รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

อุบัติการณ์และแนวทางเพื่อนำไปสู่การควบคุมการปนเปื้อน แบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงของประเทศไทย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802384
สัญญาเลขที่ 28/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

อุบัติการณ์และแนวทางเพื่อนำไปสู่การควบคุมการปนเปื้อน
แบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง
ของประเทศไทย

หัวหน้าโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริโฉม ทุ่งเก้า
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กุมภาพันธ์ 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ รหัสโครงการ 2558A10802384 เลขที่สัญญา 28/2558 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณนิสิตสาขาวิชาจุลชีววิทยาที่มีส่วนร่วมในโครงการวิจัยนี้และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือพื้นฐานและอุปกรณ์บางชนิดสำหรับการดำเนินโครงการวิจัย

ศิริโฉม ทุ่งเก้า
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 20 ไอโซเลตที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบซึ่งจัดจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ได้เป็น *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus farraginis* และ *Lactobacillus rhamnosus* และ *Lactobacillus* sp. มาทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ Kamoran และ Erythromycin และต่อสารเคมี 1 ชนิด ได้แก่ Hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยวิธี Macrobroth dilution พบว่าแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลตมีค่า MIC ต่อยา Kamoran >100 ppm มีค่า MIC ต่อยา Erythromycin ระหว่าง <0.1 ถึง >50 ppm และมีค่า MIC ต่อ H2O2 ระหว่าง <1 ถึง >400 ppm เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกผสมโดยสารทดสอบแต่ละชนิดในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบพบว่าสารแต่ละชนิดมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกผสมได้ แต่เมื่อเติมยา Kamoran ที่ความเข้มข้น 5 ppm ในกากน้ำตาลที่มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผสมไม่ทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น การทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมชนิด 304 ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตในกากน้ำตาล หาปริมาณไบโอฟิล์มด้วยวิธี viable plate count พบว่า 11 ใน 20 ไอโซเลตสร้างไบโอฟิล์มได้เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง โดยความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มแตกต่างกันตามสปีชีส์และสายพันธุ์ของแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกผสมสร้างไบโอฟิล์มร่วมกับยีสต์บนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองได้โดยความหนาแน่นของไบโอฟิล์มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี viable plate count และจากกล้องอิเลคตรอนแบบส่องกราด

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก, เอทานอล, กากน้ำตาล, การยับยั้ง, ไบโอฟิล์ม

Abstract

In this research 20 isolates of lactic acid bacteria contaminated in the commercial plants producing ethanol from molasses, identified using 16S rRNA gene analysis as belonging to *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus farraginis, Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus* sp., were tested for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against Kamoran, Erythromycin and hydrogen peroxide using a macrobroth dilution method. All 20 isolates showed >100 ppm MIC to Kamoran, <0.1 to >50 ppm MIC to Erythromycin and <1 to >400 ppm to hydrogen peroxide. The inhibitory activity of each substance towards mixed lactic acid bacteria under a simulated ethanol fermentation was also revealed. However, the addition of 5 ppm Kamoran in molasses containing mixed bacteria caused no advantage of ethanol production by yeasts. The ability to form biofilm of individual isolate of lactic acid bacteria on type 304 stainless steel in molasses was also conducted. Using a viable plate count method to quantify the amount of biofilm, it was found that 11 of 20 isolates formed biofilm with varying amounts depending on species and strain after incubation for 48 h. In addition, under simulated ethanol fermentation biofilm formation of mixed biofilm comprising lactic acid bacteria and yeasts was formed on this tested material. The density of this mixed biofilm increased by incubation time as revealed by both viable plate count and scanning electron microscopic methods.

Keywords: Lactic acid bacteria, Ethanol, Molasses, Inhibition, Biofilm

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญภาพ	v
สัญลักษณ์และคำย่อ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
การทบทวนวรรณกรรม	3
วัตถุประสงค์	7
ขอบเขตการวิจัย	8
ประโยชน์ที่จะได้รับ	8
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป	9
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	10
วิธีดำเนินการวิจัย	10
ผลการวิจัย	22
บทที่ 3 อภิปรายผลการวิจัย	38
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	45

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงานผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA	23
2	ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ต่อ Kamoran, Erythromycin และ Hydrogen peroxide ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงานผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล เมื่อทดสอบในอาหาร MRS broth ด้วยวิธี Macrobroth dilution	24
3	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มี Kamoran 5 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	25
4	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มียา Erythromycin เข้มข้น 5 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	26
5	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มี hydrogen peroxide เข้มข้น 100 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	28
6	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่เติมยา Kamoran 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมยา Kamoran และชุดที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสม เมื่อทดสอบในสภาวะการหมักจำลองในกากน้ำตาล บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 96 ชั่วโมง	29
7	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran 5 ppm และที่ไม่เติมยา Kamoran ที่เวลาต่างๆ เมื่อทดสอบในสภาวะการหมักจำลองที่อุณหภูมิ 30°C	30
8	ปริมาณยีสต์ในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran 5 ppm และที่ไม่เติมยา Kamoran เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อบ่มในสภาวะการหมักจำลองที่อุณหภูมิ 30°C	32
9	ปริมาณไบโอฟิล์มบนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวจำนวน 20 ไอโซเลต เมื่อบ่มในกากน้ำตาลเป็นเวลา 96 ชั่วโมง	33
10	ปริมาณไบโอฟิล์ม (log cfu/cm2) ของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์บนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง เมื่อบ่มเป็นระยะเวลาต่างกัน	35

สารบัญภาพ

ภาพที่	ชื่อภาพ	หน้า
1	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกและปริมาณยีสต์ในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran ความเข้มข้น 5 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	26
2	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มียา Erythromycin 5 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	27
3	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มี hydrogen peroxide 100 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	28
4	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่เติมยา Kamoran 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมยา Kamoran และชุดที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสม เมื่อทดสอบในสภาวะการหมักจำลองในกากน้ำตาล บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 96 ชั่วโมง	29
5	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran 5 ppm และชุดที่ไม่เติมยา Kamoran ที่เวลาต่างๆ เมื่อทดสอบในสภาวะการหมักจำลองที่อุณหภูมิ 30°C	31
6	ปริมาณยีสต์ในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran ที่ 5 ppm และที่ไม่เติมยา Kamoran เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสม เมื่อบ่มในสภาวะการหมักจำลองที่อุณหภูมิ 30°C	32
7	ปริมาณไบโอฟิล์ม (log cfu/cm2) ที่สร้างบนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวจำนวน 20 ไอโซเลต เมื่อบ่มในกากน้ำตาลเป็นเวลา 96 ชั่วโมง	34
8	ปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ (log cfu/cm2) บนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง เมื่อบ่มเป็นระยะเวลาต่างกัน	35
9	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่ผ่านการแช่ในกากน้ำตาลในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ ก กำลังขยาย 1,500 เท่า) และบ่มนาน 96 ชั่วโมง (ภาพ ข กำลังขยาย 1,500 เท่าและภาพ ค กำลังขยาย 3,000 เท่า)	36

สัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	ความหมาย
g	กรัม (Gram)
mg	มิลลิกรัม (Milligram)
ml	มิลลิลิตร (Milliter)
mg/l	มิลลิกรัมต่อลิตร (Milligram per Liter)
ppm	ส่วนในล้านส่วน (Part per million)
cfu/g	Colony forming unit per gram
rpm	รอบต่อนาที (Revolution per minitue)
°Brix	องศาบริกซ์ (Degree Brix)
%	ร้อยละ (Percentage)
cm	เซนติเมตร (Centimeter)
M	โมลาร์ (Molar)
mM	มิลลิโมลาร์ (Millimolar)
v/v	ปริมาตรโดยปริมาตร (volumn per volumn)
>	มากกว่า
<	น้อยกว่า

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เอทานอลชีวภาพ (bioethanol) จัดเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาทดแทนแหล่งพลังงานจากฟอสซิล โดยผลิตได้จากการนำชีวมวล (biomass) จากพืชมาผ่านกระบวนการหมักโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลในวัตถุดิบเหล่านี้ให้เป็นเอทานอล ไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีนโยบายส่งเสริมการผลิตและการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งแผนพัฒนาพลังงานทดแทนฉบับปัจจุบัน (พ.ศ. 2551-2565) ได้กำหนดเป้าหมายการใช้เอทานอลชีวภาพเป็นวันละ 9 ล้านลิตร เมื่อสิ้นสุดแผน ส่งผลให้มีการจัดตั้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็นกว่า 21 แห่ง มีกำลังการผลิตเอทานอลรวมกว่า 4 ล้านลิตรต่อวัน โดยวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพของไทย ได้แก่ กากน้ำตาลและมันสำปะหลัง (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าในปัจจุบันการผลิตเอทานอลชีวภาพจะมีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีการหมักทำให้กระบวนการผลิตมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ในระดับหนึ่ง แต่ก็ยังประสบปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นอยู่เสมอเนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลดำเนินการในสภาวะไม่ปลอดเชื้อทำให้มีโอกาสที่จุลินทรีย์อื่นสามารถเจริญแข่งขันกับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้อาจก่อให้เกิดผลเสียต่อประสิทธิภาพการผลิตทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อยลง หรือบางครั้งอาจทำให้กระบวนการผลิตล้มเหลว ทำให้เสียค่าใช้จ่ายและเวลา โดยแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) นับได้ว่าเป็นเชื้อปนเปื้อนที่พบได้บ่อยและมีความสำคัญเนื่องจากสามารถปรับตัวให้เจริญในสภาวะการหมักเอทานอลได้ดีและแข่งขันกับยีสต์ในสภาวะการหมัก มีรายการการพบแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนในโรงงานผลิตเอทานอลทั่วโลก สำหรับประเทศไทยนั้นมีรายงานการพบจีนัส *Lactobacillus* ได้บ่อยที่สุด (ศิริโฉม ทุ่งเก้า, 2554)

กากน้ำตาล (cane molasses) เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย มีราคาถูก จึงใช้มากในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในประเทศไทย ซึ่งกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลเริ่มจากการนำกากน้ำตาลเข้มข้นมาเจือจางด้วยน้ำ เติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม ปรับ pH ให้เป็นประมาณ 4.5 และนำมาใช้เลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อเตรียมกล้าเชื้อ (starter cultures) และนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในขั้นตอนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยกากน้ำตาลเหล่านี้ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนมาก่อน ดังนั้นจุลินทรีย์อื่นที่ติดมากับกากน้ำตาลรวมทั้งมาจากแหล่งอื่นจึงสามารถเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นและเกิดการแข่งขันกับยีสต์ที่ใช้ผลิตเอทานอล ด้วยเหตุดังกล่าว จึงจำเป็นต้องมีการ

ควบคุมระดับของแบคทีเรียไม่ให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการหมักโดยใช้วิธีการต่างๆ เช่น การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อถังหมักและอุปกรณ์การผลิต การเติมสารต้านแบคทีเรีย เช่น สารกลุ่ม carbamates, quaternary ammonium compounds และ halogenated phenols รวมถึงการเติมยาปฏิชีวนะ เช่น penicillin, virginiamicin และ Kamoran เป็นต้น (de Oliva-Neto & Yokoya, 2001) ซึ่งหากมีการควบคุมที่มีประสิทธิภาพจะช่วยลดโอกาสของแบคทีเรียในการเกาะติดพื้นผิวถังหมักและอุปกรณ์และก่อตัวเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า "ไบโอฟิล์ม (biofilm)" เนื่องจากมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงานผลิตเอทานอลสร้างไบโอฟิล์มบนผิววัสดุได้ (Rich et al., 2011) อย่างไรก็ตาม การที่จะควบคุมแบคทีเรียปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ สิ่งสำคัญอันดับแรกก็คือการระบุปัญหา กล่าวคือ จะต้องมีองค์ความรู้เรื่องการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเอทานอลทั้งในแง่ของปริมาณเชื้อและชนิดของเชื้อที่พบ ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวของไทยยังมีน้อยมาก ดังนั้นโครงการวิจัยในปีแรกจึงได้ทำการสำรวจการปนเปื้อนแบคทีเรียกรดแลคติกในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลของไทยที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิต จำนวน 4 แห่ง ซึ่งโรงงานเหล่านั้นมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน ซึ่งได้ข้อมูลปริมาณและสปีชีส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้บ่อย และสำหรับโครงการวิจัยในปีที่ 2 นี้จึงต้องการศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะที่โรงงานเหล่านั้นใช้รวมทั้งสารเคมีบางชนิดในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ ตลอดจนศึกษาผลกระทบของการมีแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ รวมทั้งศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากไบโอฟิล์มเป็นโครงสร้างที่ทำให้แบคทีเรียต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อและอาจเป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อนแบบเรื้อรังที่เกิดขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นองค์ความรู้ในขั้นต้นในการนำไปสู่การแก้ปัญหาและควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมของไทยต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

Chang et al. (1997) ศึกษาการใช้ sulfite และ hydrogen peroxide ในการควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องที่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ (cell – recycle continuous ethanol fermentation) โดยทำการศึกษาในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 200 g/L แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ *L. casei* 4-3 และ *L. fermentum* 7-1 ที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้มันสำปะหลังและข้าวบาร์เลย์เป็นวัตถุดิบ และทดสอบกับ sulfite ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า sulfite ที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm ไม่มีผลยับยั้งยีสต์ ในขณะที่แบคทีเรียทดสอบถูกยับยั้งตั้งแต่ความเข้มข้น sulfite 100 ppm ขึ้นไป ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแต่ไม่มีประสิทธิภาพยับยั้งในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดย *L. casei* 4-3 มีความไวต่อ sulfite มากกว่า *L. fermentum* โดย sulfite ที่มีความเข้มข้น 300 ppm สามารถลดจำนวนแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลงได้ประมาณ 5.5 และ 3.8 log cfu/ml ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนั้นยังทำการหาค่าระยะเวลาในการทำให้แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลดจำนวนลง 10 เท่า (Decimal reduction time, D) เมื่อใช้ sulfite ความเข้มข้น 32, 87, 134 และ 287 ppm พบว่าที่ความเข้มข้นของ sulfite 287 ppm และ 134 ppm มีค่า D สำหรับ *L. fermentum* 7-1 เท่ากับ 0.90 ชั่วโมง และ 0.96 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ค่า D สำหรับ *L. casei* 4-3 มีค่า 0.51 ชั่วโมง และ 0.79 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับผลของ hydrogen peroxide นั้น ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 5 – 10 mM พบว่า *L. fermentum* 7-1 มีความไวต่อ hydrogen peroxide มากกว่า *L. casei* 4-3 โดยที่ความเข้มข้น 10 mM ทำให้เซลล์ลดจำนวนลงเหลือประมาณ 4 log cfu/ml จาก 7.5 log cfu/ml และจากการทดสอบกับน้ำหมักจากถังหมักของโรงงานผลิตเอทานอล พบว่า เมื่อไม่มีการเติม sulfite และมี *L. fermentum* 7-1 ปนเปื้อนที่ 3.1×10^8 cells/ml และมียีสต์ 2.5×10^8 cells/ml มีการผลิตเอทานอล 57.2 g/L ในขณะที่เมื่อเติม sulfite 400 ppm ลงในตะกอนเซลล์ยีสต์และนำไปให้อากาศก่อนนำมาเติมในถังหมักพบว่า มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 78.1 g/L

Hynes et al (1997) ทดลองใช้ virginiamycin เพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้แก่ *Lactobacillus* 7 สายพันธุ์ที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลและจากแหล่งอื่นๆ โดยเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ใน wheat mash (ข้าวสาลีที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์) ที่เติม virginiamycin ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่ 30°C พบว่า virginiamycin ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/l (ppm) ลดจำนวน *L. fermentum* จากจำนวนเริ่มต้นประมาณ 10^5 cfu/ml ได้ประมาณ 1 log ภายใน 72 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นยาเป็น 2 และ 6 mg/l จะลดจำนวนเซลล์ได้เพิ่มขึ้นเป็น 2 log unit ในขณะที่เมื่อไม่มียา virginiamycin จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 4 log นอกจากนั้นยังพบว่า ยามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบสายพันธุ์อื่นๆเช่นกัน แต่บางสายพันธุ์

แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนขึ้นหลังการบ่มนาน 48 ชั่วโมง และสรุปได้ว่า การใช้ยา 0.5 mg/kg เพียงพอต่อการควบคุมการเจริญของ *L. fermentum*, *L. rhamnosus* และ *L. paracasei* ใน wheat mash จากนั้นได้ทำการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียร่วมกับยีสต์โดยเติมยา 0.5 mg/kg และมียีสต์เริ่มต้น 10^7 cfu/g พบว่า เมื่อไม่เติมยายีสต์จะผลิตเอทานอลได้ลดลงจาก 8.18% เป็น 7.92%

