สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การผลิตแผ่นฟิล์มปิดแผลจากเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ร่วมกับไคโตซานและคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มที่ได้

Wound Dressing from Bacterial Cellulose : *Acetobacter xylinum* with Chitosan Production and Properties

รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล
รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภารัตน์ รักชลธี

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2551
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
TP
248. 65
C45
T49 2551

สพหมู่.....
เลขทะเบียน 115497
วัน,เดือน,ปี 15 ธ.ค. 2554

b. 12312022
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้ทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2551 ซึ่งสำเร็จด้วยความร่วมมือของนักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนมาใช้ในการทดลอง

รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล

หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การผลิตแผ่นฟิล์มปิดแผลจากเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ร่วมกับไคโตซาน และคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มที่ได้

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Wound Dressing from Bacterial Cellulose : *Acetobacter xylinum* with Chitosan Production and Properties

แหล่งเงิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ประจำปีงบประมาณ 2551 จำนวนที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 – กันยายน 2551

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล

ผู้ร่วมวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภารัตน์ รักชลธี

หน่วยงานต้นสังกัด คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Email : kodaungj@kmitl.ac.th

คำสำคัญ (Keywords) : Bacterial cellulose, Acetobacter xylinum, Wound dressing, Chitosan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย ร่วมกับสารละลายไคโตซาน โดยวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และนำสารละลายไคโตซานมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน ร้อยละ 0.4 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ความหนาของแผ่นฟิล์ม ทั้งแผ่นเปียกและแผ่นแห้งสูงสุด คือ 0.212 มิลลิเมตร และ 0.050 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ได้พบว่า มีค่าแข็งแรงดึงสูงสุดของแผ่นเปียกเท่ากับ 3.92±1.74 MPa ค่ามอดุลัสของยังของแผ่นแห้ง มีค่าเท่ากับ 1,142.85±82.07 MPa นอกจากนี้เมื่อนำแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้ง 7 ชนิด มาทดสอบการซึมผ่านบนแผ่นฟิล์มในลักษณะแห้งพบว่าไม่สามารถซึมผ่านแผ่นฟิล์มได้

ABSTRACT

This research aimed to study the film preparation from bacterial cellulose Acetobacter xylinum TISTR 976 mixed with Chitosan solution in media. It was found that Chitosan solution at 0.4% concentration gave the optimum properties. Its wet film and dry filmhad thickness about 0.212 mm and 0.050 mm, respectively. Tensile strength values of the wet film and the dry film were 3.92±1.74 MPa and 20.93±3.23 MPa, respectively. Young's modulus values of the wet one and the dry one were 26.53±6.91MPa and 1,142.85±82.07 MPa, respectively. In addition, the dry film were tested with 7 bacterial types and it did not allow any bacterial passing through itself.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูป	7
บทที่ 1 บทนำ	8
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	8
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	10
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	10
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	29
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานและการทดลอง	37
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงาน	44
บรรณานุกรม	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ผลความหนาของแผ่นฟิล์มเมื่อใช้สารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 37

ตารางที่ 4.2 ความหนาของแผ่นฟิล์มที่ได้จากการผสมสารละลาย CMC กับสารละลายไคโตซานในปริมาณต่าง ๆ กัน 38

ตารางที่ 4.3 ค่าความต้านทานแรงดึง (Tensile Strength) ของแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 39

ตารางที่ 4.4 ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด (Percent Elongation at Maximum Load) ของแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 40

ตารางที่ 4.5 ค่ามอดุลัสของยัง (Young's Modulus) ของแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 41

ตารางที่ 4.6 ผลความสามารถในการซึมผ่านของแบคทีเรียผ่านแผ่นฟิล์ม 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.1	โครงสร้างของไคตินเปรียบเทียบกับเซลลูโลส	11
รูปที่ 1.2	การเรียงตัวของสายพอลิเมอร์ไคติน	12
รูปที่ 1.3	แสดงการย่อยสลายไคติน ณ ตำแหน่งหมู่อะซิทิล โดยสารละลายด่างเข้มข้นหรือเอนไซม์(ก)และ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาการย่อยสลาย(ข)	13
รูปที่ 1.4	แบบจำลองสายโซ่ไคโตซานแสดงพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intramolecular hydrogen bonding)และระหว่างโมเลกุล (intermolecular hydrogen bonding)	14
รูปที่ 1.5	การผลิตไคตินและไคโตซานจากกระดองปู	15
รูปที่ 3.1	การจัดอุปกรณ์ในการสังเคราะห์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส	32
รูปที่ 4.1	แสดงการเปรียบเทียบค่าความแข็งแรงดึงของแผ่นฟิล์มในลักษณะแผ่นเปียกและลักษณะแผ่นแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว	39
รูปที่ 4.2	การเปรียบเทียบค่าความยืด ณ จุดสูงสุดของแผ่นฟิล์มไคโตซานในลักษณะแผ่นเปียกและลักษณะแผ่นแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว	40
รูปที่ 4.3	การเปรียบเทียบค่ามอดุลัสของยังของแผ่นฟิล์มในลักษณะแผ่นเปียกและลักษณะแผ่นแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เซลลูโลส (β - 1, 4 – glucan) เป็นไบโอพอลิเมอร์ตามธรรมชาติที่มีมากที่สุดชนิดหนึ่ง องค์ประกอบหลักของเซลลูโลส ประกอบด้วย cotton (ซึ่งมีมากกว่า 49%) และไม้ (ซึ่งมีมากกว่า 50%) โครงสร้างของเซลลูโลสจะรวมตัวหรือจับกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น (เพคติน, ลิกนิน และอะราบิแนน เป็นต้น) ซึ่งพบในผนังเซลล์ของพืช สาหร่าย รวมทั้งสัตว์ชั้นต่ำ เช่น Tunicata และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Rhizobium, Agrobacterium, Alcaligernes* และมีแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น เช่น *Acetobacter sylinun* ที่จะปล่อยเซลลูโลสออกมาและสร้างเส้นใยได้

เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Microbial cellulose, MC) สังเคราะห์ขึ้นมาได้จาก *Acetobacter xylinum* ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเซลลูโลสและนิยมนำมาใช้กันมากที่สุด (Jonas and Farah, 1998., Yang et al, 1998) เชื้อนี้มีความสามารถในการเจริยบนภาชนะปากกว้างได้ ดีอาหารที่เชื้อนี้สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำอ้อย น้ำส้มสายชู และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Benziman and Rachaminou, 1962., Weinhouse and Buviman, 1974., Yoshinaga *et al*, 1997) แผ่นเซลลูโลสที่เชื้อนี้สร้างขึ้นจะลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีคุณสมบัติในการต้านทานแรงดึงสูง ยืดหยุ่นได้ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Schmit *et al*, 1991) และสามารถทนต่ออุณหภูมิ 100°C ได้นานอย่างน้อย 3 ชม. (Chang and Shyn, 1999)

ปัจจุบันมีการนำเซลลูโลสจากจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เช่น นำมาใช้ประโยชน์ในการตบแต่งบาดแผลแบบใหม่ และนำมาใช้ในการแทนที่ผิวหนังซึ่งต้องคำนึงถึงวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์ การปฏิบัติการทางเทคนิคและความก้าวหน้าในทางการค้า สำหรับการนำเซลลูโลสจากจุลินทรีย์มาใช้กับผลิตภัณฑ์ในการดูแลรักษาบาดแผลจะกลายเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับวงการผลิตพอลิเมอร์ในอนาคต

การรักษาบาดแผลทางผิวหนังเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนซึ่งจำเป็นต้องใช้เนื้อเยื่อเป็นจำนวนมากที่แตกต่างกันเข้ามาเกี่ยวข้อง ทิศทางสำหรับงานวิจัยด้านการรักษาบาดแผลในปัจจุบันมี 3 ประการ ได้แก่

1. การปรับปรุงพัฒนาบาดแผลที่อาจจะรักษาให้หายเร็วขึ้นและช่วยลดการเกิดแผลเป็น
2. การพัฒนาในด้านการใช้ผิวหนังส่วนอื่นทดแทน
3. การสร้างกระบวนการในการรักษาแบบใหม่โดยใช้การสร้างใหม่มากกว่าการซ่อมแซม (การก่อตัวของแผลเป็น)

