่นเดียวกับในโรงงานอื่นๆ โดยแบคทีเรีย DC1-1 พบมากในทุกจุดที่เก็บตัวอย่าง ในขณะที่ไอโซเลตอื่นพบปริมาณมากในบางจุด รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 14**

ตารางที่ 14 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงานเอทานอล DC ครั้งที่ 1

ลำดับ	ตัวอย่าง	log cfu/ml	รหัสเชื้อ**					
			DC 1-1	DC 1-2	DC 1-3	DC 1-4	DC 1-5	DC 1-6
1	กากน้ำตาลเข้มข้นจากถังเก็บ	<0.5*	-	-	-	-	-	-
2	สารอาหารจากถังเตรียมสารอาหาร	7.92	+	-	+	-	-	-
3	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์	7.62	+	-	-	-	-	+
4	กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ 1	8.54	+	+	-	-	+	-
5	กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ 2	8.32	+	-	-	-	+	-
6	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังหมัก	7.15	+		+	+	-	
7	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 1	5.50	+	-	-	-	-	+
8	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 2	8.04	+	-	-	+	+	+
9	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 3	7.72	+	+	+	+	-	-
10	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 4	7.20	+	-	-	+	+	+
11	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 5	7.18	+	-	-	+	+	+
12	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 6	7.18	+	-	+	-	-	-
13	น้ำหมักก่อนการกลั่น	7.04	+	-	-	+	-	-

ตารางที่ 14 **(ต่อ)**

หมายเหตุ

* มีหน่วยเป็น log cfu/g

** DC1-1 : โคโลนีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ

DC1-2 : โคโลนีเทา แบน ขอบหยัก ผิวไม่เรียบ

DC1-3 : โคโลนีใส นูน กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก

DC1-4 : โคโลนีขาวขุ่น นูน ผิวมัน ขอบหยัก

DC1-5 : โคโลนีเทา กลม ขอบเรียบ ขนาดเล็ก

DC1-6 : โคโลนีเทา ขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ

\+ หมายถึง พบในปริมาณมาก

\- หมายถึง ไม่พบ หรือพบในปริมาณน้อย

<u>โรงงาน DC ครั้งที่ 2</u>

ตัวอย่างจากโรงงานเอทานอล DC ครั้งที่ 2 มีจำนวนรวม 10 ตัวอย่าง ได้แก่ กากน้ำตาลเข้มข้น กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์ จากท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์ ตัวอย่างน้ำหมักจากถังหมักจำนวน 5 ถัง และน้ำหมักก่อนการกลั่น นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar พบว่ามีโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกในทุกตัวอย่าง ยกเว้นในกากน้ำตาลเข้มข้นเช่นเดียวกับในการเก็บตัวอย่างครั้งอื่นๆ โดยโคโลนีลักษณะที่พบมากมี 4 แบบ และกำหนดรหัสแต่ละไอโซเลตเป็น DC2-1 ถึง DC2-4 ดังนี้

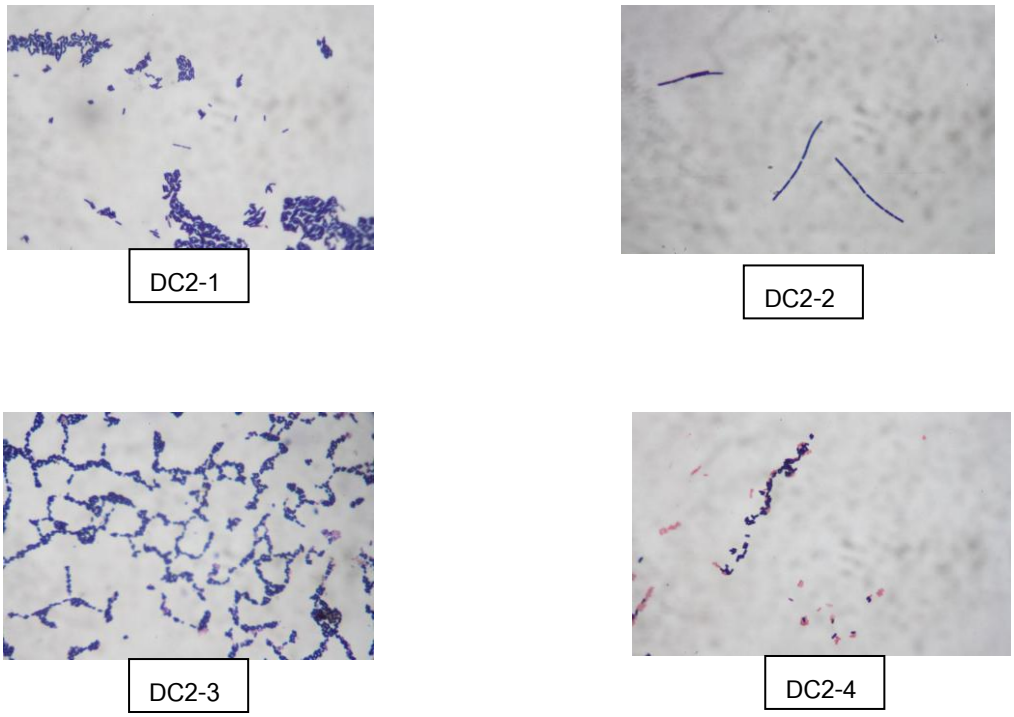
- DC2-1 : โคโลนีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ
- DC2-2 : โคโลนีสีเทา แบน ขอบหยัก ผิวไม่เรียบ
- DC2-3 : โคโลนีใส กลม นูน ขอบเรียบ ขนาดเล็ก
- DC2-4 : โคโลนีขาวขุ่น นูน ขอบหยัก ผิวมัน

ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ผลการย้อมแกรมและผลการทดสอบคะตะเลส แสดงใน**ตารางที่** 15 ซึ่งทั้งหมดให้ผลการทดสอบของแบคทีเรียกรดแลคติก

ตารางที่ 15 ลักษณะโคโลนีและการทดสอบเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจากโรงงานผลิตเอทานอล DC ครั้งที่ 2