Narendranath et al. (1997) ศึกษาผลของการมีแบคทีเรียกรดแลคติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยแบคทีเรียที่นำมาศึกษาได้แก่ *L. plantarum, L. paracasei, Lactobacillus* #3, *L. rhamnosus* และ *L. fermentum* ทำการทดสอบในข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยที่มีความถ่วงจำเพาะ 22-24° Plato พบว่าเมื่อมี L. plantarum, *L. rhamnosus* หรือ *L. fermentum* เริ่มต้น 10^6 cfu/ml จะได้เอทานอลลดลง 2% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรีย ในขณะที่ *L. paracasei* หรือ *Lactobacillus* #3 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^5 cfu/ml ทำให้ได้เอทานอลลดลงมากกว่า 2% และเมื่อมีแบคทีเรียเริ่มต้นมากกว่า 10^9 cfu/ml ทำให้ได้เอทานอลลดลงถึง 3.8 -7.6% โดยผู้วิจัยได้เสนอว่าการที่ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ลดลงเมื่อเจริญร่วมกับยีสต์เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย

Narendranath et al. (2000) ศึกษาการใช้ Urea hydrogen peroxide (UHP) ในการลดจำนวน *Lactobacillus* ในข้าวสาลีที่ผ่านการย่อย (wheat mash) ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยเตรียม wheat mash ที่มีของแข็งที่ละลายได้ประมาณ 21 g/100 ml ที่มีแบคทีเรียทดสอบได้แก่ *L. plantarum*, *L. paracasei*, *Lactobacillus* sp., *L. rhamnosus*, และ *L. fermentum* ประมาณ 10^7 cfu/ml และมียีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เริ่มต้นประมาณ 10^6 cfu/ml เติม UHP ให้มีความเข้มข้น 32 mM บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เริ่มต้นแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดมีจำนวน 0.83 – 1.09 × 10^7 cfu/ml หลังบ่ม 2 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 3.0 × 10^2 – 8.7 × 10^2 cfu/ml โดย *L. paracasei* มีจำนวนลดลงได้น้อยที่สุด และเมื่อนำแต่ละสปีชีส์มาทดสอบต่อโดยการเปรียบเทียบการเติม UHP ที่ 30 mM และการเติม hydrogen peroxide ที่ 30 mM ใน wheat mash ต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ และการยับยั้ง *L. paracasei* พบว่าเมื่อเติม UHP และ hydrogen peroxide ยีสต์มีการเจริญสูงสุดภายใน 24 ชั่วโมง และมีจำนวนค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ในขณะที่ไม่เติมสารทั้ง 2 ชนิด ยีสต์มีจำนวนลดลงหลัง 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า *L. paracasei* มีจำนวนเพิ่มขึ้นหลังจาก 2 ชั่วโมง เนื่องจาก hydrogen peroxide มีการสลายตัว แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 36 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียมีค่าน้อยกว่าเมื่อไม่เติมสารยับยั้ง และการเติม UHP และ hydrogen peroxide ทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อไม่เติมสารทั้งสอง 5.84 %

de Oliva - Neto & Yokoya (2001) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีชนิดต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่มีการเสนอแนะให้ใช้ในการควบคุมเชื้อปนเปื้อนในโรงงานน้ำตาลและโรงงานเอทานอล รวมทั้งยาปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโรงกลั่นเอทานอลของ

ประเทศบราซิล ได้แก่ *L. fermentum*, *L. mesenteroides*, รวมทั้งสายพันธุ์จากแหล่งเก็บรวบรวมสายพันธุ์ ATCC รวมทั้งผลต่อยีสต์ โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของสารต่อเชื้อทดสอบโดยวิธี micro dilution broth ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ml ที่ประกอบด้วย น้ำอ้อยแห้ง 40 g/l , yeast extract 5 g/l ในน้ำ และปรับ pH เป็น 4.5 ด้วย HCl หลังเติมเชื้อทดสอบนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C และตรวจสอบการเจริญ พบว่า acid penicillin V และ clindamycin มีประสิทธิภาพมากที่สุดต่อแบคทีเรีย โดยมีค่า MIC ในช่วง 0.10 – 0.20 µg/ml และ 0.05 – 0.40 µg/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ในกลุ่มสารเคมีที่มีประสิทธิภาพได้แก่ sulfite ซึ่งมีค่า MIC ระหว่าง 10-40 µg/ml nitrite มีค่า MIC < 117 µg/ml และ copper sulfate มีค่า MICในช่วง 75 – 300 µg/ml ในขณะที่ formaldehyde มีผลยับยั้งแบคทีเรียได้ที่ MIC ช่วง 11.5 - 23 µg/ml และมีค่า MIC ต่อยีสต์ที่ 46 – 92 µg/ml

Thomas et al (2001) ศึกษาผลของ *Lactobacillus* ต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ในระหว่างการหมักข้าวโพดที่ผ่านการย่อย (corn mash) โดยเตรียม corn mash ที่มีของแข็งที่ละลายได้ 230 g/l เติม urea ให้มีความเข้มข้น 16 mmol/l บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 ml ที่เติม glucoamylase ที่มี *Lactobacillus* สปีชี่ส์ต่างๆ ได้แก่ *L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. plantalum* และ *L. paracasei* จำนวน 1.0×10^{7} cells/ml และเติมยีสต์ (active dry yeast) ให้มีจำนวน1.0×10^{7} cells/ml ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมงที่ 30°C และบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อมี *Lactobacillus* จะให้ผลผลิตเอทานอลลดลงและมีการผลิตกลีเซอรอลและกรดแลคติกเพิ่มขึ้น โดยเมื่อเติมยีสต์พร้อมกับแบคทีเรีย หลังบ่มนาน 48 ชั่วโมง ได้เอทานอล 11.24- 12.44% ในขณะที่เมื่อเติมยีสต์หลังเติมแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง ได้เอทานอล 9.95 – 11.76% หลังเติมยีสต์ 48 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อน ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ 11.24 – 12.77% เมื่อคิดเป็นการสูญเสียที่เกิดจาก *Lactobaciilus* พบว่า การมี *L. collinoides* หรือ *L. fermentum* 24 ชั่วโมงก่อนเติมยีสต์ จะทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลงสูงถึง 22% และเมื่อแบคทีเรียเจริญพร้อมกับยีสต์ จะทำให้สูญเสียเอทานอล 4.6 – 12% และเมื่อมี *L. fermentum* เจริญ 24 ชั่วโมงก่อนจะทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นถึง 46% นอกจากนั้นยงพบว่า เมื่อมี *L. fermentum* เจริญก่อนยีสต์ 24 ชั่วโมง จะทำให้ยีสต์มีจำนวนเซลล์ลดลงจาก 3.2×10^{8} cells/ml ในชุดที่ไม่มีแบคทีเรีย เป็น 2.2×10^{8} cells/ml สำหรับการมีชีวิตของยีสต์นั้นพบว่า ได้รับผลกระทบจากการมี *Lactobacillus* เช่นเดียวกัน โดยเมื่อไม่มี *Lactobacillus* ยีสต์มีชีวิตเกิน 90% ตลอดระยะเวลาการหมัก การมี *Lactobacillus* เจริญก่อนยีสต์ทำให้ยีสต์มีชีวิตลดลง โดยลดลงได้มากที่สุดในกรณีของ *L. fermentum* โดยทำให้ยีสต์มีชีวิตลดลงถึง 45% หลังจากน้ำตาลถูกใช้จนหมด 12 ชั่วโมง

Meneghin et al (2008) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ chlorine dioxide ในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis, L. fermentum*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum* ซึ่งเป็นแบตทีเรียที่มีรายงานการพบปนเปื้อนในน้ำอ้อยและกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากอ้อยของประเทศ

บราซิล โดยหาค่า MIC ของสารต่อเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหาร MRS broth หรือ Nutrient broth บ่ม *Lactobacillus* ที่ 37 องศาเซลเซียส และบ่ม *B. subtilis* ที่ 30°C โดยมีอาหารทดสอบ 9 ml และเติมสารละลาย chlorine dioxide 0.8 ml และเติมเชื้อ 0.2 ml รวมทั้งทำการทดสอบกับยีสต์ด้วย พบว่า ค่า MIC ของ chlorine dioxide ต่อ *B. subtilis* มีค่าน้อยกว่า 10 ppm ในขณะที่ค่า MIC ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบมีค่าสูงกว่าคือ อยู่ในช่วง 50 – 200 ppm สำหรับยีสต์นั้นถูกยับยั้งที่ MIC 100 ppm นอกจากนั้นยังเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ chlorine dioxide กับ Kamoran ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้เติมในถังหมักเอทานอลที่ 3 ppm พบว่า chlorine dioxide ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ppm ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ (วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm) ในขณะที่ Kamoran ที่ 3 ppm ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ สำหรับผลต่อแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญแตกต่างกันตามสายพันธุ์

Arshad et al. (2011) ศึกษาผลของ virginiamycin และ sodium fluoride ต่อการยับยั้งแบคทีเรียในกากน้ำตาลจากอ้อยที่นำมาใช้หมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยเตรียมกากน้ำตาลเจือจางด้วยน้ำประปาและเติม ammonium salt และ phosphate เป็นสารอาหารเพิ่มเติมโดยไม่มีการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติมยีสต์และบ่มที่ 30 – 32°C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า การเติม virginiamycin (ชื่อการค้าคือ Lactrol) ที่ความเข้มข้น 0.5 ppm ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ 7.8 % ซึ่งสูงกว่าเมื่อไม่เติมยาซึ่งได้เอทานอล 7.5 % และที่ความเข้มข้นของ virginiamycin 2 ppm มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 8.5% โดยไม่มีผลต่อจำนวนยีสต์ ในขณะที่จำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 3.2×10^{8} cfu/ml ในชุดควบคุมเป็น 2.7×10^{8} cfu/ml ในชุดที่มียา 0.5 ppm และลดลงจนตรวจไม่พบในชุดที่มียา 2 ppm สำหรับผลของ sodium fluoride นั้น พบว่า ที่ความเข้มข้น 5 ppm มีการผลิตเอทานอลได้ 6.02% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารเป็น 20 ppm ได้เอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 6.21% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติม sodium fluoride ที่ได้เอทานอล 5.86% โดยแบคทีเรียในกากน้ำตาลที่มี sodium fluoride มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อไม่มี sodium fluoride และจากการคำนวณ พบว่าถ้าไม่มีการเติม Lactrol จะเกิดการสูญเสียผลผลิตเอทานอล 13 – 14% ดังนั้น การใช้ยาชนิดนี้จึงช่วยลดการสูญเสียเป็นมูลค่า 4,000 เหรียญต่อวันในโรงงานที่ผลิตเอทานอล 100,000 ลิตรต่อวัน ของประเทศปากีสถาน

Rich et al (2011) ศึกษาค่า MIC ต่อยา virginiamycin ของแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลทที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ ซึ่งผ่านการเตรียมด้วยวิธี dry-grind ในการจัดจำแนกเชื้อพบว่าเป็น *L. fermentum* จำนวน 6 ไอโซเลต เป็น *L. johnsonii* 2 ไอโซเลต และเป็น *L. mucosae* และ *L. amylovorus* อีกอย่างละ 1 ไอโซเลต เมื่อทดสอบค่า MIC ของเชื้อที่อยู่ในรูปแขวนลอย (planktonic cell) ใน MRS broth พบว่า มีค่า MIC ≤ 0.5 – 16 mg/ml โดยแบคทีเรียที่ ไวต่อยา virginiamycin (มี MIC ≤ 0.5 mg/ml) มีจำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อทดสอบแบคทีเรียที่อยู่ในรูป ไบโอฟิล์มบนพื้นผิวเหล็กกล้าปลอดสนิม (stainless steel) ของเครื่อง CDC

biofilm reactor ซึ่งมี MRS broth อยู่ ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวมีลักษณะเป็น 96-well plate ที่มี 96 pin replicator lid บ่มที่ 37°C ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจสอบการสร้างไบโอฟิล์มโดยย้อมด้วย 0.1% crystal violet และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทสร้างไบโอฟิล์มได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และระยะเวลาการบ่ม และจากการทดสอบผลของยา virginiamycin ที่ความเข้มข้น 2 และ 32 μg/ml ต่อไบโอฟิล์มของแบคทีเรียเหล่านี้ พบว่า แบคทีเรียที่มีค่า MIC ต่อยาสูง (*L. fermentum*)   ไอโอฟิล์มจะถูกยับยั้งได้น้อย ในขณะที่ไอโซเลทที่เหลือจะถูกยับยั้งไบโอฟิล์มได้ทั้งเมื่อเติมยาตั้งแต่เริ่มต้นและเติมยาหลังบ่มเป็นเวลา 48 – 144 ชั่วโมง ซึ่งผู้วิจัยสรุปว่าการที่อยู่ในรูปไบโอฟิล์มไม่ทำให้แบคทีเรียต้านทานต่อยา virginiamycin เพิ่มขึ้น

de Oliva Neto et al (2014) รายงานการศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะและสารเคมีชนิดต่างๆ ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลของประเทศบราซิล ได้แก่ *L. fermentum* CCT 1396 และ *L. fermentum* CCT 0559 ที่ได้จากแหล่งเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์และได้จากโรงงานด้วย บ่มที่ 30°C นาน 24 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (A_{600}) โดยค่า MIC อ่านได้จากความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่า A_{600} ลดลงอย่างน้อย 90% ผลการศึกษาพบว่า cetyl trimethyl ammonium chloride ซึ่งเป็น cationic surfactant ชนิดหนึ่ง มีค่า MIC ต่อ *L. fermentum* เท่ากับ 3.12 – 6.25 mg/l แต่สารชนิดนี้ยับยั้งยีสต์ได้ด้วยที่ค่า MIC 6.25 – 125 mg/l เช่นเดียวกับ N-allcyl-di-methyl-benzyl ammonium chloride ซึ่งเป็นสารกลุ่ม quaternary ammonium compound ที่มีค่า MIC ต่อยีสต์ และ *L. fermentum* ใกล้เคียงกันคือ 8 mg/l ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ ในขณะที่ MIC ของ HJ Kamoran ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในโรงกลั่นเอทานอลของประเทศบราซิล ต่อ *L. fermentum* มีค่าต่ำคือ 0.078 – 0.156 mg/l โดยในอุตสาหกรรมปัจจุบันใช้ยาที่ 3 – 4 mg/l นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้ 3,4,4’-trichlorocarbanilide (TCC) ร่วมกับ benzalkonium chloride (CBa) ที่อัตราส่วน 1:1 w/w ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีแต่ยับยั้งยีสต์ได้บางส่วน ซึ่งหากมีการปรับสัดส่วนของสารผสมแต่ละชนิดอาจมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้แทน Kamoran เนื่องจากมีราคาถูกกว่าและอาจลดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรีย สำหรับสารอื่นๆ ได้แก่ nalidixic acid, pipemidic acid, phenazopyridine sulfate, sodium และ polymixin B sulfate นั้น มีค่า MIC ต่อ *L. fermentum* สูงกว่า 40 mg/l ซึ่งสูงกว่า 4 mg/l ของยา Kamoran ดังนั้นจึงไม่เหมาะในการนำไปใช้แทน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Kamoran, Erythromycin และสารเคมี ได้แก่ hydrogen peroxide ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ และศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียในสภาวะการหมักจำลอง

2. เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการผลิตเอทานอลในสภาวะการหมักจำลอง

3. เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มบนผิวเหล็กกล้าปลอดสนิม (stainless steel) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้และการสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักจำลอง

ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิต มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Kamoran ที่มีการใช้ในโรงงานเอทานอล และ Erythromycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบ และความไวต่อสารเคมี ได้แก่ hydrogen peroxide โดยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยใช้วิธี macrobroth dilution และศึกษาประสิทธิภาพของสารเหล่านี้ในการยับยั้งแบคทีเรียในสภาวะการหมักจำลอง ศึกษาผลของการเติม Kamoran ต่อการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล และศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและในสภาวะการหมักจำลอง รวมทั้งศึกษาไบโอฟิล์มโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

ประโยชน์ที่จะได้รับ

โครงการวิจัยนี้จะทำให้ทราบประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลรวมทั้งสารเคมีบางชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพของโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลในการผลิต รวมทั้งทราบถึงผลกระทบของการมีแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ และทราบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้สามารถสร้างไบโอฟิล์มบนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมซึ่งเป็นวัสดุที่ใช้ทำถังหมักเอทานอลได้หรือไม่ ซึ่งความรู้ที่ได้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อควบคุมระดับการปนเปื้อนแบคทีเรียไม่ให้ส่งผลเสียต่อการผลิตเอทานอลชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมของประเทศต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

วิธีดำเนินการวิจัยของโครงการสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากโครงการวิจัยปีที่ 1 โดยใช้วิธีทางอณูพันธุศาสตร์ (Molecular identification method)

2. หาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของยาปฏิชีวนะและสารเคมีที่นำมาทดสอบ ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์เดี่ยว

3. ศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและการผลิตเอทานอลในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง

4. เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์เดี่ยว และแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. แบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักจากขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตเอทานอลของโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบจำนวน 3 แห่ง แบคทีเรียเหล่านี้เก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ในกลีเซลรอลเข้มข้น 30%

2. ยีสต์สายพันธุ์ผลิตเอทานอล

อยู่ในรูป Active dry yeast ได้จากจากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้ในการศึกษา

3. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อพลาสติก (Plastic petri plate) ขนาด 15 x 90 mm

2.2 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 ml

2.3 ฟลาสก์ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 250 ml

2.4 หัวกรอง (Membrane filter) ขนาดช่อง 0.45 µm บริษัท (Millex ,Germany)

2.5 กระบอกฉีดยา (Syringes) ขนาด 10 ml

2.6 หลอดทดลอง ขนาด 20 x 180 ml

2.7 ขวดแก้วฝาเกลียว (Duran) ขนาด 500 และ 1,000 ml

2.8 ทิปสำหรับไมโครปิเปต (Tip for micropipettes)

2.9 กระบอกตวง (Burette) ขนาด 500 ml

2.10 ซองสารเคมีกำจัดออกซิเจน (GasPak) , (บริษัท BD, USA)

2.11 กากน้ำตาล (ได้จากโรงงานผลิตเอทานอล)

2.12 แผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม (Stainless steel coupon) เกรด 304 ผิวไม่เรียบ ขนาด 1 × 1 x 0.2 cm และ 1.2 × 2.3 × 0.2 cm

2.13 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Glass spreader)

4. เครื่องมือ

3.1 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100 และ 1,000 µl (Gilson, USA)

3.2 โถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) (Anaerocult, Merck, UK)

3.3 เครื่อง Refractometer (N-1, Atago, UK)

3.4 เครื่องวัด pH (pH meter) (Ultra basic, Denver Instrument, USA)

3.5 เครื่องวัดความขุ่น (Densitometer) (Densimat, Biomerieux, France)

3.6 Haemacytometer (Boeco, USA)

3.7 เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave)

3.8 เครื่องชั่ง (PG 802-S, Mettler Toledo, USA)

3.9 เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีเตรียมดังภาคผนวก ก)

4.1 MRS agar ที่มี Natamycin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 PDA ที่มี Chloramphenicol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3 MRS broth

6. สารเคมี (วิธีเตรียมดังภาคผนวก ข)

5.1 0.85% NaCl

5.2 Natamycin (50% in lactose, China)

5.3 Chloramphenicol (Merck, Germany)

5.4 Kamoran (มีเนื้อยา 95% ได้จากโรงงานผลิตเอทานอล)

5.5 20% H_2SO_4

5.6 $(NH_4)_2HPO_4$

5.7 เอทานอล 95%

5.8 Erythromycin (มีเนื้อยา 1 g ใน 20 g)

5.9 35% H_2O_2

วิธีการวิจัย

1. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยวิธีของ Suanjit, (2014) โดยมีขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้

1) นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่ -80°C มาทำให้ละลาย จากนั้นจึงขีดแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวบน MRS agar บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนในโถบ่มเชื้อที่มีซองสารเคมีกำจัดออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2) นำโคโลนีมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด TIANamp Bacteria DNA Kit (Tiangen Biotech, Beijing) และใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA

3) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1x PCR buffer 50 µl, 1.5 mM $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP ชนิดละ 0.2 mM, 0.5 µM primer (LAC16F (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGG-3’) และ LAC16R (5’-TACCTTGTTACGACTTCACCC-3’), Taq polymerase 0.05 units/µl และ template DNA 500 ng

4) เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ในเครื่อง thermal cycler (Biometra, Germany) โดยใช้สภาวะดังนี้ : 3 นาที ที่ 94°C, 45 วินาที ที่ 94°C จำนวน 35 รอบ, 30 วินาทีที่ 55°C, 1.30 นาทีที่ 72 °C และ 10 min ที่ 72°C

5) ทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega, USA) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S rRNA (First BASE Laboratories SdnBhd, Malaysia)

6) ทำการ Editing and contig assembly DNA sequences โดยใช้ BioEdit software (Version 7.2.5) และหาความคล้ายคลึงของลำดับจาก GenBank database โดยใช้ standard nucleotide-nucleotide BLAST search algorithm (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกและสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ MEGA software version 6.0 ที่ระดับ cutoff 97% และ 99% สำหรับจีนัสและสปีชีส์ตามลำดับ

2. การหาค่า MIC ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อยาปฏิชีวนะ Kamoran, Erythromycin และ hydrogen peroxide ในอาหาร MRS broth

2.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.1 นำแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่เก็บในสภาพแช่แข็งมาทำการละลาย จากนั้นขีดแยกเชื้อบนจานอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

2.1.2 เพาะโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนีลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.1.3 ปรับความขุ่นของเซลล์ในข้อ 1.1.2 ให้เท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 โดยวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัด จะได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1×10^{8} cfu/ml

2.1.4 เจือจางเซลล์ในข้อ 2.1.3 ลง 10 เท่า โดยถ่ายเซลล์ 1 ml ลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 9 ml และเจือจางต่ออีก 10 เท่า จะได้เซลล์ประมาณ 1×10^{6} cfu/ml

2.2 การเตรียมยาสารทดสอบ

2.2.1 Kamoran

เตรียมสารละลาย Kamoran ความเข้มข้นตั้งต้น 2,000 ppm และสารละลายยาทดสอบดังนี้

1) ชั่งยา Kamoran ปริมาณ 0.1 g ละลายใน 95% ethanol ปริมาตร 50 ml

2) กรองสารละลายที่ได้ด้วยหัวกรองที่มีเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 μm จะได้สารละลายยา Kamoran เข้มข้นเท่ากับ 2,000 μg/ml (หรือ 2,000 ppm) เป็นสารละลายยาตั้งต้น (Stock solution)

3) เจือจางสารละลายยาตั้งต้นด้วยเอทานอล 95% ให้มีความเข้มข้นของยาแตกต่างกัน ดังนี้

สารละลายยา Kamoran ตั้งต้น (ml)	95% เอทานอล (ml)	ความเข้มข้นยา Kamoran (ppm)
5	0	2,000
4	1	1,600
3	2	1,200
2	3	800
1	4	400
0.5	4.5	200

2.2.2 Erythromycin

เนื่องจากยา erythromycin ที่นำมาใช้ทดสอบระบุไว้ว่าในยา 20 g มี Erythromycin 1 g จึงเตรียมสารละลายยา Erythromycin ตั้งต้นความเข้มข้น 1,000 ppm และสารละลายยาทดสอบ ดังนี้

1) ชั่งยา Erythromycin 50 g เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ml ผสมให้เข้ากัน

2) กรองสารละลายยาด้วยหัวกรองที่มีเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 µm จะได้สารละลายยา Erythromycin ที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm เป็นสารละลายยาตั้งต้น

3) เจือจางสารละลายยาตั้งต้นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นของยาแตกต่างกัน ดังนี้

สารละลายยา Erythromycin ตั้งต้น (ml)	น้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้นยา Erythromycin (ppm)
5	0	1,000
4	1	800
3	2	600
2	3	400
1	4	200
0.5	4.5	100
0.3	4.7	60
0.1	4.9	20
0.05	4.95	10
0.01	4.99	2

2.2.3 **Hydrogen peroxide**

เตรียมสารละลาย hydrogen peroxide ตั้งต้นความเข้มข้น 10,000 ppm และ 1,000 ppm และสารละลายทดสอบ ดังนี้

1) เจือจาง hydrogen peroxide เข้มข้น 35% ปริมาตร 1.7 ml ด้วยน้ำกลั่นปราศเชื้อปริมาตร 48.3 ml

2) กรองสารละลายด้วยหัวกรองที่มีเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 μm จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น hydrogen peroxide เท่ากับ 10,000 ppm เป็นความเข้มข้นตั้งต้นที่ 1

3) เจือจางสารความเข้มข้นตั้งต้นที่ 1 ลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นปราศเชื้อ (สารความเข้มข้นตั้งต้นที่ 1 ปริมาตร 1 ml ในน้ำกลั่น 9 ml) จะได้ hydrogen peroxide ความเข้มข้น 1,000 ppm เป็นความเข้มข้นตั้งต้นที่ 2

4) เจือจางสารละลาย hydrogen peroxide ตั้งต้น ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้

สารละลาย Hydrogen peroxide ตั้งต้น (ml)[(1)]	น้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้น Hydrogen peroxide (ppm)
4	1	8,000
3	2	6,000
2	3	4,000
1	4	2,000
5	0	1,000
4*	1	800
3*	2	600
2*	3	400
1*	4	200
0.5*	4.5	100

[(1)] สารละลายตั้งต้นที่ไม่มีเครื่องหมาย * เป็นสารละลาย hydrogen peroxide ตั้งต้นที่ 1 (ความเข้มข้น 10,000 ppm) และสารละลายตั้งต้นที่มีเครื่องหมาย * เป็น สารละลาย hydrogen peroxide ตั้งต้นที่ 2 (ความเข้มข้น 1,000 ppm)

2.3 การหาค่า MIC

2.3.1 ค่า MIC ต่อยา Kamoran

หาค่า MIC ต่อยา Kamoran โดยวิธี macrotube dilution ตามวิธีดัดแปลงจาก de Oliva Neta et al. (2014) ดังนี้

1) เตรียมหลอดทดสอบที่มีอาหาร MRS broth ปริมาตร 4.5 ml ที่ปราศจากเชื้อ

2) ถ่ายเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลต (จากข้อ 1.1.4) ลงในหลอดอาหาร MRS broth หลอดละ 0.25 ml

3) ถ่ายสารละลายยา Kamoran แต่ละความเข้มข้น (2,000, 1,600, 1,200, 800, 400 และ 200 ppm) ลงในหลอดทดสอบ หลอดละ 0.25 ml จะได้หลอดทดสอบที่มีเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^5 cells/ml และมียา Kamoran ความเข้มข้น 100, 80, 60, 40, 20 และ 10 ppm ตามลำดับ และเตรียมหลอดควบคุมที่เติม 0.95% ethanol แทนสารละลายยา (0 ppm Kamoran) และหลอดอาหาร MRS broth ที่ไม่เติมเชื้อ (medium control)

4) นำหลอดทดสอบไปบ่มที่ อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5) บันทึกผลการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ) และอ่านค่า MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยา Kamoran ที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

2.3.2 ค่า MIC ต่อยา Erythromycin

หาค่า MIC ต่อยา erythromycin โดยวิธี macrobroth dilution ดังนี้

1) เตรียมหลอดทดสอบที่มีอาหาร MRS broth หลอดละ 4.5 ml และเติมเซลล์แบคทีเรียทดสอบหลอดละ 0.25 ml เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว

2) เติมสารละลายยา erythromycin แต่ละความเข้มข้น (1,000, 800, 600, 400, 200, 100, 60, 20, 10, 2 ppm) ลงในหลอดทดสอบ ความเข้มข้นละ 0.25 ml จะได้หลอดทดสอบที่มีแบคทีเรียทดสอบเข้มข้นประมาณ 10^5 cells/ml และมียา erythromycin เข้มข้น 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3, 1, 0.5 และ 0.1 ppm ตามลำดับ

3) นำหลอดไปบ่ม บันทึกผลการเจริญและอ่านค่า MIC

2.3.3 ค่า MIC ต่อ Hydrogen peroxide

1) เตรียมหลอดทดสอบที่มีอาหาร MRS broth หลอดละ 4.5 ml และเติมเซลล์แบคทีเรียทดสอบหลอดละ 0.25 ml เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว

2) เติมสารละลาย hydrogen peroxide แต่ละความเข้มข้น (8,000, 6,000, 4,000, 2,000, 1,000, 800, 600, 400, 200, 100, 20 และ 2 ppm) ลงในหลอดทดสอบความเข้มข้นละ 0.25 ml จะได้หลอดทดสอบที่มีแบคทีเรียทดสอบเข้มข้นประมาณ 10^5 cells/ml และมี hydrogen peroxide เข้มข้น 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 และ 0.1 ppm ตามลำดับ

3) นำหลอดไปบ่ม บันทึกผลการเจริญและอ่านค่า MIC เช่นเดียวกัน

3. ประสิทธิภาพของ Kamoran, Erythromycin และ hydrogen peroxide ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะการหมักจำลอง

3.1 การเตรียมอาหารกากน้ำตาล

3.1.1 นำกากน้ำตาลเข้มข้นมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปรับให้มีความเข้มข้น 30°Brix โดยวัดด้วยเครื่อง refractometer

3.1.2 นำไปปั่นแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm นาน 5 นาที ทำซ้ำอีกรอบหนึ่ง

3.1.3 นำกากน้ำตาลที่แยกตะกอนออกแล้วมาเติม $(NH_4)_2HPO_4$ ให้มีความเข้มข้น 0.1% (w/v)

3.1.4 เติม 20% H_2SO_4 ลงในกากน้ำตาลในข้อ 2.1.3 เพื่อปรับค่า pH ให้เป็น 4.5 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 ml ฟลาสก์ละ 90 ml

3.1.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 20 นาที

3.2 การเตรียมหัวเชื้อผสม

3.2.1 นำตัวอย่างน้ำหมักจากถังหมักเอทานอลจำนวน 6 ถังและจากถังเตรียมเซลล์ยีสต์อีก 1 ถัง ผสมกันในอัตราส่วนเท่าๆ กัน

3.2.2 ถ่ายตัวอย่างน้ำหมักจากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 10 ml ลงในอาหารกากน้ำตาลที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.5

3.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3 การเตรียมยีสต์

3.3.1 เตรียมอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 30°Brix ตามวิธีในข้อ 2.1 ปริมาตร 100 ml บรรจุใส่ฟลาสก์ขนาด 250 ml

3.3.2 เติม active dry yeast ประมาณ 1 กรัม ลงในอาหารกากน้ำตาล นำไปบ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิที่ 30°C เป็นเวลา 18 - 20 ชั่วโมง

3.4 การทดสอบผลของการเติมยา Kamoran, Erythromycin และ Hydrogen peroxide

3.4.1 ผลของการเติมยา Kamoran

ทดสอบประสิทธิภาพของยา Kamoran ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนี้

1) เตรียมอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 30°C ตามวิธีในข้อ 2.1 ปริมาตร 270 ml บรรจุใส่ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 500 ml

2) เติมหัวเชื้อผสมที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 ปริมาตร 30 ml

3) เติมเซลล์ยีสต์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3 ปรับให้มีเซลล์ยีสต์ประมาณ 10^6 - 10^7 cells/ml (นับจำนวนเซลล์ยีสต์ในอาหารทดสอบโดยใช้ haemacytometer)

4) แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 20 × 180 mm หลอดละ 19 ml

5) เติมสารละลายยา Kamoran ความเข้มข้น 100 ppm ลงในหลอดอาหารกากน้ำตาลในข้อ 4) หลอดละ 1 มิลลิลิตร จะทำให้มีความเข้มข้นของ Kamoran ในอาหาร 5 ppm

6) นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและจำนวนยีสต์เริ่มต้นตามวิธีในข้อ 3.5

7) นำหลอดทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและจำนวนยีสต์ทุก 24 ชั่วโมง

3.4.2 ผลของการเติมยา Erythromycin

ทดสอบประสิทธิภาพของยา erythromycin ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกดังนี้

1) เตรียมหลอดทดสอบที่มีอาหารกากน้ำตาลความเข้มข้น 30°C และเชื้อผสมเช่นเดียวกับในข้อ 2.4.1

2) เติมสารละลายยา erythromycin ให้มีความเข้มข้น 5 ppm

3) นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและจำนวนยีสต์เริ่มต้น จากนั้นจึงนำไปบ่มและนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มทุก 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

3.4.3 ผลของการเติม Hydrogen peroxide

ทดสอบประสิทธิภาพของ hydrogen peroxide ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนี้