ไคโตซาน [(Poly (1, 4 - β - D – glucopyranosamine)] เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัดอะซิทิลออกจากไคติน และนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย (Molinaro, Leroux,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Damas & Adam 2002 ; Park et al, 2001 ; Shu & Mathew, 2000) ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย $\beta(1 \rightarrow 4)$ – D – glucopyranose เช่นเดียวกับเซลลูโลส โดยเฉพาะ 2 – hydroxyl ถูกแทนที่ด้วย acetamide group ไคโตซานนิยมนำมาใช้ในการรักษาบาดแผลในมนุษย์ (Cho, Cho, Chung & Ko, 1999 ; Ueno et al, 1999) มีการศึกษามากมายพบว่าไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้มากมายหลายชนิด (Hirano & Nagano, 1989; Muzzarelli et al, 1990) นอกจากนี้มีการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้ต่างๆ รวมทั้งทำเป็นวัสดุปิดแผล gauzes และไหมเย็บแผล (medical sutures) (Kaessmann & Hark, 1997 ; Kim et al, 1999; Sager, Hamlyn & Wales, 1990)

การตบแต่งบาดแผลและลักษณะทางชีววิทยาที่แตกต่างกันนั้นถูกพัฒนาขึ้นเพื่อประโยชน์ทั้งในทางศัลยกรรมและที่ไม่ใช่ทางศัลยกรรม ลักษณะของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการตบแต่งและรักษาบาดแผลแบบสมัยใหม่ ได้แก่

- ไม่เป็นพิษ ไม่ทำให้เกิดไข้เนื่องจากความร้อน เข้ากันได้ดีกับสิ่งมีชีวิต
- สามารถจัดการกับอุปสรรคในการติดเชื้อได้
- สามารถควบคุมความสูญเสียของของเหลวได้
- สามารถลดความเจ็บปวดในระหว่างการรักษาได้ดี
- สามารถสร้างและคงไว้ซึ่งสภาพแวดล้อมส่วนใหญ่ที่เกี่ยวกับบาดแผลได้
- สามารถปิดบาดแผลได้อย่างง่ายดายและสนิท
- สามารถให้ยาผ่านเข้าไปในบาดแผลได้
- สามารถดูดซึมของเหลวที่ไหลซึมออกมาได้
- ทำให้กลไกการทำงานเกิดความแข็งแรงมีความยืดหยุ่นและมีความสอดคล้องกัน
- สามารถเลือกรูปร่างและขอบเขตของพื้นผิวได้
- ไม่ทำให้เจ็บปวดและรักษาบาดแผลได้ง่าย

จากสมบัติของเซลลูโลสจากแบคทีเรียและไคโตซานดังกล่าวข้างต้น งานวิจัยนี้จึงได้สนใจที่จะนำ พอลิเมอร์จากธรรมชาติ 2 ชนิดนี้มาใช้ร่วมกันในการผลิตวัสดุปิดแผลเพื่อตบแต่งแผลที่โดนไฟไหม้ น้ำร้อนลวก จากงานวิจัยนี้จะได้วัสดุปิดแผล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่เกิดขึ้นแทนที่จะนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียหรือวุ้นมะพร้าวมาประกอบอาหาร ซึ่งตลาดของวุ้นมะพร้าวค่อนข้างอิ่มตัว ดังนั้นการนำวุ้นมะพร้าวมาทำเป็นวัสดุปิดแผลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำวุ้นมะพร้าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เป็นการเพื่อมูลค่าของวุ้นมะพร้าวที่ผลิตได้ และลดการนำเข้าวัสดุปิดแผลจากต่างประเทศ รวมทั้งลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากน้ำมะพร้าวและเปลือกกุ้งที่นำมาผลิตไคโตซาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1 เพื่อผลิตแผ่นฟิล์มจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียร่วมกับไคโตซานโดยวิธีการต่างๆ เพื่อใช้เป็นวัสดุปิดแผล

2 เพื่อทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้จากวิธีการต่างๆ เช่น ทดสอบค่าความต้านทานแรงดึง (Tensile strength) ค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation at break) ค่ามอดูลัสของยังส์ (Young's Modulus)

3 เพื่อทดสอบความสามารถในการซึมผ่านได้ของไอน้ำและกาซออกซิเจนของแผ่นฟิล์มที่ได้ รวมทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

4 ศึกษาผลของแผ่นฟิล์มที่ได้ต่อเซลล์สัตว์ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) การยึดเกาะของเซลล์บนแผ่นฟิล์ม เป็นต้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ผลิตแผ่นฟิล์มเพื่อเป็นวัสดุปิดแผลโดยวิธีการต่างๆ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติเชิงกลต่างๆ ความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำและกาซออกซิเจนบนแผ่นฟิล์ม ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์และมนุษย์

1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

สามารถผลิตแผ่นฟิล์มปิดแผลจากการใช้เซลลูโลสจากแบคทีเรียร่วมกับไคโตซาน ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้นลดการนำเข้าจากต่างประเทศ

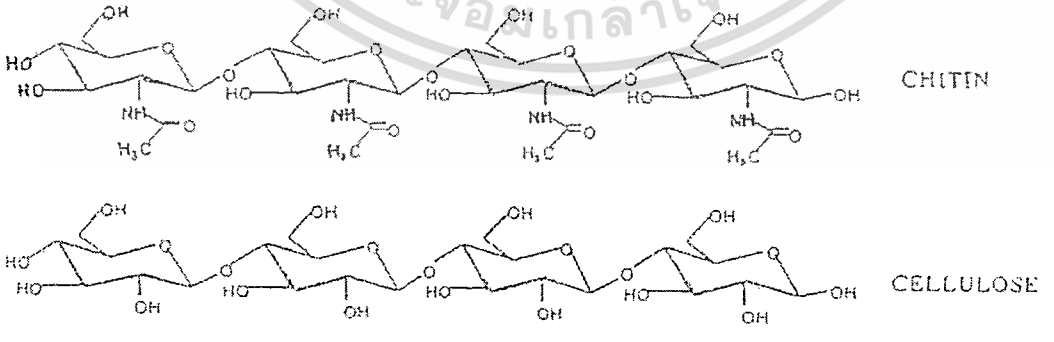
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ไคติน

ไคติน มีชื่อทางเคมีว่า poly –ß (1,4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose และมีสูตรทั่วไปคือ $(C_2H_{13}N O_5)_n$ โครงสร้างเป็นแบบพอลิแซคคาร์ไรด์มีสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตแสดงในรูปที่ 1 ไคตินพบในธรรมชาติโดยมีปริมาณมากเป็นที่สองรองจากเซลลูโลส ซึ่งสารประกอบไคตินพบมากในเปลือกและโครงสร้างแข็งที่ห่อหุ้มร่างกายของสัตว์จำพวก กุ้ง ปู แมลง และยังพบในส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเห็ดราและยีสต์ ซึ่งมีหน้าที่ปกป้องและให้ความแข็งแรง (รัฐ , 2544.)

ไคติน มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในพืชเพียงแต่หน่วยย่อยที่ประกอบขึ้น ซึ่งเป็นไคตินนั้นต่างออกไปจากหน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นเป็นเซลลูโลส หน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นมาเป็นเซลลูโลส คือ น้ำตาลกลูโลส (glucose) ส่วนหน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นเป็นไคติน คือ น้ำตาลเอ็นอะเซทิลดีกลูโคซามีน(N-acetyl-D-glucosamine) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์พอลิเมอร์ในกลุ่มของพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ประกอบด้วย อนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสเป็นแกนหลัก (backbone) มีธาตุไนโตรเจนและกลุ่มอะเซทิลเกาะอยู่ภายในโมเลกุล เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ(ß 1,4-glycosidic bond) แต่ละหน่วยโมเลกุลของกลูโคสที่มีหมู่อะมิโนกับหมู่อะเซทิลเกาะกันเป็นกลุ่มของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนหรือเรียกว่าพอลิเมอร์ของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน สัดส่วนของหน่วยย่อยเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนมากกว่าหน่วยย่อยกลูโคซามีน (Tokuyasu และคณะ, 2000., Kamst และคณะ, 1999., Kren และคณะ, 1998)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไคตินเปรียบเทียบกับเซลลูโลส
ที่มา : รัฐ (2544)

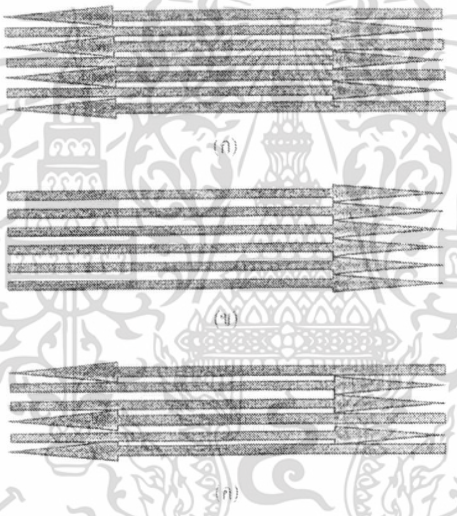
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารไคตินที่พบในธรรมชาติมีโครงสร้างต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยสายของไคตินมีการจัดเรียงตัวได้หลายแบบซึ่งมีความแข็งแรงต่างกันออกไป ลักษณะโครงสร้างของไคตินในธรรมชาติแบ่งได้ 3 แบบ คือ