การทดสอบ	**รหัสเชื้อ**			
	DC2-1	DC2-2	DC2-3	DC2-4
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ	โคโลนีสีเทา แบน ขอบหยัก ผิวไม่เรียบ	โคโลนีใส กลม นูน ขอบเรียบ ขนาดเล็ก	โคโลนีขาวขุ่น นูน ขอบหยัก ผิวมัน
การย้อมแกรม	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนสั้นปลายมน เรียงตัวแบบเดี่ยวและคู่ ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนค่อนข้างยาว เรียงตัวเป็นสาย ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนสั้นเกือบกลม เรียงตัวแบบเดี่ยว คู่ และสายสั้น ไม่มีสปอร์	เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปท่อนปลายมน เรียงตัวแบบเดี่ยว ไม่มีสปอร์
คะตะเลส	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ

ลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตแสดงใน**ภาพที่** 8 ซึ่งจะพบว่าเซลล์มีรูปร่างท่อน อยู่เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ยกเว้นไอโซเลต DC2-2 ที่เซลล์ต่อกันเป็นสายยาว



ภาพที่ 8 การติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในโรงงานเอทานอล DC ครั้งที่ 2 (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในตัวอย่างจากโรงงานเอทานอล DC ในครั้งที่ 2 มีปริมาณอยู่ในช่วง 6.00-8.40 log cfu/ml โดยพบในถังเลี้ยงยีสต์ปริมาณ 6.00 log cfu/ml ในท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์และของถังหมักพบ 8.40 และ 7.88 log cfu/ml ตามลำดับ สำหรับน้ำหมักจากถังหมัก 5 ถังนั้นพบแบคทีเรียปนเปื้อนในช่วง 7.48-7.95 log cfu/ml หรือเฉลี่ย 7.82 log cfu/ml ในขณะที่น้ำหมักก่อนการกลั่นพบ 7.34 log cfu/ml และพบน้อยกว่า 0.5 log cfu/g ในกากน้ำตาลเข้มข้น ไอโซเลต DC2-1 และ DC2-2 เป็นชนิดเด่นในเกือบทุกจุดที่เก็บตัวอย่าง ในขณะที่ไอโซเลต DC2-3 และ DC2-4 มีปริมาณมากเฉพาะในบางจุดเท่านั้น รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 16

ตารางที่ 16 ปริมาณและการแพร่กระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานผลิตเอทานอล DC ครั้งที่ 2

ลำดับ	ตัวอย่าง	Log cfu/ml	รหัสเชื้อ**			
			DC 2-1	DC 2-2	DC 2-3	DC 2-4
1	กากน้ำตาลเข้มข้นจากถังเก็บ	<0.5*	-	-	-	-
2	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์	8.40	+	+	+	-
3	กากน้ำตาลจากถังเลี้ยงยีสต์	6.00				
4	กากน้ำตาลจากท่อผสมของถังหมัก	7.88				
5	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 1	7.91	+	+	-	-
6	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 2	7.95	+	+	-	-
7	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 4	7.84	+	+	-	-
8	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 5	7.93	+	+	-	-
9	กากน้ำตาลจากถังหมักใบที่ 6	7.48	+	-	-	+
10	น้ำหมักก่อนการกลั่น	7.34	+	-	-	-

หมายเหตุ

*มีหน่วยเป็น log cfu/g

**DC2-1 : โคโลนีขาวขุ่น กลม นูน ขอบเรียบ

DC2-2 : โคโลนีสีเทา แบน ขอบหยัก ผิวไม่เรียบ

DC2-3 : โคโลนีใส กลม นูน ขอบเรียบ ขนาดเล็ก

DC2-4 : โคโลนีขาวขุ่น นูน ขอบหยัก ผิวมัน

\+ หมายถึง พบในปริมาณมาก

\- หมายถึงไม่พบ หรือพบในปริมาณน้อย

ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบ ณ จุดต่างๆ ของกระบวนการผลิตในโรงงานเอทานอลทั้ง 4 แห่ง สรุปได้ดัง**ตารางที่ 17** ซึ่งจะพบว่าโรงงานเอทานอลที่ทำการศึกษามีแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนในช่วง 5.38-8.43 log cfu/ml โดยในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตพบปริมาณแบคทีเรียใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 17 สรุปปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการผลิตเอทานอลของโรงงานที่ทำการศึกษา

โรงงาน	กากน้ำตาล	สารอาหาร	ท่อผสม (1)[a]	ถังเลี้ยงยีสต์	ท่อผสม (2)[b]	ถังหมัก[c]	น้ำหมัก[d]
PK1 #1	<0.5	6.42	7.89	7.76	7.69	7.12	7.85
PK1 #2	<0.5	-[e]	8.38	8.05	-	7.59	6.97
KL	<0.5	6.18	7.84	7.60	7.71	6.11	7.72
PK2	<0.5	-	-	6.11	7.65	6.45	5.38
DC #1	<0.5	7.92	7.62	8.43[f]	7.15	7.13	7.04
DC #2	<0.5	-	8.40	6.00	7.88	7.82	7.34

[a] ท่อผสมของถังเลี้ยงยีสต์ [b] ท่อผสมของถังหมัก [c] ค่าเฉลี่ยจากถังหมักทุกถัง
[d] น้ำหมักก่อนกลั่น [e] ไม่มีตัวอย่าง [f] ค่าเฉลี่ยจาก 2 ถัง

2. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการเก็บรวบรวมแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบปริมาณมาก (6-8 log cfu/ml) ในจุดต่างๆ ของกระบวนการผลิตเอทานอลของโรงงานเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ สามารถรวบรวมได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลต โดยได้มากจากโรงงาน PK1 (ทำการศึกษา 2 ครั้ง) จำนวน 9 ไอโซเลต โรงงาน PK2 จำนวน 3 ไอโซเลต โรงงาน KL จำนวน 4 ไอโซเลต และโรงงาน DC (จำนวน 2 ครั้ง) อีก 10 ไอโซเลต รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 18**