1) เตรียมหลอดทดสอบที่มีอาหารกากน้ำตาลความเข้มข้น 30°Brix และเชื้อผสมเช่นเดียวกับในข้อ 2.4.1

2) เติมสารละลาย hydrogen peroxide ให้มีความเข้มข้น 100 ppm

3) นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและจำนวนยีสต์เริ่มต้น จากนั้นจึงนำไปบ่มและนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มทุก 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

3.5 การนับจำนวนจุลินทรีย์

3.5.1 การนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก

นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี dilution spread plate บนอาหาร ดังนี้

1) ถ่ายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงในหลอดบรรจุ 0.85% NaCl 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}

2) ทำการเจือจางตัวอย่างต่อไปเป็นลำดับแบบ 10-fold จนได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ

3) นำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสม นำมาเพาะโดยวิธีเกลี่ยเชื้อบนจานอาหาร MRS agar ที่มี Natamycin 100 ppm เพื่อยับยั้งยีสต์

4) บ่มจานในโถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48-72 ชั่วโมง

3.5.2 การนับจำนวนยีสต์

นับจำนวนแบคทีเรียยีสต์โดยวิธี dilution spread plate บนอาหาร ดังนี้

1) นำตัวอย่างที่ระดับการเจือจางเหมาะสม เพาะบนจานอาหาร PDA มี chloramphenicol 100 ppm เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย

2) บ่มจานที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48-72 ชั่วโมง

4. ผลของการเติมยา Kamoran ต่อการผลิตเอทานอล

4.1 การเตรียมอาหารกากน้ำตาล

4.1.1 เตรียมอาหารกากน้ำตาลตามวิธีในข้อ 3.1 ปริมาตร 90 ml บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 ml

4.1.2 เตรียมหัวเชื้อผสมตามวิธีในข้อ 2.2 และเตรียมเซลล์ยีสต์ตามวิธีในข้อ 2.3

4.1.3 เติมหัวเชื้อผสมลงในฟลาสก์อาหารกากน้ำตาล ฟลาสก์ละ 1 ml

4.1.4 นับจำนวนเซลล์ยีสต์ในฟลาสก์ทดสอบโดยใช้ haemacytometer หากมีปริมาณต่ำกว่า 10^7 cells/ml ให้ใช้ยีสต์ที่เตรียมไว้เติมลงไป

4.1.5 แบ่งชุดการทดลองเป็นดังนี้

1) ชุดทดสอบที่มียา Kamoran เข้มข้น 5 ppm โดยเติมสารละลายยา Kamoran ความเข้มข้น 500 ppm ปริมาตร 1 ml ลงในอาหารกากน้ำตาล 90 ml

2) ชุดควบคุมที่ไม่มียา Kamoran โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml แทนสารละลายยา Kamoran

3) ชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อน โดยใช้อาหารกากน้ำตาลที่ฆ่าเชื้อแล้ว 90 ml และเติมยีสต์ให้มีความเข้มข้น 10^7 cells/ml

4.1.6 นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและจำนวนยีสต์เริ่มต้นของชุดทดสอบและชุดควบคุมตามวิธีในข้อ 3.6

4.1.7 บ่มฟลาสก์ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

4.1.8 นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและจำนวนยีสต์ตามวิธีข้อ 2.6 และวัดความเข้มข้นเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer ทุก 24 ชั่วโมง

5. การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์เดี่ยว

ทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Diaz et al. (2016) ดังนี้

5.1 การเตรียมแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม

5.1.1 แช่แผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 1.2 × 2.3 × 0.2 cm ในสารละลาย 15% phosphoric acid นำไปให้คลื่นความถี่สูงในเครื่องกำเนิดคลื่นที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที

5.1.2 นำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น

5.1.3 แช่แผ่นในน้ำยาซักผ้าเด็ก และนำไปให้คลื่นความถี่สูงในเครื่องกำเนิดคลื่นที่ 80°C เป็นเวลา 20 นาที

5.1.4 นำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

5.1.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

5.2 การเตรียมกากน้ำตาล

5.2.1 เจือจางกากน้ำตาลเข้มข้นให้ได้ค่า 30 °Brix ที่มี $(NH_4)_2HPO_4$ ความเข้มข้น 0.1% และมี pH 4.5 ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว

5.2.2 บรรจุกากน้ำตาลในหลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติก ขนาด 50 ml หลอดละ 9 ml นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C นาน 20 นาที

5.3. การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

5.3.1. เพาะแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ชั่วโมง

5.3.2 ปรับความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดด้วยเครื่องวัดความขุ่นให้ได้ค่าเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 ซึ่งจะได้เซลล์ประมาณ 1×10^8 cfu/ml

5.4 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม

5.4.1 ถ่ายเซลล์แขวนลอยแต่ละไอโซเลตที่เตรียมได้ในข้อ 5.3.2 ลงในหลอดบรรจุอาหารกากน้ำตาล 9 ml (ข้อ 5.2.2) หลอดละ 1 ml

5.4.2 ใส่แผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม (จากข้อ 5.1.5) ในหลอดทดสอบ หลอดละ 1 แผ่น โดยวางแบบตั้งให้ผิวทั้งสองด้านแช่อยู่ในกากน้ำตาล

5.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

5.4.4 หาปริมาณไบโอฟิล์มตามวิธีในข้อ 5.5

5.5 การหาปริมาณไบโอฟิล์ม

5.5.1 นำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมออกมาล้างโดยการจุ่มในสารละลาย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง โดยเปลี่ยนสารละลาย 0.85% NaCl ทุกครั้ง

5.5.2 ใส่แผ่นลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มี 0.85% NaCl ปริมาตร 10 ml นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียที่เกาะติดกับแผ่นหลุดออก

5.5.3 เจือจาง 0.85% NaCl ที่มีเซลล์แบคทีเรียแบบ 10-fold dilution โดยถ่ายตัวอย่าง 1 ml ลงใน 0.85% NaCl 9 ml ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเจือจางต่อไปโดยวิธีเดียวกันเป็นลำดับ

5.5.4 เพาะตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสมโดยวิธี pour plate ด้วยอาหาร MRS agar

5.5.5 บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C ในโถบ่มเชื้อไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

5.5.6 นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย คำนวณปริมาณไบโอฟิล์ม และรายงานผลในหน่วย log cfu/cm^2

6. การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในสภาวะการหมักจำลอง

6.1 การเตรียมหัวเชื้อผสมในกากน้ำตาล

6.1.1 เตรียมหัวเชื้อผสมโดยการถ่ายเชื้อจากน้ำหมักผสม 10 ml ลงในกากน้ำตาลความเข้มข้น 30 °Brix ที่มี $(NH_4)_2HPO_4$ ความเข้มข้น 0.1% และมีค่า pH 4.5 และบ่มไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามขั้นตอนที่กล่าวมาในข้อ 3.2

6.1.2 แบ่งหัวเชื้อผสมในข้อ 6.1 ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดบรรจุ 50 ml หลอดละ 10 ml

6.1.3 นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและจำนวนยีสต์เริ่มต้นโดยวิธี dilution spread plate ด้วยอาหาร MRS agar ที่มี Natamycin และวิธี dilution spread plate ด้วยอาหาร PDA ที่มี chloramphenicol ตามลำดับ ดังที่อธิบายไว้ในข้อ 3.5

6.2 การเตรียมแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิม

ล้างแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 1.2x2.3x0.2 cm และขนาด 1x1x0.2 cm และฆ่าเชื้อตามขั้นตอนที่กล่าวมาในข้อ 5.1

6.3 การทดสอบการสร้างไบโอฟิล์ม

6.3.1 ใส่แผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 1.2x2.3x0.2 cm ลงในหลอดบรรจุหัวเชื้อผสม (ข้อ 6.1.2) หลอดละ 1 แผ่น และใส่แผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมขนาด 1×1x0.2 cm ในหลอดบรรจุหัวเชื้อผสมอีก 1 หลอดสำหรับตรวจดูการสร้างไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

6.3.2 นำหลอดทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

6.3.3 หาปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียและไบโอฟิล์มของยีสต์ทุก 24 ชั่วโมง จนครบเวลาการบ่ม 96 ชั่วโมง ตามวิธีในข้อ 5.5 (นับจำนวนไบโอฟิล์มของยีสต์โดยการเพาะด้วยอาหาร PDA ที่เติม Chloramphenicol 100 ppm)

6.4 การศึกษาไบโอฟิล์มด้วยกล้อง SEM

6.4.1 นำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่บ่ม 24 และ 96 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.85% NaCl จำนวน 2 รอบ

6.4.2 ทำการตรึงตัวอย่างด้วย 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.4.3 ล้างด้วย 0.1M phosphate buffer saline pH7 ที่อุณหภูมิ 4ºC จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6.4.4 นำมาดึงน้ำออกจากตัวอย่าง ด้วย ethyl alcohol 70%, 80%, 90% และ 100% เป็นลำดับ ครั้งละ 30 นาที จำนวน 2 รอบ

6.4.5 นำไปทำแห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่อง critical point drying

6.4.6 ติดตัวอย่างลงบน stub แล้วนำไปเคลือบด้วยทองคำ และตรวจดูด้วยกล้อง SEM (LEO 1450 VP, Leo Electron Microscope, UK)

ผลการวิจัย

1. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษา เก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็งในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80°C เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth พบว่ามีแบคทีเรียบางส่วนไม่สามารถฟื้นสภาพได้ และเหลือแบคทีเรียทดสอบเพียง 20 ไอโซเลต เมื่อนำทั้งหมดมาวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พร้อมทั้งทำการสร้าง phylogenic tree สามารถจัดจำแนกสปีชีส์ได้เป็น *Lactobacillus plantarum* จำนวน 11 ไอโซเลต สปีชีส์ *L. farraginis* จำนวน 6 ไอโซเลต สปีชีส์ *L. rhamnosus* จำนวน 1 ไอโซเลต และเป็นจีนัส *Lactobacillus* แต่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้อีก 2 ไอโซเลต ดังรายละเอียดใน**ตารางที่ 1**

2. การหาค่า MIC ของยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ Kamoran และ Erythromycin และต่อสารเคมี 1 ชนิด ได้แก่ hydrogen peroxide ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 20 ไอโซเลตที่พบได้มากในกระบวนการผลิตเอทานอลของโรงงานที่เลือกศึกษา ซึ่งเป็นโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ต่อสารทดสอบโดยใช้วิธี macro broth dilution โดยใช้อาหารทดสอบเป็น MRS broth พบว่าค่า MIC ของยา Kamoran ต่อแบคทีเรียทุกไอโซเลตทั้งหมดมีค่าสูงกว่า 100 ppm ในขณะที่ค่า MIC ของยา Erythromycin ต่อแบคทีเรียทดสอบมีค่าอยู่ในช่วงน้อยกว่า 0.1 ถึง มากกว่า 50 ppm โดย *L. plantarum* ทั้ง 11 ไอโซเลตมีค่า MIC ต่อ Erythromycin อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 25 ppm ในขณะที่ค่า MIC ของยาชนิดนี้ต่อ *L. farraginis* อยู่ระหว่าง <0.1 ถึง >50 ppm สำหรับค่า MIC ของ hydrogen peroxide ต่อแบคทีเรียทดสอบมีค่าอยู่ในช่วง <1 ถึง >400 ppm โดยค่า MIC ต่อ *L. plantarum* อยู่ระหว่าง 100 ถึง >400 ppm และค่า MIC ต่อ *L. farraginis* มีค่า MIC อยู่ในช่วง <0.1 ถึง >400 ppm รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 2**

ตารางที่ 1 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงานผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

Plant Code	Isolate No.		Taxon	Accession No.	% Identity
DC	1		*Lactobacillus farraginis*	AB690236.1	99
	2		*Lactobacillus plantarum*	KM485573	99
	3		*Lactobacillus plantarum*	KJ779096	99
	4		*Lactobacillus plantarum*	KR336551	99
	5		*Lactobacillus plantarum*	KR336551	99
	6		*Lactobacillus farraginis*	AB690223	99
	7		*Lactobacillus farraginis*	AB690236	99
KL	8		*Lactobacillus plantarum*	KR336551	99
	9		*Lactobacillus* sp.	GQ359860	99
	10		*Lactobacillus farraginis*	AB690214	99
PK	11		*Lactobacillus plantarum*	KR336551	99
	12		*Lactobacillus plantarum*	KC815026	99
	13		*Lactobacillus* sp.	JQ013418	99
	14		*Lactobacillus plantarum*	KM497502	100
	15		*Lactobacllus rhamnosus*	KM350174	99
	16		*Lactobacillus plantarum*	KR336551	99
	17		*Lactobacillus plantarum*	AB795645	99
	18		*Lactobacillus farraginis*	AB690214	99
	19		*Lactobacillus plantarum*	AB904768	98
	20		*Lactobacillus farraginis*	AB690223	99

ตารางที่ 2 ค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ต่อ Kamoran, Erythromycin และ Hydrogen peroxide ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงานผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล เมื่อทดสอบในอาหาร MRS broth ด้วยวิธี Macrobroth dilution

Isolate No.	สปีชีส์	Minimal Inhibitory Concentration (ppm)		
		Kamoran	Erythromycin	Hydrogen peroxide
1	*Lactobacillus farraginis*	>100	<0.1	50
2	*Lactobacillus plantarum*	>100	0.5	100
3	*Lactobacillus plantarum*	>100	0.5	400
4	*Lactobacillus plantarum*	>100	1	200
5	*Lactobacillus plantarum*	>100	0.5	>400
6	*Lactobacillus farraginis*	>100	>50	400
7	*Lactobacillus farraginis*	>100	0.5	<0.1
8	*Lactobacillus plantarum*	>100	0.5	100
9	*Lactobacillus* sp.	>100	<0.1	50
10	*Lactobacillus farraginis*	>100	>50	100
11	*Lactobacillus plantarum*	>100	25	200
12	*Lactobacillus plantarum*	>100	0.5	100
13	*Lactobacillus* sp.	>100	>50	400
14	*Lactobacillus plantarum*	>100	20	400
15	*Lactobacllus rhamnosus*	>100	3	300
16	*Lactobacillus plantarum*	>100	3	300
17	*Lactobacillus plantarum*	>100	3	100
18	*Lactobacillus farraginis*	>100	3	100
19	*Lactobacillus plantarum*	>100	10	100
20	*Lactobacillus farraginis*	>100	3	>400

3. ผลของการเติมยา Kamoran , Erythromycin และ Hydrogen peroxide ในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะการหมักจำลอง

จากการทดสอบผลของการเติมสารยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้แก่ Kamoran, Erythromycin และ hydrogen peroxide ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในสภาวะการหมักจำลองในอาหารกากน้ำตาลโดยทดสอบที่ความเข้มข้นยา Kamoran ที่ 5 ppm ยา Erythromycin ที่ 5 ppm และ hydrogen peroxide ที่ 100 ppm พบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมงมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกเฉลี่ย 6.72 ± 0.09 log cfu/ml ซึ่งไม่แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้นซึ่งมี

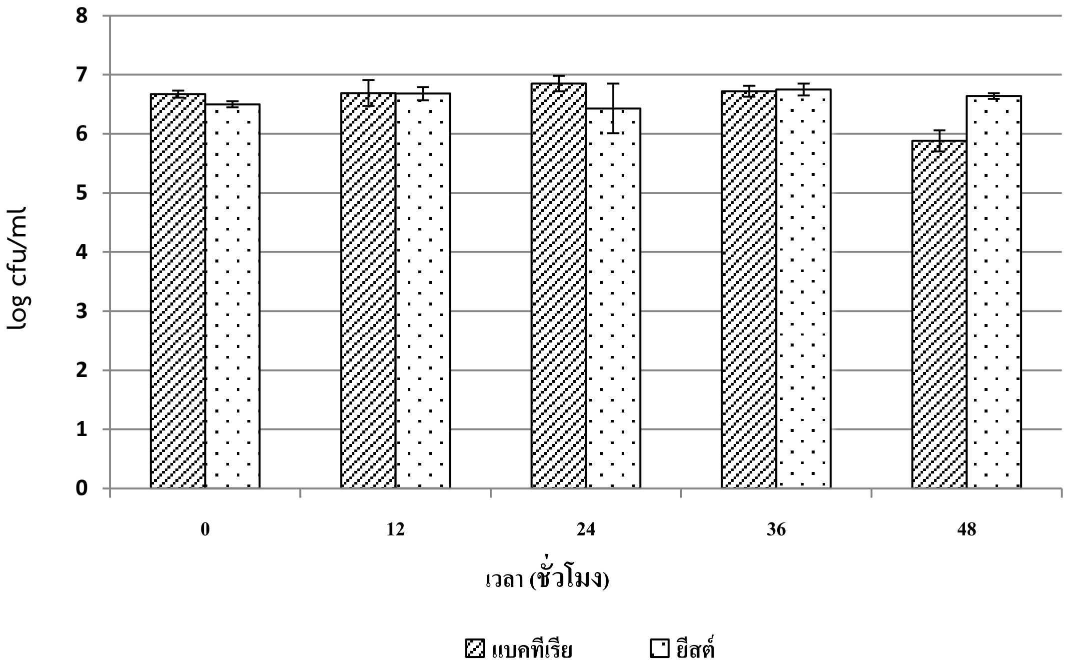
ปริมาณเฉลี่ย 6.67±0.06 log cfu/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 หลังจากนั้นจำนวนเชื้อจะไม่เปลี่ยนแปลงจนถึงชั่วโมงที่ 36 แต่เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกลดลงแตกต่างจากเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเฉลี่ย 5.88±0.02 log cfu/ml หรือคิดเป็นจำนวนที่ลดลง 0.79 log cfu/ml สำหรับปริมาณยีสต์นั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างจากเริ่มต้นตลอดระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 6.43±0.42 log cfu/ml ถึง 6.75±0.02 log cfu/ml รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 3** และ**ภาพที่ 1**