1) แบบอัลฟา (alpha-chitin หรือ α- chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์จัดเรียงตัวกลับไปมาซ้อนกัน สายพอลิเมอร์เรียงตัวแน่น และแข็งแรง มีความสมบูรณ์ในด้านพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างสายโซ่อย่างเป็นระเบียบทำให้ไคติน-ไคโตซานมีโครงสร้างเสถียรสูงดังรูปที่ 2 (ก)

2) แบบเบตา (beta- chitin หรือß -chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์เรียงตัวในทิศทางเดียวกัน สายพอลิเมอร์เรียงตัวได้ไม่แน่นมากแสดงในรูปที่ 2 (ข)

3) แบบแกมมา (gamma- chitin หรือγ- chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ไปในทิศทางเดียวกันบ้าง กลับทิศทางกันบ้างแสดงในรูปที่ 2 (ค) (รัฐ, 2544., สุวบุญ และคณะ, 2544)

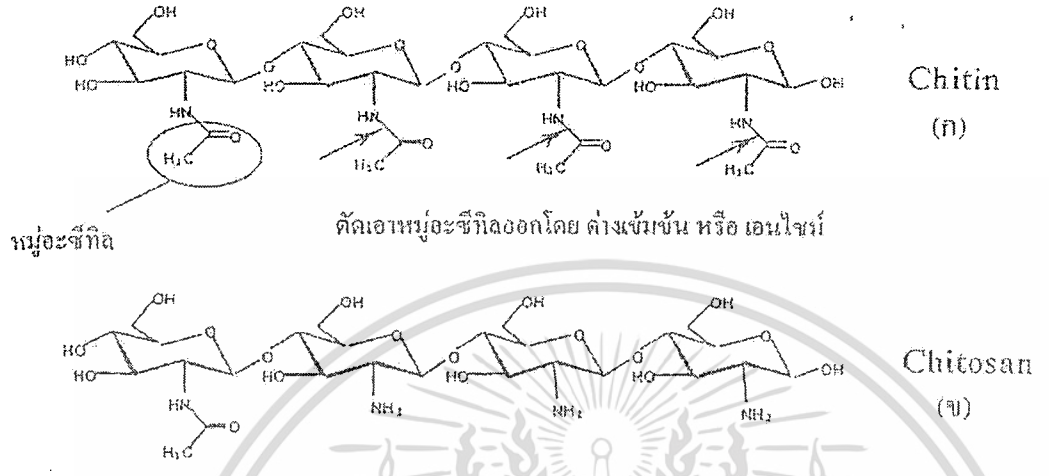


รูปที่ 1.2 การเรียงตัวของสายพอลิเมอร์ไคติน
(ก) แบบอัลฟาไคติน
(ข) แบบเบตาไคติน
(ค) แบบแกมมาไคติน
ที่มา : ดัดแปลงจาก รัฐ (2544)

ไคตินสามารถนำมาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยการกำจัดอะเซทิล (acetyl group) ออกจากน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนที่เป็นหน่วยย่อยของไคตินได้โดยการใช้ด่างเข้มข้น หรือ เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการตัดกลุ่มอะเซทิลออกจากน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน(แสดงดังรูปที่ 3) ซึ่งทำให้สมบัติหลายประการของไคตินเปลี่ยนแปลงไป เมื่อกำจัดหมู่อะเซทิลของไคตินออกไปมากกว่าครึ่งหนึ่ง หรือคิดเป็นร้อยละ 50 ขึ้นไป จะได้สารที่มีสมบัติละลายได้ดีในกรดอินทรีย์อ่อน เช่น กรดน้ำส้มสายชู (acetic acid) กรดแลกติก (lactic acid) ที่พบในนมเปรี้ยว และกรดซิตริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(cirtic acid) ที่พบในมะนาว หรือ พืชตระกูลส้ม สารใหม่ หรือ อนุพันธุ์ของไคตินที่ได้จากการกำจัดหมู่อะเซทิลออกจากไคติน เรียกว่า "ไคโตซาน" (รัฐ, 2544)



รูปที่ 1.3 แสดงการย่อยสลายไคติน ณ ตำแหน่งหมู่อะซิทิล โดยสารละลายด่างเข้มข้น หรือเอนไซม์(ก) และ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาการย่อยสลาย(ข)

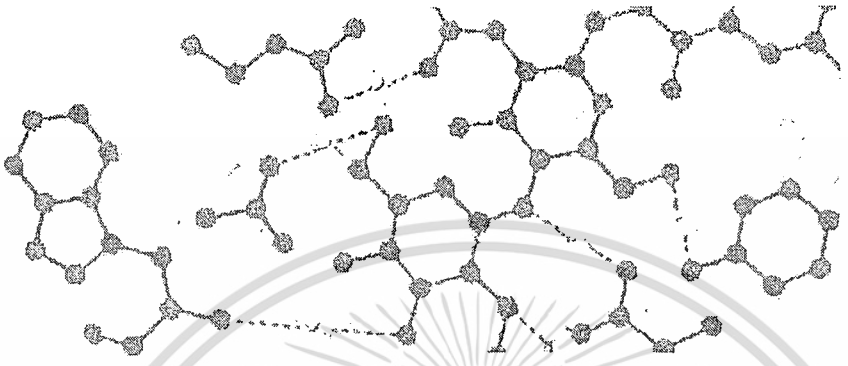
ที่มา : รัฐ (2544)

2.2 ไคโตซาน

ไคโตซานมีชื่อทางเคมีว่า poly-ß (1,4)-2-amino 2-deoxy-D-glucose หรือ พอลิเมอร์ที่มีหน่วยย่อยชนิดน้ำตาลกลูโคซามีน (polymer monomer glucosamine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการย่อยสลายหมู่อะเซทิลออกจากพอลิเมอร์ของไคติน เรียกกระบวนการดังกล่าวว่ากระบวนการดีอะซิทิเลชั่น (deacetylation) บางครั้งเรียกไคโตซานว่า ดีอะซิทิเลชั่นไคติน (deacetylation chitin) เนื่องจากหมู่อะเซทิล (acetyl group; $CO\text{-}CH_3$) ของไคตินถูกตัดออกเหลือเพียงหมู่อะมิโน (amino group) บนคาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส(pryanose) ไคโตซานมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำในตัวทำละลายที่เป็นกรดหรือด่าง รวมทั้งกรดอนินทรีย์บางชนิดเช่น กรดซัลฟูริก ไม่ว่าจะมีความเข้มข้นเท่าใดที่อุณหภูมิห้อง และไม่สามารถละลายในน้ำที่มีความเป็นกรดด่างสูงกว่า 6.5 เนื่องจากโครงสร้างที่มีพันธะไฮโดรเจนซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 4 แต่ถ้านำไคโตซานมาบดแห้งกับกรดอนินทรีย์จะได้ไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ (water solude chitosan) ถ้าหมู่อะเซทิลที่ถูกย่อยสลายหรือที่กำจัดไปประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานบางชนิดเป็นไคโตซานที่ไม่มีหมู่อะเซทิล (full deacetylated chitosan) คุณสมบัติของไคโตซานที่ต่างจากพอลิเมอร์อื่นได้แก่ เป็นประจุบวก (cationic polyelectrolyte) เนื่องจากมีหมู่อะมิโนอิสระ (NH_2) บนคาร์บอนตำแหน่งที่สอง ทำให้ไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ กรดฟอร์มิกความเข้มข้นตั้งแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.2-100 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายที่ดีของไคโตซาน และนอกจากนี้ไคโตซานยังมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ(biopolymers)ที่สามารถย่อยสลายได้เองโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (biodegradable) เป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูง และมีโครงสร้างสายตรงของเอมีน (linear amine) ที่ทำปฏิกิริยา หรืออยู่ในรูปเกลือของกรดต่างๆ ได้ง่าย



รูปที่ 1.4 แบบจำลองสายโซ่ไคโตซานแสดงพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล(intramolecular hydrogen bonding)และระหว่างโมเลกุล (intermolecular hydrogen bonding)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Houston (2002)