ตารางที่ 18 จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในโรงงานเอทานอลที่นำมาศึกษา

โรงงาน	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2		
	รหัส	จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต	รหัส	จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต
PK1	PK11	5	PK11-1 ถึง PK11-5	PK12	4	PK12-1 ถึง PK12-4
KL	KL	4	KL-1 ถึง KL-4	-	-	-
PK2	PK2	3	PK2-1 ถึง KL2-3	-	-	-
DC	DC1	6	DC1-1 ถึง DC1-6	DC2	4	DC2-1 ถึง DC2-4

ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตโดยใช้ชุดทดสอบชีวเคมีสำเร็จรูป API 50 CHL เพื่อหารูปแบบการใช้ substrate ของแบคทีเรีย โดยนำโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลตบน MRS agar เพาะลงในชุดทดสอบ API 50 CHL หลังบ่ม นำมาอ่านผล ถ้าแบคทีเรียใช้ substrate ชนิดใดได้จะอ่านเป็นผลบวก จากนั้นนำรูปแบบ (profile) การใช้ substrate ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ฐานข้อมูลใน software api version 5.1 ของบริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบ (Biomerieux, France) ซึ่งจะแสดงผลเป็นสปีชีส์ หรือจีนัสของแบคทีเรีย สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต (อีก 1 ไอโซเลตไม่สามารถจัดจำแนกได้เนื่องจากเชื้อเกิดการตาย) แบคทีเรียทั้งหมดจัดอยู่ใน 2 จีนัส ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* โดย 88% ของไอโซเลตทั้งหมดอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* และสามารถจัดจำแนกสปีชีส์ของ *Lactobacillus* ได้ทั้งหมด 7 สปีชีส์ ได้แก่ *L. plantarum 1, L. pentosus, L. rhamnosus, L. brevis 1, L. fermentum 2, L. rhamnosus* และ *L. buchneri* สำหรับ *Pediococcus* นั้น พบ 1 สปีชีส์ คือ *P. damnosus* รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่** 19 และผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก api software แสดงตัวอย่างใน**ภาคผนวก ข**

ตารางที่ 19 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่พบมากในโรงงานผลิตเอทานอลด้วยชุดทดสอบ API50 CHL

โรงงาน	รหัสเชื้อ	สปีชีส์	% Similarity
PK11 (โรงงาน PK1 ครั้งที่ 1)	PK11-1	*Lactobacillus plantarum 1*	99.1
	PK11-2	*Pediococcus damnosus*	99.8
	PK11-3	*Lactobacillus brevis 1*	97.2
	PK11-4	*Lactobacillus rhamnosus*	99.6
	PK11-5	*Lactobacillus buchneri*	97.2
PK12 (โรงงาน PK1 ครั้งที่ 2)	PK12-1	*Lactobacillus pentosus*	99.9
	PK12-2	*Pediococcus damnosus*	99.9
	PK12-3	No growth	-
	PK12-4	*Lactobacillus plantarum* 1	98.4
KL (โรงงาน KL)	KL-1	*Lactobacillus plantarum* 1	99.1
	KL-2	*Pediococcus damnosus*	99.8
	KL-3	*Lactobacillus rhamnosus*	99.6
	KL-4	*Lactobacillus buchneri*	97.2
PK2 (โรงงาน PK2)	PK2-1	*Lactobacillus plantarum 1*	99.9
	PK2-2	*Lactobacillus fermentum 2*	94.7
	PK2-3	*Lactobacillus rhamnosus*	99.9
DC1 (โรงงาน DC ครั้งที่ 1)	DC1-1	*Lactobacillus pentosus*	99.9
	DC1-2	*Lactobacillus plantarum 1*	99.9
	DC1-3	*Lactobacillus brevis 1*	92.3
	DC1-4	*Lactobacillus plantarum 1*	99.9
	DC1-5	*Lactobacillus pentosus*	99.9
	DC1-6	*Lactobacillus pentosus*	99.9

ตารางที่ 19 **(ต่อ)**

โรงงาน	**รหัสเชื้อ**	**สปีชีส์**	% Similarity
DC2 (โรงงาน DC ครั้งที่ 2)	DC2-1	*Lactobacillus pentosus*	99.9
	DC2-2	*Lactobacillus fermentum 2*	86.4
	DC2-3	*Lactobacillus pentosus*	99.9
	DC2-4	*Lactobacillus pentosus*	99.9

จาก**ตารางที่** 19 พบว่าแบคทีเรียที่จัดจำแนกได้ด้วยวิธีนี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อที่อยู่ในฐานข้อมูล (%similarity) ตั้งแต่ 86.4-99.9% โดยสปีชีส์ที่พบได้บ่อยที่สุด คือ *L. pentosus* พบถึง 7 ใน 25 ไอโซเลต รองลงมาคือ *L. plantarum 1* พบ 6 ใน 25 ไอโซเลต สำหรับสปีชีส์อื่นนั้นพบใน 2 ถึง 3 ไอโซเลต และเมื่อเปรียบเทียบผลจากการเก็บตัวอย่างซ้ำในโรงงานเดิมพบแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันด้วย ตัวอย่างเช่น โรงงาน DC พบ *L. pentosus, L. plantarum 1, L. brevis 1* ในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ก็พบ *L. pentosus* เช่นเดียวกับในครั้งที่ 1 แต่ไม่พบ *L. plantarum* และ *L. brevis 1*

บทที่ 4
สรุปและอภิปรายผล

สรุป

1. โรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบทั้ง 4 แห่งที่ทำการศึกษามีแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนในกระบวนการผลิต โดยมีจำนวนระหว่าง 5.38-8.43 log cfu/ml หรือประมาณ 5-8 log cfu/ml โดยพบในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต ยกเว้นในกากน้ำตาลเข้มข้นที่พบน้อยกว่า 0.5 log cfu/ml

2. แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีปริมาณมากที่พบมี 2 จีนัส ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* โดยเป็นจีนัส *Lactobacillus* 88% ของไอโซเลตทั้งหมด

3. สปีชีส์ของ *Lactobacillus* ที่พบ ได้แก่ *L. plantarum 1, L. pentosus, L. fermentum 2, L. brevis 1, L. rhamnosus* และ *L. buchneri* และสปีชีส์ของ *Pediococcus* ที่พบได้แก่ *P. damnosus* โดยพบ *L. pentosus* ได้บ่อยที่สุด

4. โรงงานบางแห่งที่ทำการศึกษาซ้ำยังคงพบแบคทีเรียกรดแลคติกในปริมาณสูงใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งแรก และสปีชีส์ที่พบบางส่วนก็เป็นสปีชีส์เดิมด้วย

อภิปรายผล

เป็นที่ทราบกันทั่วไปว่ากระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพในอุตสาหกรรมไม่ได้ดำเนินการในสภาวะปลอดเชื้อ จึงมักมีโอกาสพบจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อนได้เสมอ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ ยีสต์ชนิดอื่นและแบคทีเรีย โดยในกลุ่มของแบคทีเรียนั้น แบคทีเรียกรดแลคติกนับว่าพบได้มากที่สุดเนื่องจากสามารถปรับตัวได้ดีในสภาวะการหมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยทนต่อสภาวะมีออกซิเจนจำกัด ทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล ความเป็นกรดและเอทานอลในน้ำหมักได้ดี อีกทั้งโดยทั่วไปแบคทีเรียยังมีอัตราการเจริญสูงกว่ายีสต์ ดังนั้นในช่วงที่เจริญร่วมกับยีสต์แบคทีเรียจึงมีโอกาสเพิ่มจำนวนขึ้นจนมีความหนาแน่นใกล้เคียงหรือสูงกว่ายีสต์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลของยีสต์ลดต่ำลง นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์จากการสลายน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น กรดแลคติกและกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ยังมีผลยับยั้งเมตาบอลิซึมของยีสต์ด้วยเหตุดังกล่าวการมีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญร่วมกับยีสต์ในการผลิตเอทานอลจึงส่งผลเสียต่อการผลิต ทำให้ได้ความเข้มข้น อัตราการผลิตและประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลต่ำลง ซึ่งในบาง

กรณีผลกระทบดังกล่าวอาจมีความรุนแรงจนไม่สามารถดำเนินการผลิตต่อไปได้ และต้องหยุดการผลิตเพื่อหาสาเหตุและแก้ไขปรับปรุงกระบวนการก่อนที่จะเริ่มการผลิตใหม่ ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย จึงส่งผลเสียต่อเศรษฐศาสตร์การผลิต (Muthaiyan & Ricke, 2010)

ไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่มีนโยบายสนับสนุนการใช้เอทานอลชีวภาพเพื่อเป็นเชื้อเพลิงทดแทนเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม โดยกำหนดเป้าหมายการใช้เอทานอลเพื่อการดังกล่าว 2.4 ล้านลิตรต่อวัน ในปี 2554 และเพิ่มขึ้นเป็นวันละ 9 ล้านลิตรภายในปี 2564 ในขณะที่ปัจจุบันโรงงานผลิตเอทานอลที่มีอยู่จำนวน 21 แห่ง มีกำลังการผลิตเอทานอลรวมประมาณ 4 ล้านลิตรต่อวัน จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าจะต้องมีการเพิ่มกำลังการผลิตเอทานอลขึ้นเพื่อให้เป็นไปตามเป้าหมาย ซึ่งการเพิ่มผลผลิตเอทานอลโดยการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตก็เป็นอีกแนวทางหนึ่ง แนวทางการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลอาจใช้วิธีลดโอกาสการปนเปื้อนโดยการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออุปกรณ์ก่อนเริ่มการผลิตรวมทั้งการพาสเจอร์ไรซ์วัตถุดิบเพื่อลดปริมาณเชื้อปนเปื้อน แต่การฆ่าเชื้อวัตถุดิบไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายสูง ในโรงงานที่ใช้กระบวนการหมักแบบที่มีการนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ซ้ำจะลดเชื้อปนเปื้อนโดยการล้างเซลล์ยีสต์ด้วยกรดซัลฟุริก (Amorim et. al., 2011) นอกจากนั้นในโรงงานบางแห่งยังมีการเติมยาปฏิชีวนะลงในถังหมักเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น ยากลุ่ม penicillin, streptomycin, verginiamycin และ monensin เป็นต้น (Muthaiyan & Ricke, 2010) สำหรับโรงงานเอทานอลของไทยนั้นมีข้อมูลว่าบางโรงงานใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม monensin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในถังหมักเอทานอล โดยยาปฏิชีวนะกลุ่มดังกล่าวมีความไวต่อแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการเติมยาปฏิชีวนะในน้ำหมักจะสามารถลดระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียให้ไม่ส่งผลเสียต่อการหมักได้แต่ก็อาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียบางสายพันธุ์หากใช้ยาชนิดและความเข้มข้นไม่เหมาะสม ดังนั้น การศึกษาว่าแบคทีเรียชนิดใดพบได้มากในโรงงานเอทานอลจึงเป็นแนวทางไปสู่การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารยับยั้งที่ออกฤทธิ์ตรงกับแบคทีเรียเป้าหมายมากขึ้น จึงนำมาสู่การสำรวจการปนเปื้อนแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานเอทานอลของโครงการวิจัยนี้

โรงงานเอทานอลที่เป็นเป้าหมายของการสำรวจในโครงการวิจัยเป็นโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตเนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีสัดส่วนการใช้ในการผลิตมากที่สุด โดยเลือกศึกษาในโรงงานทั้งหมด 4 แห่งที่ได้รับความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆ ทั้งกระบวนการผลิต