ตารางที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มี Kamoran 5 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	แบคทีเรียกรดแลคติก (log cfu/ml)	ยีสต์ (log cfu/ml)
0	6.67 ± 0.06[a]	6.50 ± 0.05[a]
12	6.69 ± 0.22[a]	6.68 ± 0.11[a]
24	6.85 ± 0.13[a]	6.43 ± 0.42[a]
36	6.72 ± 0.09[a]	6.75 ± 0.02[a]
48	5.88 ± 0.02[b]	6.64 ± 0.03[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน (a, b) แสดงความแตกต่างของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันที่ระดับ นัยสำคัญ 0.05

สำหรับผลของการเติมยา Erythromycin ที่ 5 ppm ในกากน้ำตาลต่อปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์นั้นพบว่าหลังบ่มนาน 12 ชั่วโมง ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากค่าเฉลี่ย 6.72±0.18 log cfu/ml เป็นเฉลี่ย 7.04±0.03 log cfu/ml และเมื่อบ่มนานขึ้นปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกมีแนวโน้มเพิ่มอย่างต่อเนื่อง โดยมีค่าเฉลี่ย 7.72±0.06 log cfu/ml ที่เวลา 48 ชั่วโมง สำหรับปริมาณยีสต์นั้นพบว่ามีแนวโน้มไม่เปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้น โดยมีค่าอยู่ในช่วง 6.49±0.17 log cfu/ml ถึง 6.69±0.02 log cfu/ml รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 4 และภาพที่ 2**

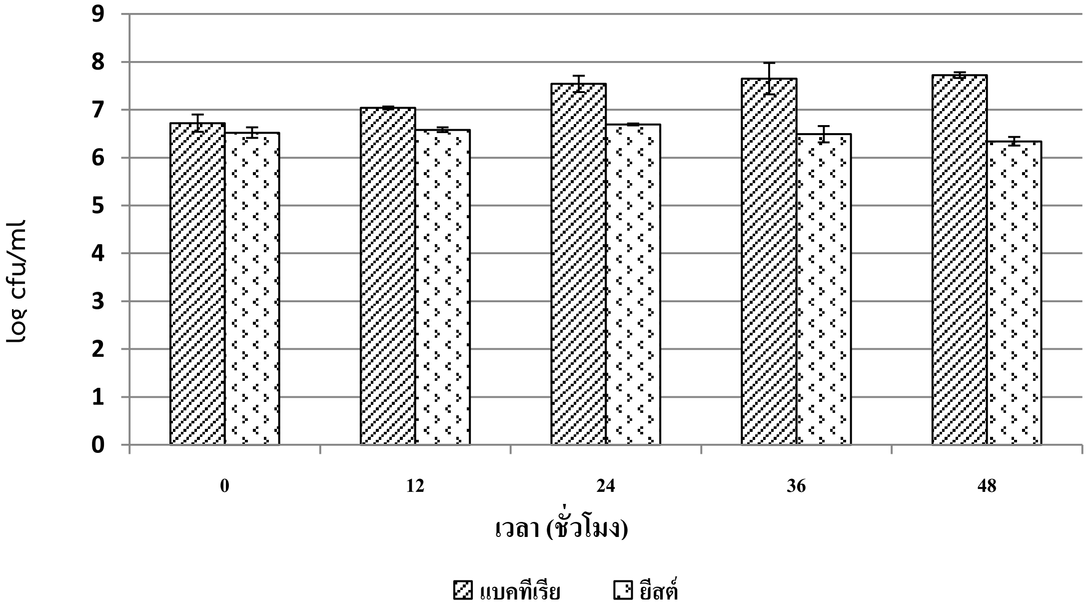


ภาพที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกและปริมาณยีสต์ในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran ความเข้มข้น 5 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มียา Erythromycin เข้มข้น 5 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	แบคทีเรียกรดแลคติก (log cfu/ml)	ยีสต์ (log cfu/ml)
0	6.72 ± 0.18^{a}	6.52 ± 0.11^{a}
12	7.04 ± 0.03^{b}	6.58 ± 0.05^{a}
24	7.54 ± 0.17^{c}	6.69 ± 0.02^{a}
36	7.65 ± 0.33^{c}	6.49 ± 0.17^{a}
48	7.72 ± 0.06^{c}	6.34 ± 0.09^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน (a, b, c) แสดงความแตกต่างกันของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



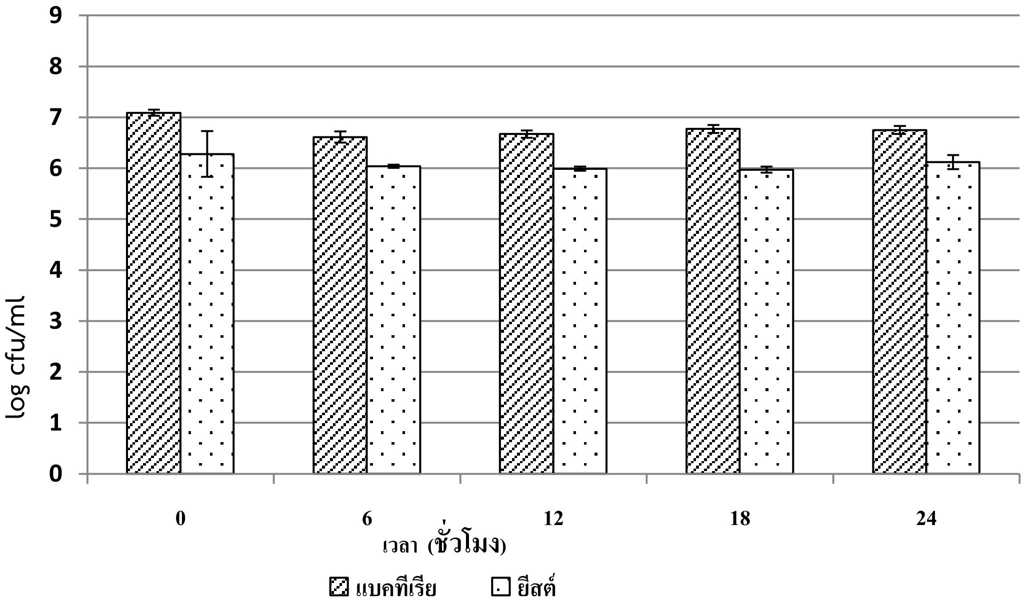
ภาพที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มียา Erythromycin 5 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบผลของการเติม hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100 ppm ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในกากน้ำตาล พบว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมงปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในกากน้ำตาลลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากเริ่มต้นที่ค่าเฉลี่ย 7.09±0.06 log cfu/ml เป็น 6.61±0.11 log cfu/ml (ลดลงเฉลี่ย 0.48 log cfu/ml) จากนั้นจะมีปริมาณไม่เปลี่ยนแปลงจนถึง 24 ชั่วโมงของการบ่ม สำหรับเซลล์ยีสต์นั้นพบว่ามีปริมาณคงที่เช่นเดียวกับในการทดสอบกับยา Kamoran และยา Erythromycin โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.97±0.06 log cfu/ml ถึง 6.28±0.45 log cfu/ml รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 5** และ**ภาพที่ 3**

ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มี hydrogen peroxide เข้มข้น 100 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	แบคทีเรียกรดแลคติก (log cfu/ml)	ยีสต์ (log cfu/ml)
0	7.09 ± 0.06[a]	6.28 ± 0.45[a]
6	6.61 ± 0.11[b]	6.04 ± 0.03[a]
12	6.67 ± 0.07[b]	5.99 ± 0.04[a]
18	6.77 ± 0.08[b]	5.97 ± 0.06[a]
24	6.75 ± 0.08[b]	6.12 ± 0.14[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน (a, b) แสดงความแตกต่างกันของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและปริมาณยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มี hydrogen peroxide 100 ppm เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ผลของการเติมยา Kamoran ต่อการผลิตเอทานอล

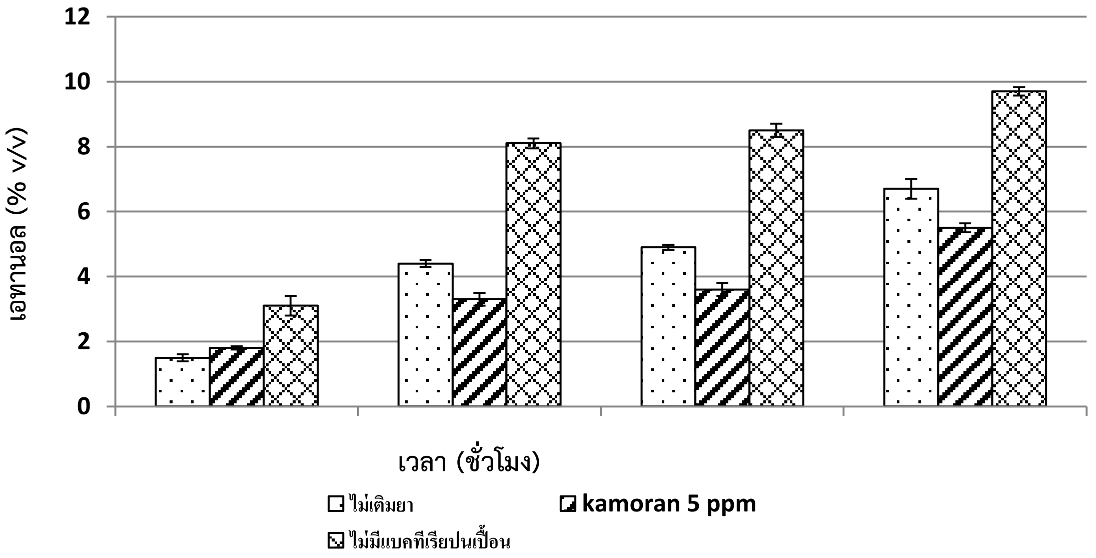
จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในกากน้ำตาลที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสมอยู่ร่วมกับยีสต์เมื่อเติมยา Kamoran ความเข้มข้น 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมยา Kamoran และชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าทุกชุดทดสอบยีสต์มีการผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น โดยในชุดทดลองที่เติมยา Kamoran 5 ppm ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเฉลี่ย 5.5±0.14 % (v/v) ภายในเวลา 96 ชั่วโมง

ในขณะที่ในชุดควบคุมที่ไม่เติมยา Kamoran มีการผลิตเอทานอลได้เฉลี่ย 6.7±0.30 %v/v และในชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อนได้เอทานอลสูงสุดเฉลี่ย 9.7±0.13 % (v/v) รายละเอียดแสดงใน **ตารางที่ 6 และภาพที่ 4**

ตารางที่ 6 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่เติมยา Kamoran 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมยา Kamoran และชุดที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสม เมื่อทดสอบในสภาวะการหมักจำลองในกากน้ำตาล บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 96 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง / **เวลา (ชั่วโมง)**	**เอทานอล (% v/v)**			
	24	**48**	**72**	**96**
ไม่เติมยา Kamoran	1.5 ± 0.11^{aA}	4.4 ± 0.10^{bA}	4.9 ± 0.08^{bA}	6.7 ± 0.30^{cA}
เติมยา Kamoran 5 ppm	1.8 ± 0.05^{aA}	3.3 ± 0.20^{bB}	3.6 ± 0.20^{bB}	5.5 ± 0.14^{cB}
ไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อน	3.1 ± 0.30^{aB}	8.1 ± 0.15^{bC}	8.5 ± 0.21^{bC}	9.7 ± 0.13^{cC}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกัน (a, b, c)แสดงความแตกต่างของข้อมูลในแถวเดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ ที่แตกต่างกัน (A, B) แสดงความแตกต่างของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



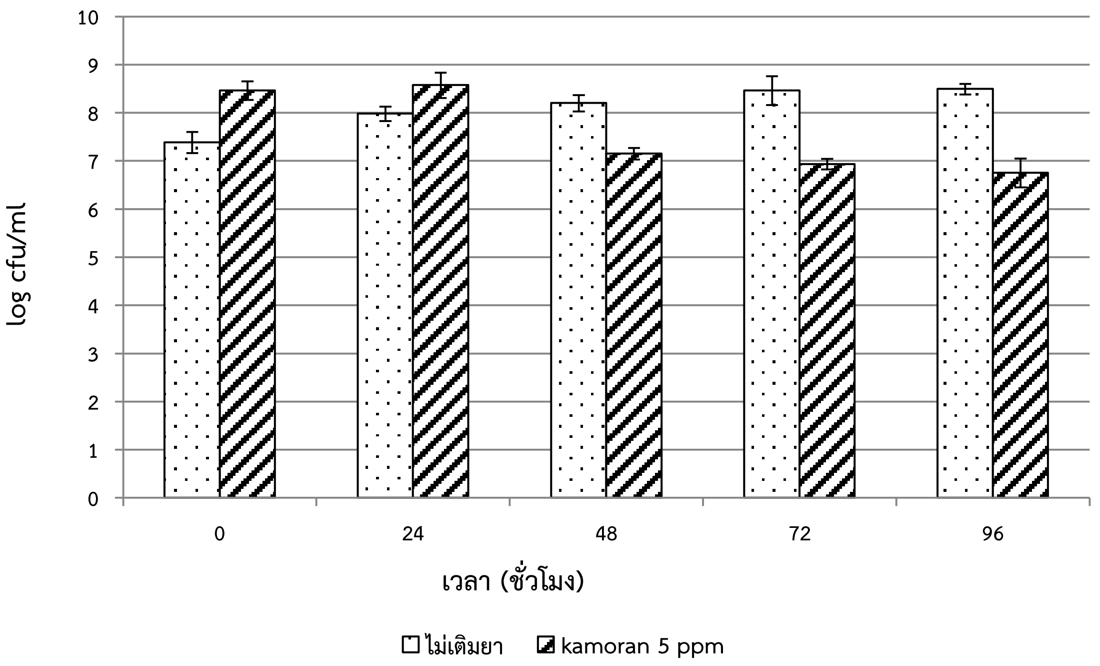
ภาพที่ 4 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่เติมยา Kamoran 5 ppm เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่เติมยา Kamoran และชุดที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสม เมื่อทดสอบในสภาวะการหมักจำลองในกากน้ำตาล บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 96 ชั่วโมง

สำหรับผลการนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกผสมนั้นพบว่าในชุดที่เติมยา Kamoran 5 ppm มีปริมาณเริ่มต้นเฉลี่ย 8.46±0.19 log cfu/ml เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมงปริมาณเซลล์ลดลงเหลือเฉลี่ย7.15±0.12 log cfu/ml (ลดลงเฉลี่ย 1.31 log cfu/ml) ซึ่งแตกต่างจากเวลาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มเป็นลำดับเหลือเฉลี่ย 6.75±0.30 log cfu/ml ที่เวลา 96 ชั่วโมง หรือคิดเป็นปริมาณเชื้อที่ลดลงจากเริ่มต้นเฉลี่ย 1.71 log cfu/ml สำหรับในชุดควบคุมที่ไม่เติมยา Kamoran นั้นพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้นเฉลี่ย 7.38±0.22 log cfu/ml เมื่อบ่มนานขึ้นปริมาณเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีปริมาณเฉลี่ย 8.49±0.11 log cfu/ml ที่เวลา 96 ชั่วโมง หรือคิดเป็นปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 1.11 log cfu/ml รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 7** และ**ภาพที่ 5**

ตารางที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran 5 ppm และที่ไม่เติมยา Kamoran ที่เวลาต่างๆ เมื่อทดสอบในสภาวะการหมักจำลองที่อุณหภูมิ 30°C