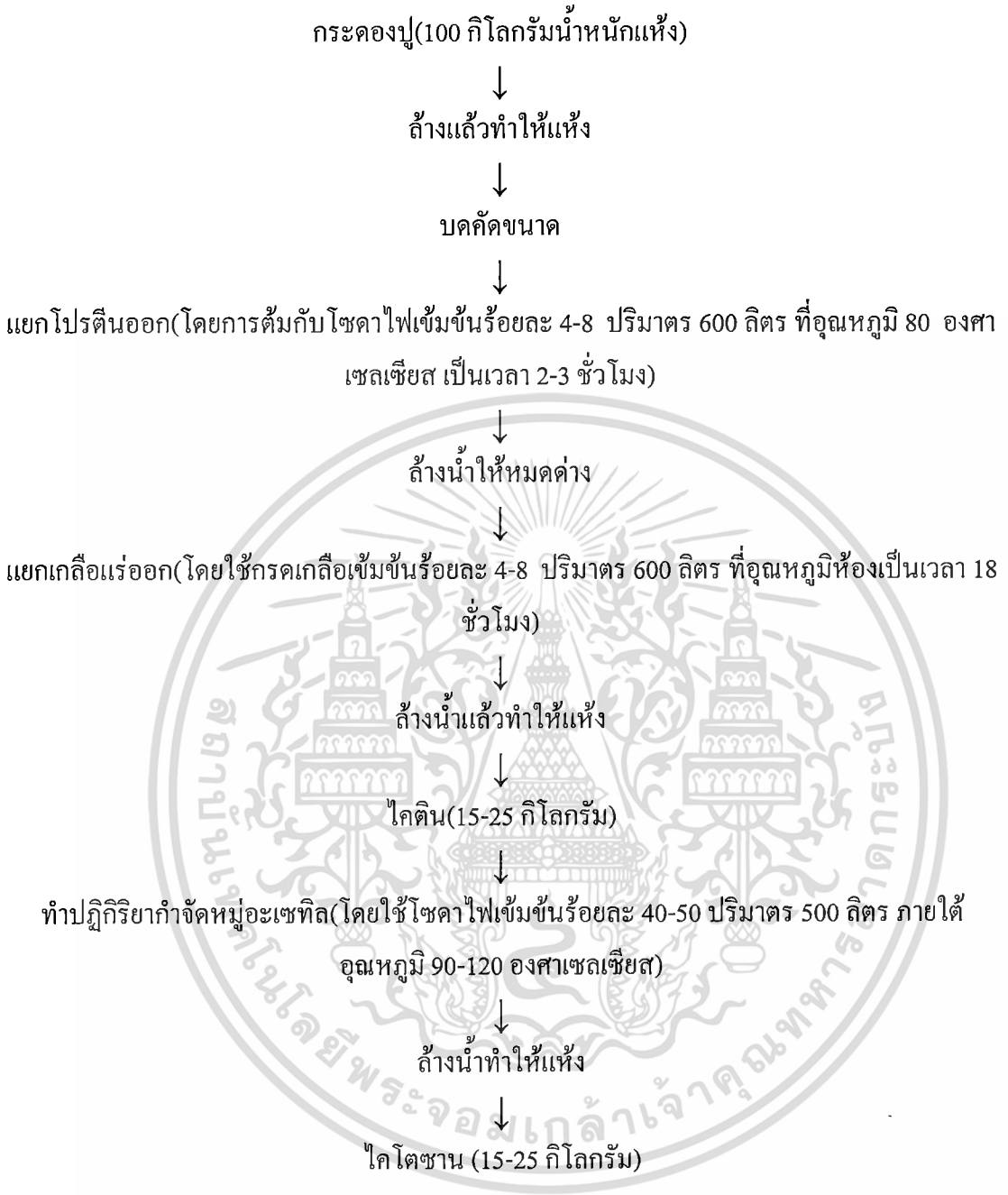
2.3 กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน

2.3.1 วิธีทางเคมี

กรรมวิธีการผลิตไคโตซาน โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีในสภาวะรุนแรงและอุณหภูมิสูง (thermochemistry) คือ การย่อยสลายเพื่อกำจัดกลุ่มอะเซทิลออกด้วยสารละลายด่างเข้มข้นที่อุณหภูมิสูงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ซึ่งปริมาณผลได้ไคโตซานขึ้นกับปริมาณการเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะเซทิลที่แตกต่างกันตามปริมาณกลุ่มอะเซทิลที่ถูกย่อยสลายคิดเป็นหน่วยร้อยละหรือเรียกว่า “เปอร์เซ็นต์ DD” (Sashiwa และคณะ 2001)

อุตสาหกรรมการผลิตไคตินและไคโตซานจากเปลือกของสัตว์น้ำ เช่น เปลือกปู เปลือกกุ้งที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ โดยนำเศษเปลือกมาบดผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodiumhydroxide) เจือจาง เพื่อละลายโปรตีน จากนั้นจึงปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายให้เป็นกลาง แล้วจึงนำตะกอนมาทำให้แห้ง ส่วนที่เหลือนำมาปรับด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก (hydrocholic) เจือจาง เพื่อละลายคาร์บอเนต (carbonate) ที่อยู่ในโครงสร้างเปลือกให้เป็นแคลเซียมคลอไรด์การเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะเซทิลในโครงสร้างของไคตินเริ่มต้นเมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40-50 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิ 90-120 องศาเซลเซียส ซึ่งจากกระบวนการนี้จะได้ไคโตซาน ตัวอย่างการผลิตไคโตซานจากกระดองปูในทางอุตสาหกรรมดังรูปที่ 2.5 (พิมพ์ทิพย์, 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.5 การผลิตไคตินและไคโตซานจากกระดองปู
ที่มา : ดัดแปลงจาก พิมพ์ทิพย์ (2542)

2.3.2 วิธีทางชีวภาพ

การผลิตไคติน และไคโตซานโดยวิธีทางชีวภาพด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส (chitindeacetylase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายกลุ่มอะเซทิลออกจากไค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตินทำให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายหมู่อะเซทิลเพิ่มสูงขึ้น โดยไม่ต้องใช้สภาวะที่รุนแรงและเป็นอันตรายดังเช่นวิธีทางเคมี วิธีทางชีวภาพช่วยลดปริมาณด่างที่ใช้ในการผลิตและของเสียที่ออกสู่สิ่งแวดล้อมได้ ในกระบวนการผลิตสามารถควบคุมการย่อยสลายกลุ่มอะเซทิลออกจากไคติน และนอกจากนี้การใช้เอนไซม์เป็นสารกระตุ้นทางชีวภาพ(biocatalyst) สามารถลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเอนไซม์ถูกทำลายได้ง่ายในกระบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติ หรืออาจนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ในการผลิตครั้งต่อไปทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้

ถึงแม้ว่าในธรรมชาติจะมีแหล่งของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตซานได้ เช่น เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) เอนไซม์ไคโตซาเนส (chitosanase) เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิลเลส และเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozymes) แต่มีเพียงบางแหล่งเท่านั้นที่ให้เอนไซม์คุณสมบัติดี และสามารถนำเอาเอนไซม์มาใช้ได้โดยสะดวก เอนไซม์จากจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียและรา พบว่ามีศักยภาพสูงเพียงพอต่อการที่จะนำมาประยุกต์ใช้ เนื่องจากเหตุผลบางประการ ได้แก่ จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่าย ผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากและเอนไซม์ที่ได้มีความเสถียรสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่หลากหลาย (รัฐ, 2544)

2.4 ประโยชน์ของไคโตซานในด้านต่างๆ

1. ด้านการเกษตร

ได้มาการนำไคโตซานมาเคลือบผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งประสิทธิภาพดีกว่ายาฆ่าเชื้อราบางชนิด และปลอดภัยมากกว่า ไคโตซานถูกทดลองใช้ในการเคลือบส้มผิวสีเข้มด้วยความหนาประมาณ 30-35 ไมครอน พบว่าสามารถเก็บรักษาส้มได้นาน 35-40 วัน โดยคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง เช่น สีของเปลือกนอกไม่เปลี่ยนแปลง และยังได้วิจัยกับผลไม้อื่น เช่น ลูกพีท ลูกแพร กีวี และสตรอเบอรี เพื่อยืดอายุและป้องกันการเน่าเสีย นอกจากนี้ยังใช้เคลือบผิวของผักจำพวกมะเขือ แตงกวา และพริกหยวก พบว่าสามารถลดอัตราการหายใจ ลดการสูญเสียน้ำจากการคายน้ำ และลดอัตราการผลิตก๊าซเอธิลีนที่ทำให้ผลไม้สุกเร็วและยังเป็นฟิล์มกั้นการไหลออกของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ผักผลไม้คงความกรอบ ผิวไม่เหี่ยวย่น สีผิวไม่เปลี่ยนแปลง

ไคโตซานสามารถเคลือบบนเครื่องเทศเพื่อรักษาและป้องกันการสูญเสียกลิ่นของเครื่องเทศ จากการสเตอริไรด์ด้วยไอน้ำ นอกจากนี้ยังใช้ในการเคลือบที่ผิวไข่ เพื่อการเก็บรักษาความสดของไข่ให้ยาวนานขึ้น โดยที่คุณภาพไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะของไข่แดง ความหนาของไข่ขาว และรสชาติไม่เปลี่ยนแปลง และยังมีผลให้เปลือกไข่มีความแข็งขึ้นป้องกันการแตก สะดวกแก่การขนส่ง