โดยโรงงาน 3 แห่งตั้งอยู่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนอีก 1 แห่งตั้งอยู่ในเขตภาคกลาง และมี 2 โรงงานที่เก็บตัวอย่างมาศึกษาซ้ำ 2 รอบ มีรายงานว่าโรงงานทั้ง 4 แห่ง ใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม monensin เพื่อยับยั้งแบคทีเรียปนเปื้อนเป็นครั้งคราว และใช้กระบวนการหมักแบบ sequential-batch ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ใช้ถังหมักหลายถังต่อเนื่องกันเป็นลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการหมักรวมประมาณ 48 ชั่วโมงก่อนที่จะนำน้ำหมักในขั้นสุดท้ายไปกลั่นแยกเอทานอล

ตัวอย่างที่ศึกษานำมาจากขั้นตอนต่างๆ เริ่มตั้งแต่ขั้นการเลี้ยงยีสต์เพื่อเป็นหัวเชื้อ (ถัง prefermentation) ขั้นการหมักเอทานอลในถังหมักแต่ละถัง ขั้นการเก็บน้ำหมักก่อนการกลั่น รวมทั้งนำสารอาหารเพิ่มเติม (ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส) และกากน้ำตาลเข้มข้นจากถังเก็บมาศึกษาด้วยเพื่อให้ทราบว่ากากน้ำตาลที่เป็นวัตถุดิบตั้งต้นเป็นแหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกหรือไม่ ซึ่งผลการแยกเชื้อพบแบคทีเรียกรดแลคติกในทุกจุดของกระบวนการผลิตในทุกโรงงานที่นำมาศึกษา ทั้งในถังเตรียมสารอาหาร ถังเตรียมหัวเชื้อยีสต์ ท่อขนถ่ายระหว่างถัง ถังหมักทุกถัง และถังเก็บน้ำหมักก่อนนำไปกลั่น โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 5-8 log cfu/ml ยกเว้นกากน้ำตาลเข้มข้นที่ไม่พบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในทุกโรงงานประกอบด้วย 2 จีนัส คือ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* โดยพบจีนัส *Lactobacillus* ได้มากกว่าจีนัส *Pediococcus* สอดคล้องกับที่มีรายงานการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานหลายๆ แห่งของประเทศอื่นที่พบว่า *Lactobacillus* เป็นจีนัสที่มีรายงานการพบได้มากที่สุดในโรงงานเอทานอลเช่นเดียวกัน (Muthaiyan & Ricke, 2010) รวมทั้งสอดคล้องกับรายงานที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัย (ศิริโฉม ทุ่งเก้า, 2554)

การที่จีนัสของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ไม่มีความหลากหลายโดยพบเพียง 2 จีนัสนั้น คาดว่าเกิดจากสาเหตุหลายประการ เป็นไปได้ว่าโรงงานเอทานอลที่นำมาศึกษามีการเติมยาปฏิชีวนะลงในน้ำหมักจึงทำให้แบคทีเรียบางจีนัสถูกยับยั้งและเหลือเฉพาะจีนัสที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะที่ใช้เท่านั้น อย่างไรก็ตามการที่โรงงานมีการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดดังกล่าวแต่ยังคงพบแบคทีเรียกรดแลคติกในปริมาณสูงถึง 5-8 log cfu/ml ชี้ให้เห็นว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้ไม่สามารถกำจัดแบคทีเรียกรดแลคติกให้หมดไปจากน้ำหมักได้ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ในความเข้มข้นไม่มากพอ หรือเชื้อเกิดการดื้อยาเนื่องจากใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน อย่างไรก็ตามการที่แยกเชื้อได้เพียง 2 จีนัสไม่ได้หมายความว่ามีเฉพาะแบคทีเรีย 2 จีนัสนี้เท่านั้นที่มีอยู่ในโรงงานเอทานอล เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะแยกเชื้อ (MRS agar) อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

กรดแลคติกทุกจีนัสที่มีอยู่ นอกจากนั้นอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียจีนัสอื่นมีอยู่แต่มีในปริมาณน้อยจนวิธีการที่ใช้ไม่สามารถแยกเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อนำไปจัดจำแนกต่อได้ หรือแบคทีเรียบางจีนัสอาจอยู่ในรูปที่มีชีวิตแต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ หรือเรียกว่า “viable but nonculturable state” เนื่องจากมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์เมื่ออยู่ในเบียร์เป็นระยะเวลานานๆ จะสูญเสียความสามารถในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Suzuki et. al., 2006) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ก็ได้แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus* และ *Pediococcus* เป็นแบคทีเรียชนิดเด่นที่พบในโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิต

การที่พบ *Lactobacillus* ได้ในปริมาณมากและพบในทุกโรงงานนั้นแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจีนัสนี้สามารถทนต่อสภาวะในถังหมักเอทานอลได้ดี เนื่องจากในถังหมักเอทานอลนั้นนอกจากจะมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (12-30°Brix) แล้ว ยังมีความเป็นกรด มีออกซิเจนต่ำ มียาปฏิชีวนะรวมทั้งมีเอทานอลที่ยีสต์ผลิตออกมาด้วย มีรายงานว่า *Lactobacillus* บางสปีชีส์ ทนต่อสภาวะการมีสารอาหารจำกัด การมีเซลล์ความหนาแน่นสูงและการมียาปฏิชีวนะในกากน้ำตาลได้ดี โดยในการปรับตัวเซลล์จะเปลี่ยนจากรูปท่อนไปเป็นรูปค่อนข้างกลมคล้ายโครงสร้างที่เรียกว่า “ซิสต์” (cyst-like dormant cell) ซึ่งทำให้สามารถรอดชีวิตได้ดีขึ้น (Golod et. al., 2009) สำหรับ *Pediococcus* นั้นก็เป็นจีนัสที่มีความสำคัญเช่นเดียวกันเนื่องจากสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในโรงงานผลิตเอทานอล เช่น Penicillin, Verginiamycin ได้เช่นเดียวกัน (Heist, 2015)

จำนวนและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานเอทานอลขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ผลิต กระบวนการเตรียมวัตถุดิบ รวมทั้งพื้นที่ตั้งของโรงงาน In-Seop et. al. (1995) รายงานว่าโรงงานเอทานอลของเกาหลีที่ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบพบ *Lactobacillus fermentum* และ *L. casei* เป็นชนิดเด่น ในขณะที่เมื่อใช้ข้าวบาร์เล่ย์เป็นวัตถุดิบพบ *L. fermentum* และ *L. salivarius* ได้มาก ในสหรัฐอเมริกา โรงงานเอทานอลซึ่งใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตพบแบคทีเรียปนเปื้อนตั้งแต่ขั้นตอนการสกัดแป้งจากเมล็ดข้าวโพดและการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จนถึงในถังหมักเอทานอล และมีความแตกต่างกันระหว่างโรงงานที่ใช้วิธีเตรียมวัตถุดิบแบบ wet mill และแบบ dry grain โดยจำนวนแบคทีเรียที่พบในโรงงาน wet mill มีจำนวนอยู่ในช่วง 5-6 log cfu/ml และ *Lactobacillus* เป็นจีนัสที่พบในสัดส่วนมากที่สุด คือ 44-60% ของแบคทีเรียทั้งหมด ในขณะที่โรงงาน dry grind มีแบคทีเรียปนเปื้อนในช่วง 4-8 log log cfu/ml

รวมทั้งพบ *Lactobacillus* ในสัดส่วนมากที่สุดเช่นเดียวกัน แต่สปีชีส์ที่พบในแต่ละโรงงานแตกต่างกันไป และแม้กระทั่งในโรงงาน dry grind เช่นเดียวกันแต่ตั้งอยู่ต่างพื้นที่กันก็พบปริมาณและชนิดแบคทีเรียปนเปื้อนแตกต่างกัน โดยผู้วิจัยคาดว่าเป็นเพราะวิธีปฏิบัติต่อวัตถุดิบของแต่ละโรงงานแตกต่างกัน นอกจากนั้นโรงงานที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะ (verginiamycin) ในการควบคุมแบคทีเรียปนเปื้อนแบคทีเรียที่พบจะมีความหลากหลายน้อยกว่าโรงงานที่ไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ (Skinner & Leathers, 2004)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเป็นแหล่งที่มาแหล่งหนึ่งของแบคทีเรียที่พบในกระบวนการผลิตของโรงงานเอทานอล Leja & Broda (2009) แยกแบคทีเรียได้จากข้าวโพด ข้าวฟ่างและข้าวไรน์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลของโรงงานที่ตั้งอยู่ในประเทศโปแลนด์ โดยวัตถุดิบแต่ละชนิดพบชนิดและปริมาณแบคทีเรียแตกต่างกันหรือแม้แต่วัตถุดิบชนิดเดียวกันก็พบชนิดและปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนแตกต่างกันหากมีการเตรียมและการปฏิบัติต่อวัตถุดิบไม่เหมือนกัน สำหรับโรงงานเอทานอลที่ทำการสำรวจในโครงการวิจัยนี้ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบซึ่งแม้ว่าจะไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้จากกากน้ำตาลดังกล่าว แต่ก็ไม่หมายความว่าในกากน้ำตาลไม่มีโอกาสพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย มีรายงานว่าน้ำอ้อยมีแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อน (Sobrun et. al., 2012) ดังนั้นในโรงงานผลิตน้ำตาลย่อมเป็นแหล่งสะสมของแบคทีเรียชนิดต่างๆ รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก แม้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในกากน้ำตาลเนื่องจากมีแรงดันออสโมติกสูงเนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาล แต่เมื่อกากน้ำตาลถูกเจือจางด้วยน้ำเพื่อเตรียมเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ในขั้นการเตรียมหัวเชื้อและในขั้นการหมักก็มีโอกาสที่แบคทีเรียกรดแลคติกจะเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นได้ เนื่องจากเมื่อเจือจางแล้วไม่มีการนำกากน้ำตาลไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนก่อนนำไปใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากทิ้งกากน้ำตาลที่เจือจางไว้เป็นเวลานานแบคทีเรียก็มีโอกาสเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นเป็นลำดับ ดังจะเห็นได้จากจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในกากน้ำตาลที่มาจากถังเลี้ยงยีสต์ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 6-7 log cfu/ml ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะถูกส่งผ่านต่อไปยังถังหมักเป็นลำดับทำให้ในน้ำหมักมีแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณสูงเช่นเดียวกัน แม้กระทั่งในถังหมักใบสุดท้ายก่อนที่จะนำน้ำหมักไปกลั่นซึ่งยีสต์ได้ผลิตเอทานอลจนมีความเข้มข้นสูงถึง 8-10% แล้ว ก็ยังคงพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในระดับสูงเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นความสามารถในการปรับตัวให้ทนต่อความเข้มข้นเอทานอลของแบคทีเรียกลุ่มนี้

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียจีนัสที่พบได้มากในโรงงานทุกแห่งที่ศึกษาแต่สปีชีส์ที่พบมากในโรงงานแต่ละแห่งอาจแตกต่างกันบ้าง ตัวอย่างเช่น โรงงานเอทานอล PK1 สปีชีส์ที่พบมาก *ได้แก่ L. plantarum, L. brevis, L. rhamnosus*, และ *L. buchneri* ในขณะที่โรงงานเอทานอล DC พบ *L. pentosus, L. brevis 1* และ *L. plantarum 1* (**ตารางที่** 19) แต่โดยรวมแล้วสปีชีส์ที่พบได้บ่อยที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ *L. pentosus* เนื่องจากพบถึง 22 จาก 25 ไอโซเลตที่รวบรวมได้ หรือคิดเป็น 88% สปีชีส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่นเดียวกันรวมทั้งชนิดของวัตถุดิบ กระบวนการผลิตรวมทั้งสภาพแวดล้อม ดังเช่นมีรายงานว่า *L. vini* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ปนเปื้อนในโรงงานเอทานอลของสวีเดนที่ใช้แป้งจากข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบ (Passort et. al., 2007) Skinner et. al. (2004) พบว่า *L. delbrueckii* เป็นสปีชีส์เด่นที่สุดในโรงงานผลิตเอทานอลจากข้าวโพดที่ใช้วิธีการเตรียมข้าวโพดแบบ wet mill ในอเมริกา รวมทั้งพบ *Lactobacillus* อีกมากกว่า 10 สปีชีส์ แต่ในโรงงานที่ใช้วิธีการเตรียมข้าวโพดแบบ dry grind พบ *L. lactis* เป็นสปีชีส์เด่นร่วมรวมทั้งพบ *Lactocacillus* อีกหลายสปีชีส์เช่นเดียวกัน