ชุดการทดลอง	**ปริมาณ (log cfu/ml)**				
	0 ชั่วโมง	**24 ชั่วโมง**	**48 ชั่วโมง**	**72 ชั่วโมง**	**96 ชั่วโมง**
ไม่เติมยา Kamoran	7.38 ± 0.22^{aA}	7.98 ± 0.15^{bA}	8.20 ± 0.17^{cA}	8.46 ± 0.30^{cA}	8.49 ± 0.11^{cA}
เติมยา Kamoran 5 ppm	8.46 ± 0.19^{aB}	8.57 ± 0.26^{aB}	7.15 ± 0.12^{bB}	6.93 ± 0.11^{bB}	6.75 ± 0.30^{cB}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกัน (a, b, c) แสดงความแตกต่างของข้อมูลในแถวเดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ ที่แตกต่างกัน (A, B) แสดงความแตกต่างของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



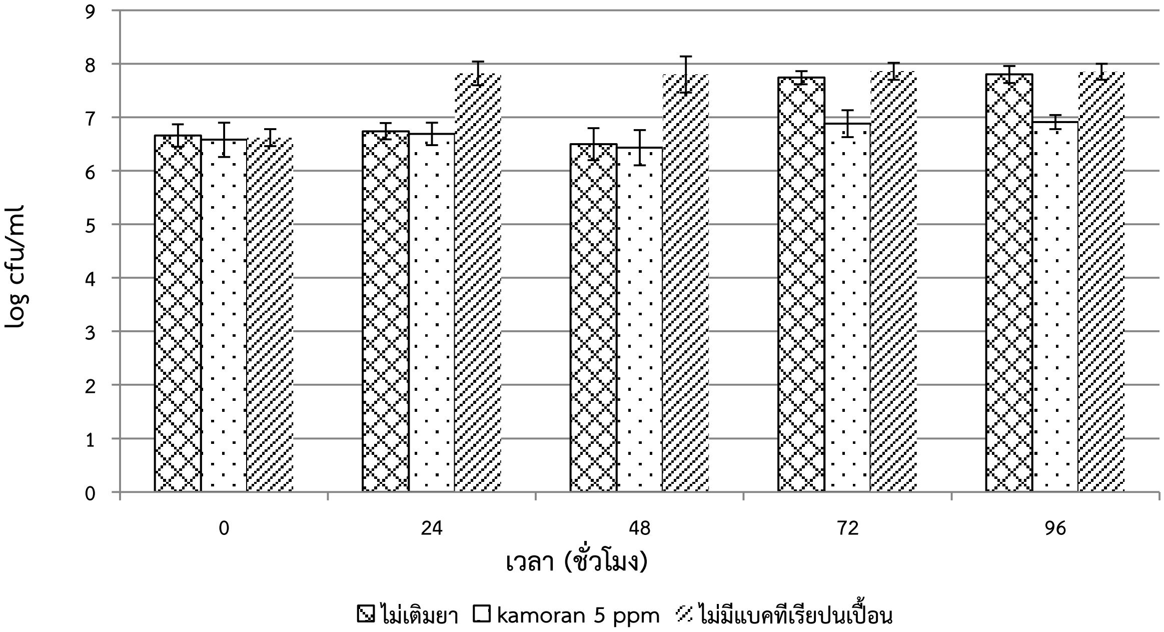
ภาพที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran 5 ppm และชุดที่ไม่เติมยา Kamoran ที่เวลาต่างๆ เมื่อทดสอบในสภาวะการหมักจำลองที่อุณหภูมิ 30°C

ปริมาณยีสต์ในชุดทดสอบที่เติม Kamoran และชุดที่ไม่เติม Kamoran เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อบ่มเป็นระยะเวลาต่างๆ แสดงใน**ตารางที่ 8** และ**ภาพที่ 6** พบว่าในชุดทดลองที่เติมยา Kamoran ที่ 5 ppm เริ่มต้นพบจำนวนยีสต์เฉลี่ย 6.58±0.32 log cfu/ml และมีแนวโน้มเพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อบ่มนานขึ้น กล่าวคือที่ระยะเวลาการบ่ม 96 ชั่วโมง พบยีสต์จำนวนเฉลี่ย 6.91±0.13 log cfu/ml หรือคิดเป็นจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น 0.33 log cfu/ml ในขณะที่ในชุดควบคุมที่ไม่เติมยา Kamoran พบยีสต์เริ่มต้นจำนวน 6.66±0.21 log cfu/ml และมีแนวโน้มเพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น โดยมีจำนวน 7.80±0.16 log cfu/ml ที่เวลา 96 ชั่วโมง คิดเป็นจำนวนที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.14 log cfu/ml สำหรับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสมนั้นมียีสต์เริ่มต้น6.62±0.16 log cfu/ml และเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 7.85±0.15 log cfu/ml ที่เวลา 96 ชั่วโมง หรือเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 1.23 log cfu/ml

ตารางที่ 8 ปริมาณยีสต์ในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran 5 ppm และที่ไม่เติมยา Kamoran เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อบ่มในสภาวะการหมักจำลองที่อุณหภูมิ 30°C

ชุดการทดลอง	ปริมาณ (log cfu/ml)				
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
ไม่เติมยา Kamoran	6.66±0.21^{aA}	6.74±0.15^{bA}	6.50±0.30^{cA}	7.74±0.12^{cA}	7.80±0.16^{cA}
เติมยา Kamoran 5 ppm	6.58±0.32^{aA}	6.69±0.21^{aA}	6.43±0.32^{bA}	6.88±0.25^{bB}	6.91±0.13^{cB}
ไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อน	6.62±0.16^{aA}	7.82±0.22^{bB}	7.80±0.33^{bB}	7.86±0.16^{bA}	7.85±0.15^{bA}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกัน (a, b, c) แสดงความแตกต่างของข้อมูลในแถวเดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่ ที่แตกต่างกัน (A, B) แสดงความแตกต่างของข้อมูลในคอลัมน์เดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



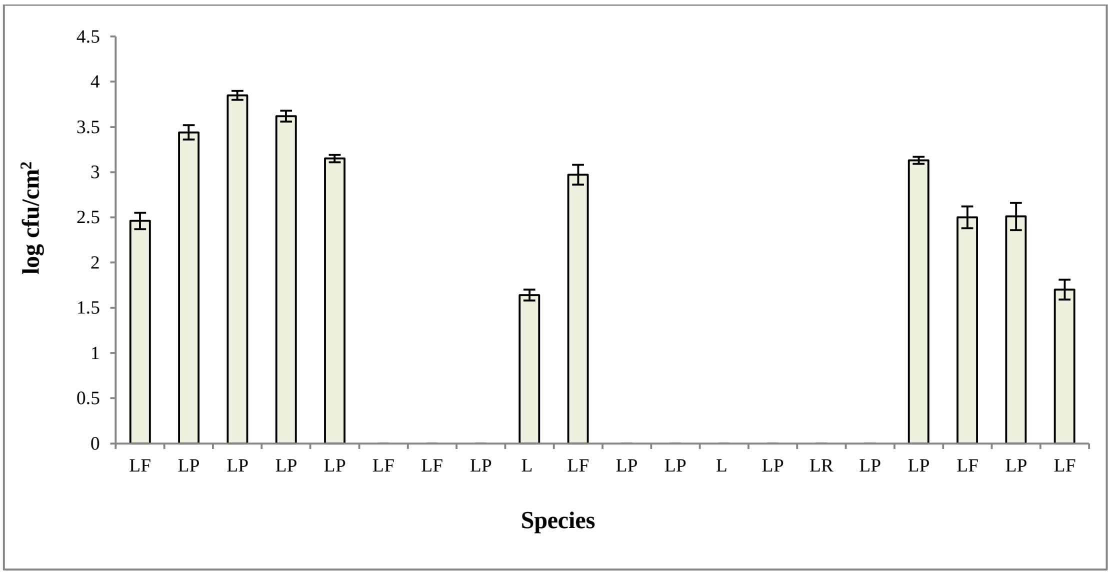
ภาพที่ 6 ปริมาณยีสต์ในกากน้ำตาลที่เติมยา Kamoran ที่ 5 ppm และที่ไม่เติมยา Kamoran เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสม เมื่อบ่มในสภาวะการหมักจำลองที่อุณหภูมิ 30°C

4. การสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว

ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลต บนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมเกรด 304 ชนิดผิวไม่เรียบ เมื่อบ่มในกากน้ำตาลเข้มข้น 30°Brix นาน 96 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นโดยวิธีนับจำนวนเซลล์ในไบโอฟิล์มด้วยวิธี colony count บน MRS agar พบว่าแบคทีเรียทดสอบจำนวน 20 ไอโซเลต สร้างไบโอฟิล์มได้จำนวน 12 ไอโซเลต โดยปริมาณไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นมีความหนาแน่นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.64 ± 0.06 log cfu/cm^2 ถึง 3.85 ± 0.05 log cfu/cm^2 เมื่อพิจารณาการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันพบว่ามีความสามารถแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น *L. plantarum* จำนวน 11 ไอโซเลต พบการสร้างไบโอฟิล์มจำนวน 8 ไอโซเลต อีก 3 ไอโซเลตไม่พบการสร้างไบโอฟิล์ม เช่นเดียวกับ *L. farraginis* ที่พบการสร้างไบโอฟิล์ม 3 ไอโซเลตจากทั้งหมด 6 ไอโซเลต รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 9** และ**ภาพที่ 6**

ตารางที่ 9 ปริมาณไบโอฟิล์มบนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว จำนวน 20 ไอโซเลต เมื่อบ่มในกากน้ำตาลเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ไอโซเลตที่	สปีชีส์	ไบโอฟิล์ม (log cfu/cm^2)
1	*Lactobacillus farraginis*	2.46 ± 0.09
2	*Lactobacillus plantarum*	3.44 ± 0.08
3	*Lactobacillus plantarum*	3.85 ± 0.05
4	*Lactobacillus plantarum*	3.62 ± 0.06
5	*Lactobacillus plantarum*	3.15 ± 0.04
6	*Lactobacillus farraginis*	<1.0
7	*Lactobacillus farraginis*	<1.0
8	*Lactobacillus plantarum*	<1.0
9	*Lactobacillus* sp.	<1.0
10	*Lactobacillus farraginis*	<1.0
11	*Lactobacillus plantarum*	3.13 ± 0.04
12	*Lactobacillus plantarum*	<1.0
13	*Lactobacillus* sp.	1.64 ± 0.06
14	*Lactobacillus plantarum*	2.97 ± 0.11
15	*Lactobacllus rhamnosus*	<1.0
16	*Lactobacillus plantarum*	<1.0
17	*Lactobacillus plantarum*	2.50 ± 0.12
18	*Lactobacillus farraginis*	2.52 ± 0.08
19	*Lactobacillus plantarum*	2.51 ± 0.15
20	*Lactobacillus farraginis*	1.7 ± 0.11



ภาพที่ 7 ปริมาณไบโอฟิล์ม (log cfu/cm^2) ที่สร้างบนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวจำนวน 20 ไอโซเลต เมื่อบ่มในกากน้ำตาลเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

LF = *Lactobacillus farraginis*; LP = *Lactobacillus plantarum*; L = *Lactobacillus* sp.; LR = *Lactobacillus rhamnosus*

5. การสร้างไบโอฟิล์มในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง

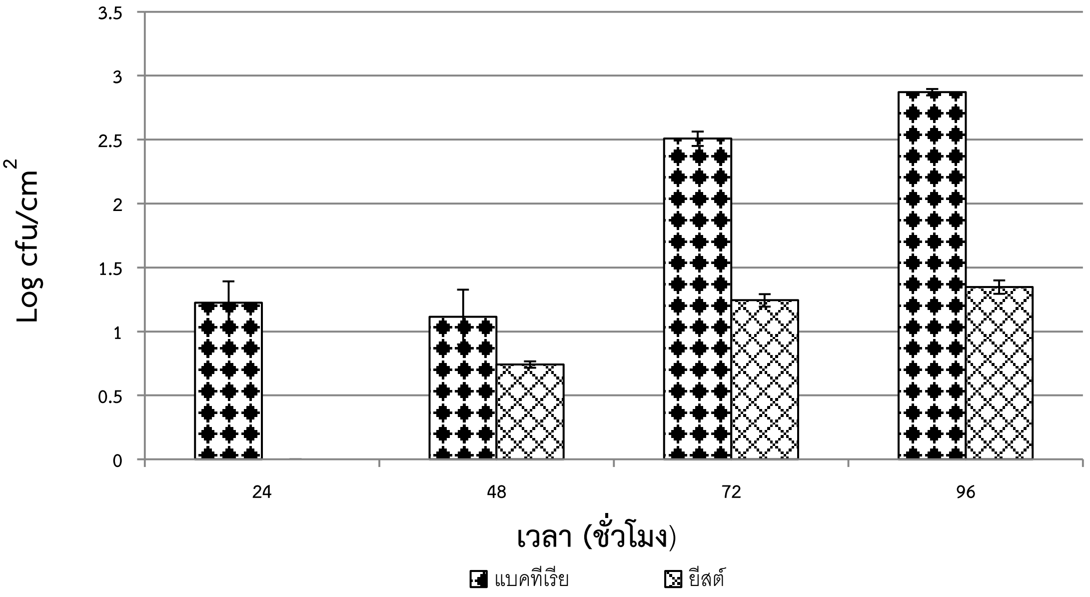
ทำการทดสอบการสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่อยู่ในกากน้ำตาลเข้มข้น 30 °Brix ในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองโดยมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกผสมเริ่มต้น 6.4±0.21 log cfu/ml และมีจำนวนยีสต์เริ่มต้น 6.1±0.13 log cfu/ml ตรวจวัดปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ระยะเวลาการบ่มต่างๆ ด้วยวิธี colony count โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมยา Natamycin เพื่อยับยั้งยีสต์ที่อยู่ในตัวอย่าง และหาปริมาณไบโอฟิล์มของยีสต์โดยวิธี colony count ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม chloramphenicol เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง พบไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณเฉลี่ย 1.22±0.17 log cfu/cm^2 แต่ไม่พบไบโอฟิล์มของยีสต์ เมื่อบ่มนาน 24 ชั่วโมงพบไบโอฟิล์มของยีสต์เฉลี่ย 0.74±0.21 log cfu/cm^2 ในขณะที่ไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.11±0.21 log cfu/cm^2 ซึ่งไม่แตกต่างจากที่ 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ที่ระยะเวลาการบ่ม 72 ชั่วโมง พบไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นเฉลี่ย 2.51±0.05 log cfu/cm^2 แตกต่างจากที่ 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เช่นเดียวกับไบโอฟิล์มของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 1.24 0.04 log cfu/cm^2 และเมื่อบ่มนาน 96 ชั่วโมงพบไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรด

แลคติกเพิ่มขึ้นเป็น 2.87±0.03 log cfu/cm^2 และพบไบโอฟิล์มของยีสต์เพิ่มขึ้นเป็น 1.35±0.05 log cfu/cm^2 รายละเอียดแสดงใน**ตารางที่ 10** และ**ภาพที่ 8**

ตารางที่ 10 ปริมาณไบโอฟิล์ม (log cfu/cm^2) ของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์บนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง เมื่อบ่มเป็นระยะเวลาต่างกัน

	ไบโอฟิล์ม (log cfu/cm^2)			
	24 ชั่วโมง	**48 ชั่วโมง**	**72 ชั่วโมง**	**96 ชั่วโมง**
แบคทีเรียกรดแลคติก	1.22 ± 0.17^a	1.11 ± 0.21^a	2.51 ± 0.05^b	2.87 ± 0.03^c
ยีสต์	0 ± 0.0^a	0.74 ± 0.21^b	1.24 ± 0.04^c	1.35 ± 0.05^d