ในระหว่างการขนย้ายหรือในกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยว บางครั้งทำให้ผลผลิตเกิดรอยช้ำ รอยแผล ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดรอยช้ำสีน้ำตาลขึ้น เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase กับสารประกอบพวกฟีนอล เป็นผลให้เกิดสีเข้มของ *o*-quinones ซึ่งเป็น

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่อรสชาติและคุณค่าทางอาหารของผลไม้ในอดีตได้มีการใช้สารซัลไฟต์(sulphite) ในการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล แต่สารนี้อาจมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงได้มีการทดลองใช้แผ่นฟิล์มไคโตซานเคลือบลิ้นจี่ เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาล พบว่าทำให้ปริมาณของ anthocyanin flavonoids และ phenolics มีการเปลี่ยนแปลงช้าลง และยังมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase ลดลง

ไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยังจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคตินเนื่องจากประจุบวกตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของ กลูโคซามีน (หน่วยย่อยที่เล็กที่สุดของไคโตซาน)ซึ่งสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เมนเบรน (cellbrane) ของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีน และสารอื่นๆ ของเซลล์หรือการที่ไคโตซานเป็น chelating agent ซึ่งสามารถเลือกจับโลหะแม้ในปริมาณน้อยๆ ได้ ทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตสารพิษ (toxin) และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ไคโตซาน เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของต้นไม้ โดยให้ผลเช่นเดียวกับฮอร์โมนเร่งราก ใช้กระตุ้นการงอกของกิ่งชำ ไม้ดอกและไม้ประดับชนิดต่างๆ โดยนำส่วนของพืชที่ต้องการ มาแช่ในสารละลายเจือจางของไคโตซานประมาณ 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปปักชำ (Naritomi และคณะ. ,1998)

2. ด้านอาหาร

ได้มีการทดลองใช้ไคโตซานในกระบวนการผลิตน้ำแอปเปิ้ลและน้ำองุ่น พบประสิทธิภาพในการเป็นสารช่วยในการตกตะกอน (fining agent) และสามารถใช้ในการควบคุมความเป็นกรดของน้ำผลไม้ด้วย นอกจากนี้ไคโตซานยังทำให้ไวน์ขาว ซึ่งในตอนเริ่มต้นมีสีเหลืองฟางข้าวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทองสวยงาม และได้นำไคโตซานไปผสมในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ตกตะกอน

3. ด้านการแพทย์และการเภสัชกรรม

พบว่าไคโตซานเป็นตัวเร่งกระบวนการรักษาแผล ช่วยลดการเกิดรอยแผลเป็นเนื่องจากป้องกันแผลไม่ให้ติดเชื้อ สามารถดูดน้ำเหลืองจากแผลได้และยังใช้ผลิตไหมละลาย ผิวหนังเทียมที่ทำมาจาก chitosan-collagen คอนแทคเลนส์ หลอดเลือดเทียมและยังได้มีการนำไคโตซานมาใช้ควบคุมการปลดปล่อยยาเนื่องจากไคโตซานมีประจุบวกที่สามารถยึดติดกันพื้นผิวต่างๆ ซึ่งมีประจุลบได้ดี และยังประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

จากการรายงานของ ปิยะบุตร (2545) เกี่ยวกับสมบัติและลักษณะเด่นของไคโตซานในงานทางการแพทย์ คือ

- เป็นวัสดุที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
115497

- สร้างภูมิต้านทานได้ โดยเป็นตัวเหนี่ยวนำไลโซไซม์และ LPL activities ในเนื้อเยื่อและในเลือด ทั้งยังต่อต้านสารก่อมะเร็ง
- สามารถสมานแผล โดยใช้เป็นตัวรักษาแผล เช่น แผลไฟไหม้ ทำเป็นผิวหนังเทียม รักษากระดูก เอ็น และซ่อมแซมพวกเอ็นยึดอวัยวะต่างๆ
- ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ จึงนิยมทำไหมเย็บแผลที่ละลายได้ ทำเป็นสารปลดปล่อยยาอย่างช้าๆ และควบคุมการย่อยสลายของเอนไซม์
- สมบัติของการเข้ากันได้กับอวัยวะของร่างกาย จึงนำมาใช้รักษาแผล และไหมเย็บแผล

2.5 แบคทีเรียเซลลูโลส

แบคทีเรียเซลลูโลสหรือที่นิยมเรียกว่า วุ้นน้ำมะพร้าว วุ้นสวรรค์หรือเห็ดรัสเซีย เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจาก การหมักน้ำมะพร้าวด้วยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกได้ โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter acèti subsp. xylinum* ในการผลิตวุ้นมะพร้าวพบว่า น้ำมะพร้าวที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นจะต้องเป็นน้ำมะพร้าวแก่ที่สดและใหม่ มีไขมันน้อยในปริมาณร้อยละ 10-20 (โดยปริมาตร)ปรับสภาวะให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 4-5 โดยใช้กรดอะซิติก และให้ปริมาณออกซิเจนเพียงพอ มีการเติมน้ำตาลและสารประกอบไนโตรเจนโดยน้ำตาล ได้แก่ กาแลคโตส เด็กซ์โตส แลคโตส และมอลโตสใส่ในปริมาณร้อยละ 5-8 น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนให้เชื้อเจริญเติบโต ส่วนสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต ใส่ในปริมาณร้อยละ 0.5-0.6 น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเร่งให้เชื้อผลิตแผ่นวุ้นมะพร้าวได้หนาในเวลาอันสั้น ถ้าใส่ในปริมาณมากจะทำให้ผลผลิตลดลงด้วย

แบคทีเรียเซลลูโลสมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบร้อยละ 95-97 ของของแข็งทั้งหมด เซลลูโลสในแบคทีเรียเซลลูโลสมีโครงสร้างแบบเดียวกับเซลลูโลสในพืช แต่เส้นใยจะมีขนาดเล็กละเอียด (microfibril) ไม่มีลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเปคตินปะปน (Hestrin and Schramm, 1954) ทำให้สามารถแยกเซลลูโลสบริสุทธิ์ออกจากวุ้นน้ำมะพร้าวได้ง่าย

องค์ประกอบทางเคมีของแบคทีเรียเซลลูโลสประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและเส้นใยมากถึงร้อยละ 53.57-59.26 และร้อยละ 19.64-21.30 ตามลำดับ โดยเส้นใยที่พบคือเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในแบคทีเรียเซลลูโลส ถ้าทำการย่อยเซลลูโลสด้วยกรด พบว่า มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 81.9 แต่ถ้าย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 95.9 คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ในแบคทีเรียเซลลูโลสมีมวลโมเลกุลเฉลี่ย 300,000 ถึง 500,000 (Savidge and Colvin, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเซลลูโลสที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรีย *A. xylinum* พบการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรียมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกกลูโคสในรูปของโมเลกุลอิสระเข้าไปภายในเซลล์และรวมตัวกันเป็นสารตั้งต้นคือ โพลีกลูโคแซน สารนี้ถูกส่งผ่านออกมาภายนอกเซลล์ ขั้นที่สองพอลิเมอร์เหล่านี้รวมตัวกันเป็นเส้นใยเซลลูโลสขนาดเล็ก (microfibril) ซึ่งมีความแข็งมากขึ้น เซลลูโลสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเมือกและเป็นแผ่นฝ้าที่ผิวหน้าของอาหารเหลว (Colvin, 1972)

แบคทีเรียสร้างเซลลูโลสขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่เชื่อมระหว่างเซลล์กับอนุภาคหรือสารประกอบอาหารอื่น ๆ ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น สภาวะที่แห้งและอุณหภูมิต่ำ และทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อจากไวรัส

ปริมาณเซลลูโลสในวุ้นน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้น แต่จะเริ่มคงที่เมื่อเวลาในการหมักประมาณ 10 วัน พบว่าลักษณะไฟบริลมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบและมีขนาดความกว้าง 20-50 นาโนเมตร ความยาวอย่างน้อย 10 ไมโครเมตร ไฟบริลประกอบด้วยไมโครไฟบริลซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นาโนเมตรจำนวนมาก ไฟบริลแตกกิ่งก้านแบบ tree-way branching points ตลอดความยาว การแตกกิ่งก้านของไฟบริลเกิดจากการแบ่งเซลล์ในการแพร่พันธุ์ของแบคทีเรียซึ่งเกิดขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้เกิดการแตกกิ่งก้านกันต่างไป ความยาวของไฟบริลระหว่างจุดที่แตกกิ่งก้านจะมีความยาวประมาณ 180-960 นาโนเมตร