จะเห็นได้ว่า *Lactobacillus* เป็นจีนัสของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้มากในโรงงานเอทานอลที่ทำการศึกษา โดยแต่ละจุดในขั้นตอนการผลิตของแต่ละโรงงานพบปริมาณแบคทีเรียใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าเกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียตลอดทั้งกระบวนการหมักตั้งแต่ในถังเตรียมสารอาหารเพิ่มเติม ในถังที่เลี้ยงยีสต์และในถังหมัก รวมทั้งในท่อขนถ่ายที่เชื่อมต่อกับส่วนต่างๆ ของกระบวนการผลิต ทำให้เป็นการยากที่จะหาจุดเริ่มต้นของการปนเปื้อนแบคทีเรีย ซึ่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นไปได้นอกจากกากน้ำตาลที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตแล้ว ยังอาจมาจากสิ่งแวดล้อมเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้ในพืชผัก อาหาร น้ำและสิ่งแวดล้อมทั่วไป (Stiles & Holzapfel, 1997) และเนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพดังกล่าวไม่ได้ดำเนินการในสภาวะปลอดเชื้อ ดังนั้น แบคทีเรียจึงมีโอกาสปนเปื้อนในขั้นตอนต่างๆ ได้ตลอดเวลา ยิ่งไปกว่านั้นแบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า “ไบโอฟิล์ม” บนพื้นผิววัสดุชนิดต่างๆ ได้จึงยากต่อการกำจัดด้วยการล้างหรือการใช้ยาปฏิชีวนะแบบปกติ เนื่องจากโครงสร้างดังกล่าวทำให้แบคทีเรียทนต่อสภาวะไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น (Kubota et. al., 2008) ส่งผลให้มีเชื้อเหลืออยู่ในระบบแบบเรื้อรัง และเมื่อเริ่มการผลิตอีกรอบหนึ่งแบคทีเรียเหล่านี้ก็พร้อมที่จะกลับมาปนเปื้อนได้อีก ดังจะเห็นได้จากผลการสำรวจแบคทีเรียซ้ำในโรงงานเดิม ตัวอย่างเช่น โรงงาน PK1 การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 พบแบคทีเรียกรดแลคติกในช่วง 6.42-7.89 log cfu/ml (**ตารางที่** 6) และในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 พบเชื้อปริมาณ 6.97-8.38 log cfu/ml (**ตารางที่** 8) และพบสปีชีส์เดิมในการเก็บ

ตัวอย่างแต่ละครั้ง เช่น *Lactobacillus plantarum* 1 และ *Pediococcus damnosus* หรือในโรงงาน DC ครั้งที่ 1 พบเชื้อปริมาณ 5.50-8.54 log cfu/ml (**ตารางที่ 14**) ครั้งที่ 2 พบ 6.00-8.40 log cfu/ml (**ตารางที่ 16**) และพบสปีชีส์ *L. pentosus* ในทั้งสองครั้ง

อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจะค่อนข้างสูงแต่การทำให้น้ำหมักปราศจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นไม่ใช่จุดมุ่งหมายของโรงงานเอทานอล ทั้งนี้เนื่องจากต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูงจึงไม่คุ้มค่าในการผลิต ด้วยเหตุดังกล่าว โรงงานจึงเพียงเฝ้าระวังเพื่อติดตามและควบคุมปริมาณแบคทีเรียไม่ให้สูงจนมีผลเสียต่อการผลิตเท่านั้น อย่างไรก็ดี การทราบข้อมูลการแพร่กระจายทั้งชนิดและปริมาณแบคทีเรียในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำให้ผู้ที่เกี่ยวข้องตระหนักและหาวิธีการที่เหมาะสมในการควบคุมและจำกัดปัญหาการปนเปื้อนได้อย่างเหมาะสมเพื่อลดความเสี่ยงในการสูญเสียรวมทั้งเพิ่มผลผลิตเอทานอลชีวภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอต, สมพร อิศวิลนนท์, เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, โอภาส กำเพ็ง, ถาวร ขั้นตระกูล, มนตรี เรืองสิงห์ และรจเรข ชคทันต์บดี. (2550). *สถานภาพการผลิตหัวมันสำปะหลังและคุณภาพหัวมันสำหรับการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2557ก). *โรงงานเอทานอลที่ดำเนินการผลิตแล้วและโรงงานเอทานอลที่อยู่ระหว่างการดำเนินการ*. วันที่ค้นข้อมูล 21 ธันวาคม 2557, เข้าถึงได้จาก http://www.dede.go.th/dede/images/stories/bioethanol/ethanol_listes.pdf

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2557ข). คู่มือการพัฒนาและการลงทุนผลิตพลังงานทดแทนชุดที่ 7 เชื้อเพลิงเอทานอล. วันที่ค้นข้อมูล 10 มกราคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://webkc.dede.go.th/testmax/sites/default/files/%E0%B9%80%E0%B8%8A%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B9%80%E0%B8%9E%E0%B8%A5%E0%B8%B4%E0%B8%87%20%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%97%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%AD%E0%B8%A5.pdf

นคร ทิพยาวงศ์. (2553). *เทคโนโลยีการแปลงสภาพชีวมวล*. กรุงเทพฯ: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น).