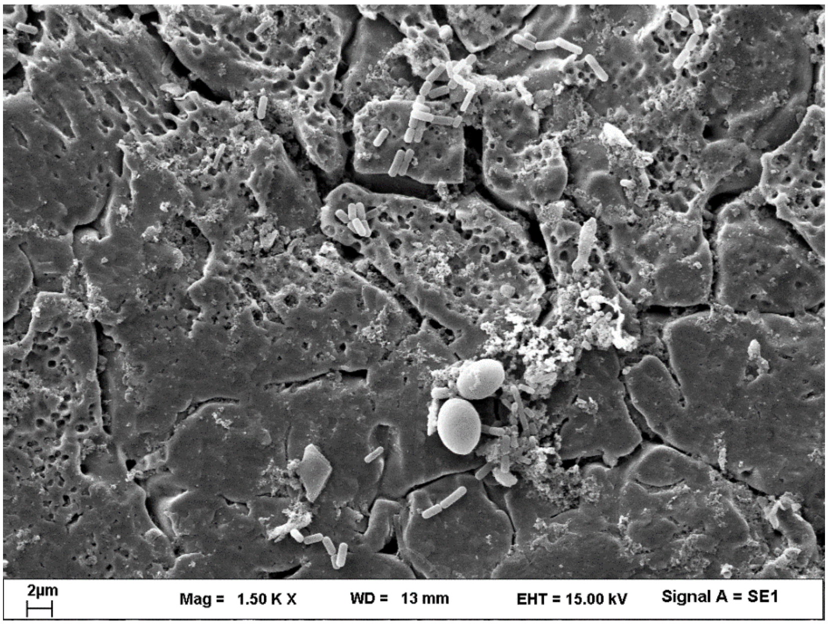
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกัน (a, b, c) แสดงความแตกต่างของข้อมูลในแถวเดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



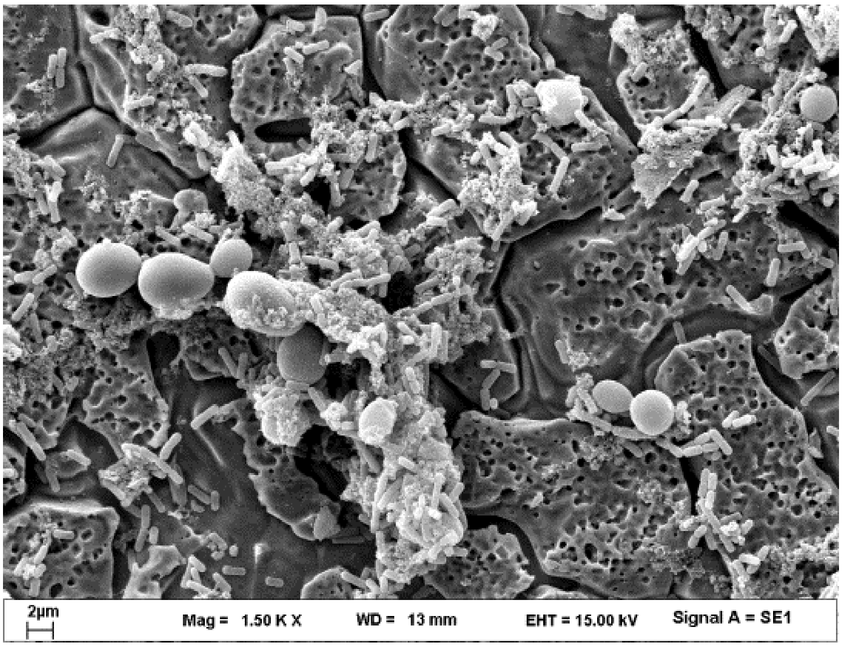
ภาพที่ 8 ปริมาณไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ (log cfu/cm^2) บนผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง เมื่อบ่มเป็นระยะเวลาต่างกัน

เมื่อนำแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่แช่ในกากน้ำตาลในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองเป็นเวลา 24 และ 96 ชั่วโมง ไปตรวจดูพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าที่เวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง มีเซลล์แบคทีเรียรูปร่างท่อนยาวเกาะอยู่เป็นกลุ่มเล็กๆบนผิวแผ่นเหล็กปลอดสนิมและพบเซลล์ยีสต์บ้างแต่มีจำนวนน้อยกว่าแบคทีเรีย และเมื่อบ่มนาน 96 ชั่วโมง

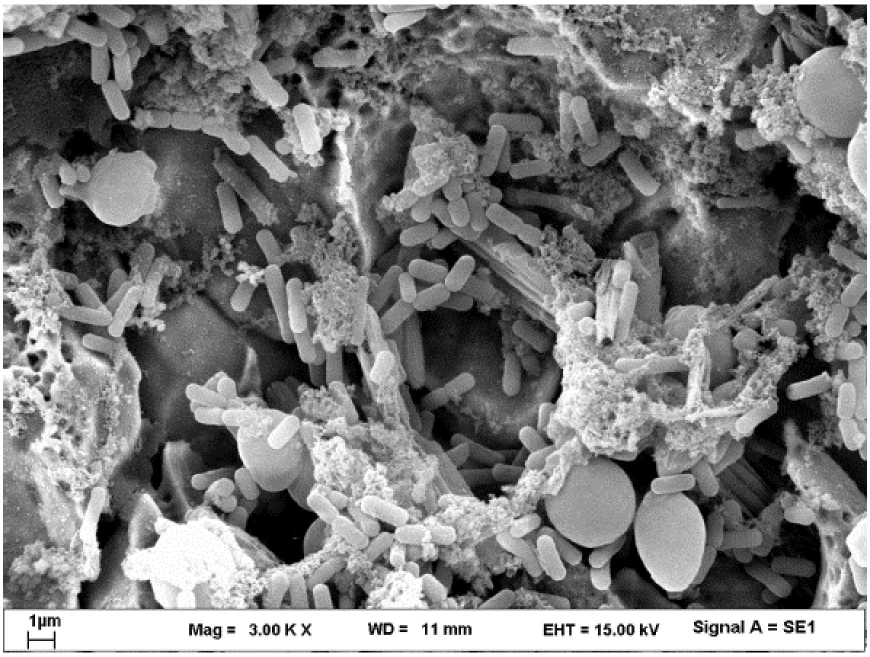
พบกลุ่มของแบคทีเรียขนาดใหญ่ขึ้นโดยมีเซลล์จำนวนหนึ่งถูกปกคลุมด้วยวัสดุคล้ายสารพอลิเมอร์ และพบเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นกว่าที่ 24 ชั่วโมง ดังแสดงใน**ภาพที่ 9**



ก



ข



ค

ภาพที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของผิวแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่ผ่านการแช่ในกากน้ำตาลในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ ก กำลังขยาย 1,500 เท่า) และบ่มนาน 96 ชั่วโมง (ภาพ ข กำลังขยาย 1,500 เท่าและภาพ ค กำลังขยาย 3,000 เท่า)

บทที่ 3
อภิปรายผลการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียปนเปื้อนที่พบได้มากในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพในอุตสาหกรรมเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถปรับตัวให้ทนต่อสภาวะของการหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้ดี (Beckner et al., 2011) มีรายงานว่า *Lactobacillus* เป็นจีนัสในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้บ่อยในโรงงานผลิตเอทานอลชีวภาพทั้งของไทยและทั่วโลก สอดคล้องกับในโครงการวิจัยนี้ที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 20 ไอโซเลตที่แยกได้จากถังเลี้ยงยีสต์และถังหมักของโรงงานเอทานอลจำนวน 3 แห่ง จัดอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* เมื่อทำการระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียเหล่านี้โดยอาศัยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ (Molecular genetics method) ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA และการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า *Lactobacillus* เหล่านี้จัดอยู่ใน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *L. plantarum, L. farraginis* และ *L. rhamnosus* โดยพบ *L. plantarum* ได้มากที่สุดในจำนวน 20 ไอโซเลตที่นำมาศึกษา และมีอีก 2 ไอโซเลตของจีนัส *Lactobacillus* ที่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้เมื่อใช้เทคนิคดังกล่าว ซึ่งผลการระบุสปีชีส์ของเชื้อที่ได้ในครั้งนี้มีความแตกต่างจากที่รายงานไว้ในโครงการวิจัยปีที่ 1 (ศิริโฉม ทุ่งเก้า, 2558) ซึ่งทำการจัดจำแนกแบคทีเรียเหล่านี้โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic method) และพบว่า *L. pentosus* เป็นสปีชีส์ที่พบได้มากที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกจากโรงงานเหล่านี้ รองลงมาคือ *L. plantarum 1* นอกจากนั้นผลการจัดจำแนกด้วยสองวิธีให้ผลแตกต่างกันในบางไอโซเลต ตัวอย่างเช่น ไอโซเลตที่ 1 ที่พบในโรงงาน DC เดิมเมื่อจัดจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมี API50 CHL พบว่าเป็น *L. pentosus* แต่เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ได้ผลเป็น *L. farraginis* และไอโซเลตที่ 3 เดิมระบุได้ว่าเป็น *L. brevis* 1 แต่ในการศึกษาครั้งนี้ระบุได้เป็น *L. plantarum* เป็นต้น ความแตกต่างของสปีชีส์ที่เกิดจากการใช้เทคนิคการจัดจำแนกเชื้อที่แตกต่างกันมีรายงานไว้เช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น Marroki et al. (2011) รายงานการเปรียบเทียบการจัดจำแนก Lactobacillus 19 ไอโซเลต ที่แยกได้จากนมแพะโดยใช้ API 50 CHL และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่าบางไอโซเลตให้ผลที่แตกต่างกันระหว่างสองวิธี เช่น เมื่อใช้ API50 CHL พบว่าเป็น *L. plantarum* แต่เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์ยีนพบว่าเป็น *L. pentosus* ซึ่งผู้วิจัยได้อธิบายไว้ว่าวิธีที่อาศัยการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น API 50 CHL ควรใช้สำหรับจัดจำแนกเชื้อเบื้องต้นเท่านั้น และการที่ทั้งสองวิธีให้ผลที่แตกต่างกันอาจเกิดจากแบคทีเรียสูญเสียหรือได้รับพลาสมิดที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต จึงทำให้มีผลกระทบต่อผลที่อ่านได้จากชุดทดสอบ API 50CHL

การมีแบคทีเรียเจริญร่วมกับยีสต์ในถังหมักเอทานอลเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยากในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักเนื่องจากจะไม่มีการฆ่าเชื้อวัตถุดิบที่นำมาใช้เลี้ยงยีสต์ให้ปราศจากเชื้อปนเปื้อน ทั้งนี้เนื่องจากการดำเนินการดังกล่าวทำให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลสูงจนอาจไม่คุ้มทุน โดยในระหว่างการหมักจะต้องติดตามตรวจสอบกระบวนและควบคุมเพื่อไม่ให้ระดับปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจนส่งผลเสียต่อการผลิต วิธีการต่างๆ เพื่อควบคุมระดับการปนเปื้อนแบคทีเรีย ได้แก่ การล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อถังหมักและอุปกรณ์ต่างๆ อย่างสม่ำเสมอ การเติมสารเคมีชนิดต่างๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะลงในน้ำหมักเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อปนเปื้อน ซึ่ง Kamoran เป็นหนึ่งในยาปฏิชีวนะที่ได้รับความนิยมในการนำไปใช้ในโรงงานผลิตเอทานอลบางแห่ง รวมทั้งโรงงานที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ยาชนิดนี้มีกลไกเฉพาะเจาะจงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพต่อแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกัน โดยความเข้มข้นที่ใช้กันทั่วไปคือ 3-5 ppm อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดใดชนิดหนึ่งต่อเนื่องยาวนานอาจส่งผลให้แบคทีเรียพัฒนาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิดนั้นขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบหาค่า MIC ของยา Kamoran ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงานเอทานอลจำนวน 20 ไอโซเลตในงานวิจัยนี้ที่ได้ค่าสูงกว่า 100 ppm ในแบคทีเรียทุกไอโซเลต ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิดนี้จึงสามารถเจริญจนมีปริมาณสูงในน้ำหมักทำให้สามารถแยกเชื้อได้เมื่อใช้วิธี dilution plate count โดยพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างสูงถึง 7-8 log cfu/ml (Thungkao and Pattanacharoensuk, 2014)

มีรายงานว่ายา Kamoran มีค่า MIC ต่อ *Lactobacillus* และแบคทีเรียจีนัสอื่นที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอล อยู่ในช่วง < 0.75 – 6.25 μg/ml (ppm) (Union nationale de sgroupemrnts de distillateurs d’ alcohol *(n. d.)* ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ที่รายงานในโครงการวิจัยนี้มาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่นำมาทดสอบเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดนี้ ในขณะที่ de Oliva-Neto et al. (2014) รายงานว่า *L. fermentum* ที่นำมาทดสอบมีแนวโน้มต้านทานต่อยา Kamoran เพิ่มขึ้นโดยมีค่า MIC เท่ากับ 3 - 4 ppm ซึ่งสูงกว่าค่าความเข้มข้นที่ใช้จริงในโรงงานเอทานอลซึ่งอยู่ที่ 1-3 ppm แสดงให้เห็นว่าความไวต่อยา Kamoran ของ *Lactobacillus* ที่พบในโรงงานเอทานอลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสปีชีส์ แหล่งที่มา รวมทั้งประวัติการใช้ยา

ในงานวิจัยนี้ยังได้ทดลองเติมยา Kamoran ที่ความเข้มข้น 5 ppm ลงในกากน้ำตาลที่มีแบคทีเรียผสมซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อทดสอบประวิทธิภาพของยาในสภาวะการหมักเอทานอล ซึ่งพบว่าการเติมยาทำให้จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกลดลงได้น้อยกว่า 1 log ภายในเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3) แสดงว่ายาชนิดนี้ยังมีประสิทธิภาพต่อแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะการหมักเอทานอลเนื่องจากใช้ในความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC ที่หาได้ในโครงการวิจัยนี้ก็สามารถยับยั้งเชื้อได้แม้ว่าจำนวนเชื้อจะลดลงได้ไม่มากนัก ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองเป็นแบคทีเรียผสมประกอบด้วยหลายสปีชีส์ซึ่งอาจมีสปีชีส์ที่ไวต่อยารวมอยู่ด้วย ในขณะที่ในงานวิจัยอื่นทดสอบประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะต่อการยับยั้ง

Lactobacillus ในรูปเชื้อเดี่ยว ตัวอย่างเช่น Stroppa et. al. (2000) รายงานว่ายา Kamoran ที่ความเข้มข้น 1.5 ppm สามารถลดจำนวน *L. plantarum, L. fermentum* และ *L. buchneri* ได้ประมาณ 0.2 log และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาเป็น 3 ppm และ 6 ppm จะลดจำนวนเชื้อทดสอบได้เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 1 log และ 1.3 log ตามลำดับ นอกจากนั้น Rich et al. (2011) พบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากไบโอฟิล์มของเชื้อผสมที่พบในโรงงานเอทานอลที่ใช้ข้าวโพดบดที่ผ่านการย่อยเป็นวัตถุดิบมีค่า MIC ต่อยา virginiamycin (เป็นยาปฏิชีวนะอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ยับยั้งแบคทีเรียในโรงงานเอทานอล) อยู่ในช่วง 0.5 ถึง 16 ppm ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของยาที่ใช้งานจริง

เนื่องจาก *Lactobacillus* spp. ที่พบในโรงงานเอทานอลที่นำมาศึกษาในโครงการวิจัยนี้มีแนวโน้มการพัฒนาความต้านทานต่อยา Kamoran จึงได้ลองทดสอบหาค่า MIC ของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ได้แก่ยา Erythromycin ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม macrolide พบว่าแต่ละไอโซเลตมีค่า MIC แตกต่างกันและส่วนใหญ่มี MIC ต่ำกว่าค่า MIC ของยา Kamoran คืออยู่ในช่วง 0.1 ถึง >50 ppm และเมื่อพิจารณาความไวต่อยาชนิดนี้ของ *Lactobacillus* แต่ละสปีชีส์พบว่า *L. plantarum* มีความไวต่อ Erythromycin มากกว่า *L. farraginis* (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถต้านทานต่อยาชนิดนี้เช่นเดียวกัน (Thumu & Halami, 2012) ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจึงควรใช้ในกรณีจำเป็นเพื่อป้องกันการเกิดผลเสียต่อการผลิตเอทานอลเท่านั้น รวมทั้งโรงงานควรศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมและแนวทางการใช้เพื่อป้องกันการเกิดการดื้อต่อยาของแบคทีเรีย อันจะเกิดผลเสียทั้งต่อประสิทธิภาพการผลิตและต่อสิ่งแวดล้อม และในการทดลองเติม Erythromycin ที่ 5 ppm ในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสม พบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในน้ำหมัก (ตารางที่ 4) ซึ่งอาจเกิดจากในน้ำหมักมีแบคทีเรียที่ต้านทานต่อยาชนิดนี้หรือเกิดจากสาเหตุอื่นซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป สำหรับการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิดอื่นที่นิยมใช้ในโรงงานเอทานอลนั้นก็มีการรายงานไว้เช่นเดียวกัน โดย Bischoff et al. (2007) หาค่า MIC ต่อยา Penicillin และ Virginiamycin ของ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้ข้าวโพดบดเป็นวัตถุดิบ พบว่า Penicillin ให้ค่า MIC ระหว่าง 0.25-4 ppm ในขณะที่ค่า MIC ต่อ Virginiamycin มีค่าอยู่ระหว่าง 2 ถึง >8 ppm โดย *Lactobacillus* ที่แยกได้จากโรงงานที่บดข้าวโพดแบบ wet mill มีความไวต่อยาทั้งสองชนิดมากกว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากโรงงาน dry grind ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าเกิดจากประวัติการใช้ยาปฏิชีวนะของโรงงานทั้งสอง โดยโรงงาน wet mill ไม่ได้ใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรีย ในขณะที่โรงงาน dry grind มีการใช้ยา Virginiamycin ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เชื้อที่พบในโรงงานนี้มีความต้านทานต่อยามากกว่าเชื้ออีกโรงงานหนึ่ง