เซลลูโลสจากวุ้นน้ำมะพร้าวมีลักษณะดังนี้คือ

1. ไม่มีเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพคติน เจือปนทำให้ง่ายต่อการทำให้เซลลูโลสบริสุทธิ์
2. มีความเป็น hydrophilic สูงเนื่องจากการมีพื้นที่ผิวในโครงสร้างมากจึงสามารถอุ้มน้ำ (water holding capacity) สูงถึง 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง
3. ทนต่อแรงดึงได้สูงกว่าไฟเบอร์สังเคราะห์ต่าง ๆ โดยมีค่า Young's modulus ประมาณ 30,000 เมกกะปาสคาล ซึ่งสูงกว่า organic fiber ถึง 4 เท่า (Nichi และคณะ, 1990) และค่าความต้านแรงดึงซึ่งมีค่าสูงกว่าฟิลม์โพลีเอทธิลีน (polyethylene) หรือไวนิลคลอไรด์ (vinyl chloride) ถึง 5 เท่า
4. ในการสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสสามารถเลือกสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งมีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องถิ่น ทำให้ต้นทุนของการผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวมีราคาต่ำ
5. การสร้างเซลลูโลสจากวุ้นน้ำมะพร้าวในช่วงไมโครไฟบริลเริ่มเกาะกันเป็นสายจนเป็น amorphous cellulose สามารถควบคุมให้มีสมบัติทางกายภาพตามที่ต้องการ โดยจัดการเกี่ยวกับความหนาแน่นของเซลล์ สภาวะในการหมัก ลักษณะของอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก และองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งทำให้สามารถควบคุมสมบัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวข้องกับความขาวสว่าง ความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของเซลลูโลสจากแบคทีเรียได้

2.6 คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ *Acetobacter xylinum*

Acetobacter xylinum เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อน ตรง หรือโค้งขนาด 0.6-0.8 ไมครอน×1.0-1.4 ไมครอน อาจพบเซลล์อยู่เดี่ยวๆจับคู่ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ ไม่สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ระยะแรกของการเจริญส่วนใหญ่ติดแกรมลบแต่เมื่ออายุมากขึ้นจะติดสี Gram variable ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ แต่เมื่อเซลล์รวมอยู่กันมากๆ อาจมีสีชมพู เนื่องจากอิทธิพลของพอร์ไฟรินส์(porphyrins)และบางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลได้ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทหรือย่อยเจลาตินได้ สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ออกซิไดส์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก สามารถออกซิไดส์อะซิเตรทและแลคเตรทเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ไม่สร้างอินโดลและไฮโดรเจนซัลไฟท์ เจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ สามารถพบได้ในธรรมชาติ อาจได้จากการหมักน้ำผลไม้ที่มีน้ำตาลในปริมาณสูงหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำตาลและยีสต์สกัด น้ำตาลที่เชื้อสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีหลายชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล มอลโตส และ แมนิทอล

แบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* สามารถสร้างเซลลูโลสซึ่งมีลักษณะวุ้นขึ้นบนผิวหน้าของสารละลายน้ำตาลที่มีสารอาหารที่เหมาะสม แผ่นวุ้นที่ได้มีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว มีโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสต่อกัน และยังมีคุณสมบัติต่างๆเช่นความสามารถในการละลาย การตกผลึกและองค์ประกอบอื่นๆ เหมือนเซลลูโลสที่ได้จากฝ้าย และเมื่อต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสก็ไม่ละลาย สำหรับปริมาณเซลลูโลสที่มีอยู่ในวุ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ที่มีอยู่ในเนื้อวุ้น และระยะเวลาที่เหมาะสมที่แบคทีเรียเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.7 การสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

เซลลูโลสที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* พบการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรียมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกกลูโคสในรูปของโมเลกุลอิสระเข้าไปภายในเซลล์และรวมตัวกันเป็นสารตั้งต้นคือพอลีกลูโคแซน สารนี้ถูกส่งผ่านออกมาภายนอกเซลล์ ขั้นที่สองพอลิเมอร์เหล่านี้รวมตัวกันเป็นเส้นใยเซลลูโลสขนาดเล็ก (microfibril) ซึ่งมีความแข็งแรงมากขึ้น เซลลูโลสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นเมือกและเป็นแผ่นฝ้าที่ผิวหน้าของอาหารเหลว (Colvin, 1972)

แบคทีเรียสร้างเซลลูโลสขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่เชื่อมระหว่างเซลล์กับอนุภาคหรือสารประกอบอาหารอื่นๆ ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น สภาวะที่แห้งและอุณหภูมิต่ำ และทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อจากไวรัส

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลส คือ bcs A bcs B bcs C และbcs D ได้มีการทดลองว่ายีน bcs A B และ C มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ส่วนยีน bcs D นั้นจะมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์เซลลูโลส ซึ่งผลของการทดลองพบว่าถ้าทำให้ยีน bcs D ลดกิจกรรมลง พบว่าจะทำให้การสังเคราะห์เซลลูโลสลดลงถึงร้อยละ 40 ด้วย

2.8 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum*

การเจริญของเชื้อที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ องค์ประกอบของอาหาร เครื่องมือวิธีการเพาะเลี้ยง และองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

1. ปริมาณเชื้อ

ปริมาณเชื้อที่จะใช้ควรมีปริมาณที่เพียงพอ ควรเป็นเชื้อที่มีอายุ 3 วัน ในปริมาณที่เหมาะสมในช่วงร้อยละ 10-20 วุ้นเซลลูโลสจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อเจริญและมีปริมาณมากถึงระดับหนึ่ง ในระหว่างที่เชื้อมีการเจริญจะมีการสร้างเส้นใยเซลลูโลส(cellulose microfibril) ออกมา เมื่อมีการสร้างมากขึ้นเรื่อยๆจะเกิดการสานและรวมตัวกันเป็นสายขุ่นขาวอยู่ในอาหารเหลวแล้วจะค่อยๆ ลอยตัวขึ้นจนเป็นแผ่นวุ้น

2. อุณหภูมิ

เชื้อ *Acetobacter* ส่วนใหญ่มีการเจริญและผลิตเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่านี้มาก ๆ เชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมและเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส (Kouda และคณะ, 2000)

Lapuz และคณะ (1967)พบว่าการสร้างเซลลูโลสมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้นได้เร็วเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออยู่ระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส

3. ความเป็นกรด-ด่าง

Acetobacter เจริญในอาหารที่มีพีเอชระหว่าง 3.0-7.0 และเจริญได้ดีที่สุดอยู่ในช่วงพีเอช 4.0-5.0 (Kouda และคณะ, 2000) และถ้าอาหารมีพีเอชต่ำกว่า 3.0 หรือสูงกว่า 8.0 จะไม่มีการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้น

Verschuren และคณะ (2000) ศึกษาการหมักที่สภาพนิ่ง โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นน้ำหมักและมีการเติมซูโครสลงไป โดยการศึกษาที่พีเอชต่าง ๆ กัน ได้แก่ พีเอช 3.0 4.0 5.0 และ 6.0 พบว่าที่พีเอช 4.0 และ 5.0 ให้ผลผลิตในการสร้างเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Masaoka และคณะ (1993) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดย *A. xylinum* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร Standard medium ที่พีเอชระหว่าง 2.5-7.0 พบว่าที่พีเอช 4.0-6.0 เชื้อนี้สามารถสร้างเซลลูโลสสูง โดยเฉพาะพีเอช 5.0 สามารถสร้างเซลลูโลสได้สูงที่สุด

Oikawa และคณะ (1995) ศึกษาการเจริญของ *A. xylinum* KU-1 ในอาหารสังเคราะห์ Standard medium ที่มีน้ำตาล D-Arabitol เป็นองค์ประกอบของอาหารที่พีเอชต่าง ๆ ได้แก่ 3.0 - 8.0 พบว่าที่พีเอช 5.0 เชื้อมีการเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สุด

4. แหล่งคาร์บอน

เชื้อ *A. xylinum* สามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งต่าง ๆ ในการผลิตเซลลูโลส นอกจากกลูโคสแล้วยังสามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งอื่น ๆ ได้อีก เช่น ฟรุคโตส แมนนิทอล ซอร์บิทอล กลีเซอรอล กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส (Hestrin, 1947) ทั้งนี้เชื้อสามารถสร้างวุ้นได้จากเด็กซ์โตรสและซูโครส เซลลูโลสที่ได้มีความหนาแน่นและแข็ง ดังนั้นจึงเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเนื่องจากหาง่ายและราคาไม่แพง

แหล่งของซูโครสจะอยู่ในรูปของแป้ง กากส้ม กากผักหวาน (beet) กากของผักหรือผลไม้ที่คัดแล้ว หรือชานอ้อย (Kouda และคณะ 2000)