บริษัทไทยชูการ์มิล จำกัด. (2557). การหีบอ้อยปี 2555/56. วันที่ค้นข้อมูล 10 มกราคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://www.thaisugarmill.com/index.php?lang=th&ds=canemovement_detail-view&id=sErueKzv74N3G8ym

ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2554). *จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลอ้อยและผลกระทบต่อการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง*. โครงงานวิจัย, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

Amorim, H. V., Lopes, M. L., de Castro Oliveira, J. V., Buckeridge, M. S. & Goldman, G. H. (2011). Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91: 1267-1275.

Bai, F. W., Anderson, W. A. & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies

from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 28, 89-105.

Balat, M. & Balat, H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*. 86: 2273-2282.

Beckner, M., Ivey, M. L. & Phister, T. G. (2011). Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*. 53: 384-394.

Demain, A. L. (2009). Biosolutions to the energy problem. *Jornal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36: 319-332.

de Oliva-Neto, P., & Yokoya, F. (2001). Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 10-14.

Golod, N. A., Loiko, N. G., Mulyukin, A. L., Neiymatov, A. L., Vorobjeva, L. J., Shannonko, E. F., Gal'chenko, V. F. & El-Registan, G. I. (2009). Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions. *Microbiology*. 78: 280-289.

Heist, P. (2009). Identifying, controlling the most common microbial contaminants. In: *Ethanol Producer Magazine*. Retrieved January 16, 2015, from http://www.ethanolproducer.com/article.jsp?article_id=5464\

In-Seop, C., Kim, B. H., Shin, P. K. & Lee, W. K. (1995). Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 5: 309-314.

Kaseno & Kokugan, T. (1997). The effect of molasses pretreatment by ceramic microfiltration membrane on ethanol fermentation. *Fermentation and Bioengineering*. 6: 577-582.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H. & Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106: 381-386.

Leja, K. & Broda, M. (2009). The occurrence and identification of microbiological contamination on fuel ethanol production. *Acta Science Poland Technology Aliment*, 8(4), 25-31.

Lucena, B. T. L., Santos, B. M., Moreira, J. L. S., Moreira, A. P. B., des Nunes, A. C.,

Azevedo, V., Miyoshi, A., Thompson, F. L. & de Morais Junior, M. A. (2010). Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*. 10: 298.

Lushia, W., & Heist, P. (2005). Antibiotic Resistant Bacteria in Fuel Ethanol Fermentations. In *Ethanol Producer Magazine*. Retrieved August 12, 2014, from http://www.ethanolproducer.com/article-print.jsp?article_id=511

Muthaiyan, A. & Ricke, S. C. (2010). Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermentors. *Bioresource Technology*. 13: 5033-5042.

Nguyen, T. L., Gheewala, S. H. & Garivart, S. (2008). Full chain energy analysis of fuel ethanol from cane molasses in Thailand. *Applied Energy*. 85, 722-734.

Passoth, V., Blomqvist, J. & Schnurer, J. (2007). *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 4354-4356.

Skinner, K. A., & Leathers, T. D. (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 401-408.

Sobrun, Y., Bhaw-Luximon, A., Jhurry, D. & Puchooa, D. (2012). Isolation of lactic acid bacteria from sugar cane juice and production of lactic acid from selected improved strain. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3: 398-407.

Stiles, M. E. & Hotzpfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36:1-29.

Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., Kuriyama, H. & Kitagawa, Y. (2006). Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Institute of Brewing*. 112: 295-301.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

MRS agar + 100 mg/l Cycloheximide

การเตรียม MRS agar

MRS agar มีส่วนผสม ดังนี้ (Difco & BBL Manual, 2009)

-Proteose peptone	10 g/l
-Beef extract	10 g/l
-Yeast extract	5 g/l
-Dextrose	20 g/l
-Polysorbate 80	1 g/l
-Ammonium citrate	2 g/l
-Sodium acetate	5 g/l
-Megnesium sulfate	0.1 g/l
-Manganese sulfate	0.05 g/l
-Dipotassium phosphate	2 g/l
-Agar	15 g/l

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร หรือละลายอาหารครบสูตรแบบแห้ง 70 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนจนวุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Cycloheximide

ละลาย cycloheximide 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองส่วนผสมผ่านเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 µm จะได้สารละลายยา cycloheximide ความเข้มข้น 1 g/100 ml หรือ 1000 mg/100 ml

การผสม

เติมสารละลายยา cycloheximide 10 มิลลิลิตร ลงใน MRS agar ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส) 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ MRS agar ที่มี cycloheximide 100 mg/l

MRS broth (Difco & BBL Manual, 2009)

มีส่วนผสมดังนี้

-Proteose peptone	10	g/l
-Beef extract	10	g/l
-Yeast extract	5	g/l
-Dextrose 20		g/l
-Polysorbate 80	1	g/l
- Ammonium citrate	2	g/l
-Sodium acetate 5		g/l
-Megnesium sulfate 0.1		g/l
-Manganese sulfate	0.05	g/l
-Dipotassium phosphate	2	g/l

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดหรือชั่งอาหาร ครบสูตรแบบแห้ง 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ API 50CHL

จากการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอล โดยใช้ชุดทดสอบ API 50CHL หลังเติมเชื้อลงในหลอดทดสอบและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลดัง**ภาพที่** 9 ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย software version *Lactobacillus pentosus* ดังตัวอย่างที่แสดงในหน้าถัดไป

ภาพที่ 9 ลักษณะของหลอดทดสอบใน API 50CHL หลังเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและบ่มนาน 48 ชั่วโมง

Company	Microbiolo	Burapha l	City	Chonburi	
REFERENC	-	DATE	######	COMMENT	-

Strip	Profile	Identificati	Taxon	% ID	T index	Type	Test again	Value
API 50 CH	-+--+++--	EXCELLEN	Lactobacill	99.9	0.78	Significant	MLZ	25
API 50 CH	-+--+++--	EXCELLEN	Lactobacill	0.1	0.41	Next	GLY	1

Test again	Value	Test again	Value
GEN	99		
DXYL	2	GEN	98