สำหรับการหาค่า MIC ต่อ hydrogen peroxide ของ *Lactobacillus* จำนวน 20 ไอโซเลตนั้นพบว่าแต่ละไอโซเลตมีความไวต่อสารชนิดนี้แตกต่างกัน โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง <0.1 ถึง >400

ppm (ตารางที่ 2) ซึ่ง hydrogen peroxide เป็นสารเคมีที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งในการนำมาใช้ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในถังหมักเอทานอลเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีระบบเอนไซม์ catalase หรือมีแบบไม่สมบูรณ์ (Liu et al., 2014) จึงไม่สามารถทำลายความพิษของสารนี้ได้เซลล์จึงถูกทำลายหรือถูกยับยั้งการเจริญ ในขณะที่ยีสต์ที่ใช้หมักเอทานอลมีเอนไซม์ catalase จึงสามารถสลาย hydrogen peroxide ให้เป็นน้ำและออกซิเจน ดังนั้น hydrogen peroxide จึงไม่มีผลยับยั้งยีสต์หากใช้ในความเข้มข้นที่เหมาะสม รวมทั้งสารนี้ยังสลายตัวตามธรรมชาติได้สารที่ไม่มีพิษ จึงไม่มีการตกค้างในน้ำหมักและไม่เกิดปัญหาในขั้นตอนการกลั่นเอทานอลหรือปนเปื้อนในน้ำทิ้ง และจากการทดสอบประสิทธิภาพของ hydrogen peroxide เข้มข้น 100 ppm ในสภาวะการหมักจำลองที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสม พบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ภายในช่วง 6 ชั่วโมงแรกได้เท่ากับ 0.48 log cfu/ml และเชื้อไม่เพิ่มจำนวนขึ้นตลอดระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่ทำให้จำนวนยีสต์ลดลง (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตาม จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่ลดลงมีจำนวนไม่มากนักเนื่องจากความเข้มข้นของ hydrogen peroxide อาจต่ำเกินไป หรือ hydrogen peroxide บางส่วนสลายตัวไปตามระยะเวลาการทดสอบ แต่หากเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้น หรือมีการเติมสารลงไปเพิ่มในถังหมักเป็นระยะน่าจะทำให้สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่านี้

มีรายงานว่าการเติม hydrogen peroxide ในรูป urea hydrogen peroxide มีผลยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ในการผลิตเอทานอลจากข้าวสาลีที่ผ่านการย่อย (wheat mash) ได้ที่ความเข้มข้นสาร 32 mM ทำให้แบคทีเรียทดสอบลดลงได้ประมาณ 5 log cfu/ml ภายใน 2 ชั่วโมง (Narendranath et al., 2000) และมีผู้ศึกษาผลของ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 5 – 10 mM ต่อ *Lactobacillus* 2 สปีชีส์ พบว่าแต่ละสปีชีส์มีความไวต่อสารชนิดนี้แตกต่างกันโดยที่ความเข้มข้น 10 mM สามารถลดจำนวนเชื้อได้สูงสุดประมาณ 3.5 log cfu/ml (Chang et al., 1997) นอกจากนั้น อัจฉรา มีเจริญ (2555) ได้รายงานผลการเติม hydrogen peroxide ที่ 16 ppm ในกากน้ำตาลเข้มข้น 20°Brix ทำให้ *L. fermentum* และ *L. plantarum* ที่แยกได้จากโรงงานเอทานอลลดลงได้มากกว่า 3 log ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าความไวที่แตกต่างกันต่อของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อ hydrogen peroxide เกี่ยวข้องกับสปีชีส์ของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามสารเคมีชนิดนี้น่าจะเป็นทางเลือกในการนำไปใช้แทนยาปฏิชีวนะชนิดเดิมเนื่องจากมีประสิทธิภาพ ไม่มีสารตกค้างนอกจากนั้นยังมีราคาไม่แพงรวมทั้งยังไม่มีรายงานการต้านทานต่อสารนี้ของแบคทีเรียกรดแลคติก

การมีแบคทีเรียกรดแลคติกผสมที่ระดับเริ่มต้นประมาณ 7 log cfu/ml ในกากน้ำตาลในสภาวะจำลองเพื่อการหมักเอทานอลส่งผลเสียต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยได้เอทานอลลดลงจากความเข้มข้น 9.7% v/v ในชุดทดสอบที่ไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อนเหลือ 6.7% v/v ในชุดทดสอบที่มีแบคทีเรียเมื่อทำการบ่มนาน 96 ชั่วโมง หรือคิดเป็นความเข้มข้นเอทานอลที่ลดลง 3% v/v หรือลดลง 30.9% จากชุดปราศจากเชื้อปนเปื้อน (ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามการเติม Kamoran เข้มข้น 5 ppm ในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองไม่ทำให้ได้เอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุด

ทดลองที่ไม่เติมยา โดยในระยะแรกของการหมัก (24 ชั่วโมง) ได้เอทานอลความเข้มข้นใกล้เคียงกัน จากนั้นความเข้มข้นเอทานอลในชุดทดสอบที่เติมยา Kamoran จะต่ำกว่าในชุดที่ไม่เติมยาจนถึงระยะเวลาการหมักที่ 96 ชั่วโมง แม้ว่าการเติมยาจะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในน้ำหมัก โดยทำให้เชื้อลดลง 1.7 log cfu/ml ภายใน 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 8) แต่เมื่อพิจารณาปริมาณยีสต์ในน้ำหมักพบว่าในชุดที่เติมยา Kamoran ที่เวลา 96 ชั่วโมงยีสต์มีปริมาณไม่แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ในชุดทดลองที่ไม่เติมยา Kamoran ยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้น 1.14 log cfu/ml ภายใน 96 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในชุดการทดลองที่ไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อนที่ยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้น (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าการเติม Kamoran ที่ 5 ppm อาจส่งผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ทำให้ได้เอทานอลลดลง

แบคทีเรียกรดแลคติก 12 จาก 20 ไอโซเลตที่นำมาศึกษาสามารถก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบนผิวเหล็กกล้าปลอดสนิมที่แช่อยู่ในกากน้ำตาลได้ โดยไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นมีปริมาณแตกต่างกันตั้งแต่ 1.7±0.11 ถึง 3.85±0.05 log cfu/cm^2 (ตารางที่ 10) Skinner-Nemec et al. (2007) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียผสมที่นำมาจากถังหมักของโรงงานเอทานอลที่ใช้ข้าวโพดที่ผ่านการย่อยเป็นวัตถุดิบสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมได้และแบคทีเรียในไบโอฟิล์มที่พบประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก สปีชีส์ที่พบได้มาก ได้แก่ *L. fermentum* และ *L. vaginalis* สอดคล้องกับในโครงการวิจัยนี้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบปนเปื้อนในกระบวนการผลิตของโรงงานเอทานอลสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนวัสดุชนิดนี้ได้ เมื่อพิจารณาแบคทีเรียกรดแลคติกในสปีชีส์เดียวกันพบว่ามีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น *L. plantarum* จำนวน 11 ไอโซเลต สร้างไบโอฟิล์มได้ 8 ไอโซเลต และไม่สร้าง 3 ไอโซเลต และในสปีชีส์ที่สร้างได้ก็มีความแตกต่างของปริมาณไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบในสภาวะเดียวกัน ซึ่งความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มที่แตกต่างกันของสปีชีส์ดังกล่าวพบใน *L. farraginis* ด้วย มีรายงานว่าการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียสปีชีส์หนึ่งภายใต้สภาวะแวดล้อมเดียวกันแตกต่างกันตามสายพันธุ์ (Kostaki et al., 2012) ซึ่งอาจเกิดจากความบกพร่องของยีนที่เกี่ยวข้องกับหารสังเคราะห์ exopolysaccharide หรือยีนที่ควบคุมการสื่อสารของเซลล์ที่เรียกว่า quorum sensing (Salas-Jara et al., 2016)

ในกระบวนการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมพบแบคทีเรียผสมที่ประกอบด้วยหลายสปีชีส์อยู่ร่วมกัน ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อาจมีปฏิสัมพันธ์ต่อกันและส่งผลต่อความสามารถในการสร้างหรือลักษณะของไบโอฟิล์ม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการสร้างไบโอฟิล์มบนผิวเหล็กกล้าปลอดสนิมภายใต้สภาวะการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกผสมอยู่ร่วมกับยีสต์ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สร้างไบโอฟิล์มร่วมกับยีสต์ได้ ซึ่งตรวจผลจากทั้งเมื่อใช้วิธีนับจำนวนเซลล์ในไบโอฟิล์มและการตรวจดูไบโอฟิล์มบนพื้นผิวด้วยกล้อง SEM จึงเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในโรงงานเอทานอลที่นำมาศึกษาสามารถสร้างไบโอฟิล์มบนผิววัสดุชนิดนี้ได้ และมีความเป็นไปได้ว่าไบโอฟิล์มเป็นหนึ่งในแหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเอทานอลในโรงงานทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต ชี้ให้เห็นถึงความบกพร่องของวิธีการ

ควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อหรือยาปฏิชีวนะที่เลือกเติมลงไปในระหว่างการหมักว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้หรือไม่ เพื่อจะได้พิจารณาเลือกใช้วิธีการควบคุมระดับการปนเปื้อนแบคทีเรียในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นพลังงานทดแทนต่อไป

บทที่ 4
สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยทั้งหมดสรุปได้ดังนี้

1. *Lactobacillus plantarum* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์ที่พบได้บ่อยที่สุดในโรงงานเอทานอลที่ทำการศึกษา โดยพบ 11 ใน 20 ไอโซเลต (55%) รองลงมาคือ *Lactobacillus farraginis*

2. ค่า MIC ของยา Kamoran ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 20 ไอโซเลตมีค่า >100 ppm ค่า MIC ของยา Erythromycin อยู่ระหว่าง <0.1 ถึง >50 ppm และค่า MIC ของ hydrogen peroxide อยู่ระหว่าง <0.1 ถึง >400 ppm

3. การเติมยา Kamoran ในกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 5 ppm ในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองทำให้จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกผสมลดลง 0.79 log cfu/ml ภายในเวลา 96 ชั่วโง แต่ไม่ทำให้ได้เอทานอลเพิ่มขึ้น แต่การเติมยา Erythromycin ที่ 5 ppm ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในน้ำหมัก ในขณะที่การเติม hydrogen peroxide ลดจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 0.48 log cfu/ml ภายในเวลา 6 ชั่วโมง

4. แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 11 ใน 20 ไอโซเลต สร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมที่อยู่ในกากน้ำตาลได้ โดยมีปริมาณระหว่าง 1.64±0.06 ถึง 3.85±0.05 log cfu/ml เมื่อบ่มนาน 96 ชั่วโมง

5. *Lactobacillus plantarum* จำนวน 7 ใน 11 ไอโซเลต สร้างไบโอฟิล์มบนแผ่นเหล็กปลอดสนิมที่อยู่ในกากน้ำตาลได้ ส่วนอีก 4 ไอโซเลตไม่สร้างไบโอฟิล์ม

6. ในสภาวะการหมักเอทานอลจำลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ พบไบโอฟิล์มของเชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์บนแผ่นเหล็กกล้าปลอดสนิมโดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพื่อบ่มนานขึ้น

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยที่ควรทำเพิ่มเติม ได้แก่ การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อผสมในสภาวะการหมักเอทานอลจำลอง เช่น ชนิดของพื้นผิว ระยะเวลา อุณหภูมิ เป็นต้น รวมทั้งศึกษาวิธีการป้องกันและกำจัดไบโอฟิล์ม เช่น การทำความสะอาด การเติมสารยับยั้งในน้ำหมัก เพื่อลดความโอกาสในการปนเปื้อนแบคทีเรียกรดแลคติกในระบบการหมักที่มีสาเหตุมาจากไบโอฟิล์มต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2557). *โรงงานเอทานอลที่ดำเนินการผลิตแล้วและโรงงานเอทานอลที่อยู่ระหว่างการดำเนินการ*. วันที่ค้นข้อมูล 11 มิถุนายน 2559, เข้าถึงได้จาก http://www.dede.go.th/dede/images/stories /bioethanol/ethanol_listes.pdf

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

ศิริโฉม ทุ่งเก้า. (2558). *อุบัติการณ์และแนวทางเพื่อนาไปสู่การควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงของประเทศไทย.* รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยบูรพา. 70 หน้า.

อัชฉรา มีเจริญ. (2555). *ผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง.* โครงงานทางจุลชีววิทยา. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 42 หน้า.

Arshad, M., Zia, M. A., Asghar M., & Bhatti H. (2011). Improving bio-ethanol yield: Using virginiamycin and sodium fluoride at a Pakistani distillery. *African Journal of Biotechnology*, 10(53), 11071-11074.

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

Bischoff, K.M., Skinner-Nemec, K.A. and leathers, T.D. (2007). Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* spp. isolated from commercial ethanol plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34, 739-744.

Chang, I.S., Kim, B.H. and Shin, P.K. (1997). Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology.* 63, 1-6.

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.

de Oliva-Neto, P., Lima, F. A., Silva, K. C., Silva, D. F., Carvalho, A. F. A., & Santos, C. (2014). Chemical inhibition of the contaminant *Lactobacillus* fermentation

from distilleries producing fuel bioethanol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 1-7.

Hynes, S. H., Kjarsgaard, D. M., Thomas, K. C., & Ingledew, W. M. (1997). Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18, 284-291.

Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G. J. and Giaouris, E. (2012). Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria onocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 78, 2586-2595.

Liu, W., Pang, H., Zhang, H. and Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria. Zhang, H. and Cai, Y. (eds.). Springer Science & Business Media, Dordrecht, p.42.

Marroki, A., Zuniga, M., Kihal, M. and Perez-Martinez, G. (2011). Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42, 158-171.

Meneghin, S.P., Reis, F.C., de Almeida, P.G., and Ceccato-Antonini, S.R. (2008). Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology.* 39, 337-343.

Narendranath, N.V., Hynes, S.H., Thomas, K.C. and Ingledew, W.M. (1997). Effects of lactobacilli n yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied and Environmental Microbiology.* 63, 4158-4163.

Narendranath N. V., K. C. Thomas. & W. M. Ingledew (2000). Urea hydrogen peroxide reduces the number of Lactobacilli Nourishes yeast, and leaves no residues In the ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* . 66, 4187-4192.

Rich, J. O., Leathers, T. D., Nannally, M. S., & Bischoff, K. M. (2011). Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. *Bioresource Technology*,102, 1124 – 1130.

Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M. and Garcia, A. (2016). Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. Retrieved 6 July 2016, from www.mdpi.com/2016-2607/4/3/35/pdf

Skinner-Nemec, K.A., Nichols, N.N. and Leathers, T.D. (2007). Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Biotechnology Letters*. 29, 379-383.

Stroppa, C. T., Andrietta, M. G. S., Andrietta, S. R., Steckelberg, C. & Serra, G. E. (2000). Use of penicillin and onensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. *International Sugar Journal*. 102, 78-82.

Suanjit, S. 2014. *Molecular genetic identification of microorganisms and phylogenetic tree analysis. Laboratory Manual*. Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha university.

Thomas, K.C., Hynes, S.H. and and Ingledew, W.M. (2001). Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 819-828.

Thumu, S. C. & Halami, P. M. (2012). Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie Van Leuwenhoek*, 102, 541-551.

Thungkao, S. and Pattanacharoensuk, P. (2014). Contamination and antibiotic susceptibility tests of lactic acid bacteria in an ethanol production plant. *Burapha University International Conference 2014*, Burapha University, Thailand, July 3-4, 2014. (Abstract).

Union Nationales Groupements de Distillateurs d'Alcool, France. Controlling bacterial contamination in ethanol fermentation processes. Retrieved 2 January 2017, from http://www.ungda.com/upload/File/kamoran/Kam%20full%20Tech %20data.pdf