Masaoka และคณะ (1993) ได้ศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณการใช้คาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส กลีเซอรอล และคาร์บอนจากแหล่งต่าง ๆ ในปริมาณเท่ากัน คือ 0.3 กรัมต่อฟลาสก์ ในอาหาร Standard medium โดยเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* ให้เจริญเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้ววัดปริมาณเซลลูโลสที่ได้โดยนำไปวัดค่ากลืนแสง (O.D.) ที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนได้จากแหล่งต่าง ๆ ในการผลิตเซลลูโลสในปริมาณที่ได้แตกต่างกันไป

จากการทดลองของ Masaoka และคณะ (1993) พบว่าการสร้างเซลลูโลสของเชื้อนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตเซลลูโลสแล้ว ยังขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเหลว ส่วนความลึกและปริมาณอาหารไม่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสเมื่อเลี้ยงที่สภาวะนิ่ง

Oikawa และคณะ (1995) ศึกษาเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* KU-1 ในอาหาร Standard medium และเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล ดี-กลูโคส กับ ดี-อะราบิทอล ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารในการเจริญเติบโตและผลิตเซลลูโลส พบว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาล ดี-อะราบิทอล ในการผลิตเซลลูโลสได้ดีกว่าการใช้น้ำตาล ดี-กลูโคส โดยปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากน้ำตาล ดี-อะราบิทอล จำนวน 12.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากน้ำตาล ดี-กลูโคส จำนวน 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Seto และคณะ (1996) ได้ศึกษาคัดเลือก *Acetobacter* ที่เหมาะสมเพื่อผลิตเซลลูโลสและใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีจากอาหาร CSL mediu

5. ออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นที่ทราบกันทั่วไปแล้วว่าการเจริญของแบคทีเรียเซลลูโลสที่เจริญที่สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่า การให้อากาศ การกวนด้วยใบพัด ในการผลิตเซลลูโลสนั้น ตามปกติแบคทีเรีย *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญเติบโต ดังนั้นในการหมักเพื่อให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้เร็วและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สภาวะนิ่ง ภาชนะที่ใช้หมักต้องมีผิวหน้ากว้างเพื่อให้มีการซึมผ่านและถ่ายเทออกซิเจนได้ดี เชื้อจะลอยตัวอยู่บนผิวหน้าอาหารที่สภาวะนิ่ง และเมื่อเชื้อมีจำนวนและความหนาแน่นในระดับหนึ่งจะเริ่มสร้างวุ้นขึ้น นอกจากนี้ Masaka และคณะ (1993) พบว่า การเลี้ยงเชื้อที่สภาพนิ่งในอาหารเหลว การสร้างเซลลูโลสขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเหลวที่ใช้ ส่วนความลึกและปริมาณไม่มีผลต่อการสร้างความหนาของเซลลูโลส จึงได้มีการนำวิธีการเพิ่มออกซิเจนให้กับเชื้อ โดยวิธีการเขย่าในฟลาสก์และใช้วิธีการกวนด้วยใบพัดเพื่อเพิ่มออกซิเจนระหว่างการหมักในถังหมัก แต่พบว่าปริมาณของเซลลูโลสที่ผลิตได้กลับน้อยลงกว่าที่สภาวะนิ่ง (Hestrin, 1954) ซึ่งต่อมา Kouda และคณะ(1997) พบว่าความเร็วรอบในการเขย่า การกวน ชนิดและสายพันธุ์มีผลต่อการสร้างเซลลูโลส นอกจากนี้ขนาดและชนิดของใบพัดที่ใช้กวนก็มีผลต่อการผลิตเช่นกัน ซึ่งผลของการศึกษาออกซิเจนและความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตเซลลูโลสที่สภาวะการเจริญแบบมีการให้อากาศในถังหมักและมีใบพัดกวน โดยใช้วิธี Static gassing out method ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนและอัตราการผลิตเซลลูโลสสูงขึ้น

Watanabe and Yamanaka (1995) ศึกษาผลของออกซิเจนที่มีต่อการสร้างเซลลูโลสพบว่าที่สภาวะนิ่งการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* เพื่อผลิตเซลลูโลสขณะที่มีการเจริญเติบโตและสร้างเซลลูโลสนั้นเชื้อมีการสร้างเจลาตินเกิดขึ้นด้วย ซึ่งเจลาตินมีผลต่อการสร้างเซลลูโลสเนื่องจากไปขัดขวางการถ่ายเทออกซิเจนของเชื้อในอาหารเหลว ทำให้การถ่ายเทอากาศได้ไม่ดี จึงได้เพิ่มออกซิเจนลงไปในอาหาร จากการทดลองการให้ออกซิเจน 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าจะไปทำให้การสร้างเซลลูโลสสูงกว่าสภาพออกซิเจนที่บรรยากาศปกติ

นอกจากการเติมอากาศลงในอาหารโดยตรงเพื่อเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้กับเชื้อในระหว่างการหมักแล้ว ยังได้มีการเติม micro-particle ลงในอาหารหมักที่สภาวะเขย่า เช่น cellulose porous beads (CPBs) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสที่การหมักในสภาพกวน (agitated condition) ได้ด้วย

6. ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นสารที่มีความสำคัญในการสร้างเซลลูโลส อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของอาหารจะทำให้ *Acetobacter* ไม่สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารพวกอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนียม แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมฟอสเฟต อยู่ในรูปของไนเตรท เช่น ยูเรีย หรืออยู่ในรูปของสารอาหารที่สกัดจากธรรมชาติที่มีอยู่ใน Bacto-peptone Bacto-soytone Yeast-extract CSL(corn steep liquor) และ Beab-Condensate (Kouda และคณะ 2000)

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของ Lapuz และคณะ (1967) พบว่าการใช้ $NH_4H_2PO_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ $(NH_4)_2SO_4$ และเปปโตน ในขณะที่การใช้ KNO_3 และ $NaNO_3$ ไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และไม่เกิดการสร้างเซลลูโลสเลยเนื่องจากพบว่าเป็นสารประกอบไนเตรทที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดนั้น

7. เอทานอลและกรดอะซิติก

Acetobacter เป็นกลุ่มเชื้อที่สามารถออกซิไดส์เอทานอลเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ ดังนั้น *Acetobacter* sp. ทั้งหมดสามารถใช้ไวน์ได้ ซึ่งกระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับระดับอัตราการหายใจของเชื้อ โดยส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนเกือบทุกสายพันธุ์รวมทั้ง *A. aceti* สามารถเจริญในอาหารเหลวและลอยบนผิวอาหารเหลวได้โดยมีการสร้างเส้นใยสีขาวเกิดขึ้นที่สภาวะนิ่ง นอกจากนี้ *A. xylinum* สามารถสร้างเส้นใยและได้จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลสด้วย(Brow และคณะ, 1976) แต่เชื้อจะไม่มีการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้นถ้าหากไม่มีกลูโคสในอาหาร นอกจากนี้ยังไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีเอทานอลเดี่ยว ๆ ถ้าอาหารไม่มีการเติมกรดอะซิติก เกลืออะซิเตต หรือกลูโคสลงไปด้วย

Toda และคณะ (1997) ได้ศึกษาการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งของเชื้อ *A. xylinum* ในอาหารที่มีกลูโคส เมื่อมีการเติมกรดอะซิติกลงไปจะไปทำให้มีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจากเดิม 4 เท่า และนอกจากนี้ถ้าเติมกรดอะซิติกลงไป 20 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *A. pasteurianus* ที่สภาวะเดียวกัน

Naritomi และคณะ (1998) ศึกษาเอทานอลที่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสโดยใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเจริญแบบต่อเนื่อง จากการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR3001A ในอาหาร CSL-Fru medium ซึ่งมีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมเอทานอลลงไปในอาหาร 10 กรัมต่อลิตรนั้น จะมีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 46 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปลี่ยนเอทานอลจาก 10 กรัมต่อลิตร เป็น 15 กรัมต่อลิตร หรือมากกว่า พบว่าอัตราการสร้างเซลลูโลสลดลง ซึ่งเอทานอลจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและการใช้น้ำตาลในขบวนการสังเคราะห์ แบคทีเรียเซลลูโลส

8. สารอื่น ๆ

นอกจากน้ำตาล ไนโตรเจนแล้ว ยังมีสารอื่น ๆ ที่เติมลงไปในอาหารในรูปแบบต่าง ๆ เช่น สารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของกรดอะมิโน วิตามิน กรดไขมัน กรดนิวคลีอิค 2,7,9 tricarboxy-1 Hpyrro[2,3,5]-quinoline-4.5-dione, sulfite pulp น้ำทิ้งเยื่อกระดาษ

สารอินทรีย์ในรูปของเกลือต่าง ๆ เช่น ฟอสเฟต แมกนีเซียม แคลเซียม โคบอล โมลิปเดต ฮีมาไตท์ คีเลต

2.9 การนำวุ้นเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ไปใช้ประโยชน์

เอกสารนี้อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันมีผู้ที่ให้ความสนใจในการผลิตวุ้นเซลลูโลสกันมากเนื่องจากสามารถใช้น้ำมะพร้าวแก่ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากครัวเรือนและจากอุตสาหกรรมแปรรูปมะพร้าว หรือใช้น้ำผลไม้จากวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปผลไม้มาเป็นวัสดุในการผลิตได้ นอกจากนี้แผ่นวุ้นที่ได้จากการหมักสามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารได้หลายชนิด นอกจากการเชื่อมเป็นวุ้นในน้ำเชื่อมหรือผสมกับน้ำผลไม้ หรือรับประทานกับไอศกรีมและอาหารหวานชนิดต่างๆ แล้วยังสามารถนำไปประกอบเป็นอาหารคาวชนิดต่างๆ โดยใช้เป็นอาหารมังสวิรัสแทนเนื้อปลาหมึกหรือแมงกะพรุน อย่างไรก็ตามยังมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์วุ้นเซลลูโลสเพื่อให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น โดยการนำผลิตภัณฑ์วุ้นเซลลูโลสที่ได้มาผสมกับน้ำผลไม้ เช่น น้ำลิ้นจี่ (วราวุฒิ, 2536) และเนื่องจากสมบัติของวุ้นเซลลูโลสที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเซลลูโลสที่ปราศจากลิกโนเซลลูโลสจึงทำให้สามารถนำวุ้นเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ได้หลายลักษณะดังนี้

1. ด้านอาหาร

วุ้นเซลลูโลสนิยมใช้เป็นอาหารหวาน โดยเฉพาะวุ้นเซลลูโลสในน้ำเชื่อมทั้งน้ำเชื่อมเข้มข้นและน้ำเชื่อมเจือจาง อีกทั้งวุ้นเซลลูโลสในลักษณะผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น วุ้นเซลลูโลสในฟรุ๊ตสลัด เจลลี่ หรือ นมเปรี้ยว เป็นต้น นอกจากนี้แล้วยังได้นำวุ้นมะพร้าวมาใช้ในการทำอาหารคาวหลายๆชนิดวุ้นเซลลูโลสนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมคุณภาพ (healthy food) โดยใช้เพิ่มเยื่อใยและกากอาหารเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก

2. ด้านผลิตภัณฑ์กระดาษ

เส้นใยฟีนอลเรซิน(phenol resin fiber) หรือ เส้นใยคาร์บอน(carbon fiber)ซึ่งโดยปกติไม่สามารถทำให้เป็นแผ่นได้ แต่เมื่อนำเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงแล้วมาผสมเพื่อใช้เป็นตัวเชื่อม (binder) จะทำให้เส้นใยเหล่านี้ขึ้นรูปเป็นแผ่นได้ ในการผลิตกระดาษคาร์บอน (activated carbon fiber sheets) เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษ การเติมเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสลงไปจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษให้ดีขึ้น

3. ด้านการผลิตกระดาษลำโพง

วัสดุที่ใช้ในการผลิตกระดาษลำโพงจำเป็นต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ต้องให้คลื่นเสียงความเร็วสูง(high sonic velocity)และต้องลดคลื่นรบกวนได้ดี เพื่อให้ได้คุณภาพเสียงที่ชัดเจน วัสดุที่ใช้ในการผลิตกระดาษลำโพงมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน บางชนิดมีความสามารถในการลดเสียงรบกวนได้ไม่ดี ในขณะที่บางชนิดให้ความเร็วคลื่นเสียงได้ต่ำเกินไป เช่น เพียง 1500 เมตรต่อวินาทีเท่านั้น แต่การนำเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* พบว่ามีข้อได้เปรียบ คือให้เสียงสูงที่ดี มีความเร็วของคลื่นเสียงสูงเท่ากับอลูมิเนียม และยังมีคุณสมบัติในการลดเสียงรบกวนได้ดีเท่ากับกระดาษโคนอีด้วย ดังนั้นเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสจึงสามารถนำมาใช้ในการผลิตกระดาษลำโพงได้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ด้านสารให้ความหนืดและความคงตัว

การนำเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ที่ผสมกับโพลิเมอร์อื่นๆ เช่น โพลิไวนิล แอลกอฮอล์ เพื่อผลิตวัสดุที่มีความแข็งแรงและทนทาน ใช้เป็นสารให้ความหนืดและความคงตัวในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

ในการนำเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสมาทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivatives) เช่น hydroxymethylcellulose carboxymethylcellulose และ cellulose acetate จะทำให้การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา ผงซักฟอก กาว สิ่งทอ และกระดาษ เป็นต้น

2.10 วิธีการทำให้เป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์

วิธีการผลิตเซลลูโลสที่สร้างขึ้นมาแล้วจะมีเซลล์ของแบคทีเรีย รวมอยู่ด้วย จึงต้องทำให้เซลลูโลสที่ผลิตได้ บริสุทธิ์โดยวิธีการต่างๆ

วิธีการที่ทำให้เซลลูโลสจากแบคทีเรียมีความบริสุทธิ์ ได้แก่ การล้าง การระเหยภายใต้ความดัน การล้างด้วยกรด ล้างด้วยด่าง ฟอกสีให้ขาวด้วยไฮโปคลอไรท์ หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้เอนไซม์ไลซิง (lysing) ร่วมกับไลติค (lytic) หรือใช้ lauryl sulfate หรือ deoxycholate ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 200 องศาเซลเซียส

Kasaoka (1993) ทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสจากการเลี้ยงด้วย *Acetobacter xylinum* ในอาหารเหลวจากนั้นนำเซลลูโลสที่ได้กรองด้วยตะแกรง ขนาด 45 ไมครอน จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปต้มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 20 นาทีและล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนอีกหลายๆ ครั้งจนหมดด่าง นำเซลลูโลสไปอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาหนึ่งคืน ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้

Ramana และคณะ (2000) ศึกษาการใช้ด่าง (alkali treatment) ในการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย จะเห็นโครงสร้างที่เป็นรูพรุน (porous structure) และลักษณะเส้นใย (fibrillar structure) หลังการล้างด้วยด่าง

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชิดชมและคณะ (2537) ได้ทำการศึกษาเรื่อง การผลิตคาร์บอกซีเมทิลไคติน (Carboxymethyl-chitin) เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารพบว่า การผลิตคาร์บอกซีเมทิลไคติน (ซีเอ็ม-ไคติน) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 55 60 และ65 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ ทำปฏิกิริยากับไคตินที่อุณหภูมิ 0 และ -20 องศาเซลเซียส หลังจากทิ้งไว้ค้างคืน จึงนำ แอลคาไลน์ไคติน (alkali_chitin) ที่เตรียมไว้มาทำปฏิกิริยาแอลคิลเลชัน (alkylation) กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดมอนอคลอโรอะซิติก (monochloroacetic) ใน ไค-โพรพานอล (2-propanol) ผลการทดลองปรากฏว่า ซีเอ็มไคตินที่ผลิตได้ในแต่ละสภาวะมีคุณภาพแตกต่างกันและมีค่าองศาการแทนที่ (degree of substitution, DS) ของหมู่คาร์บอกซีเมทิลที่ตำแหน่ง C_6 ศึกษาโดย IR และ ^{13}C อยู่ในช่วง 0.38-0.7 ขึ้นกับความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ สำหรับการนำมาใช้ประโยชน์ด้านอาหาร พบว่า สามารถใช้เป็นสาร emulsifier, thickener หรือstabilizer ในผลิตภัณฑ์ salad dressing และทำหน้าที่เป็น bodying agent ในผลิตภัณฑ์น้ำหวานเข้มข้นอย่างได้ผล

Srikumlaithong S. และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาเรื่อง การผลิตไคโตซานจากหัวกุ้งกุลาดำและการใช้ประโยชน์ในการดูดซับโลหะหนักโดยพบว่าสภาวะการผลิตไคโตซานจากหัวกุ้งอย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ การแยกโปรตีนด้วยการทำปฏิกิริยาของหัวกุ้งกับ 0.1 นอร์มัลโซเดียมไฮดรอกไซด์ อัตราส่วน 1 ต่อ 6 น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง แยกเกลือแร่โดยทำปฏิกิริยาของสารที่ได้กับ 1.25 นอร์มัล กรดไฮโดรคลอลิก อัตราส่วน 1 ต่อ 10 น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง เวลา 1 ชั่วโมง แยกหมู่อะซิทิลด้วยการทำปฏิกิริยาของไคตินกับร้อยละ 50 น้ำหนักต่อปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ อัตราส่วน 1 ต่อ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง ได้ไคโตซานปริมาณร้อยละ 28.6 ประกอบด้วยขี้เถ้า ร้อยละ 0.16 การละลายร้อยละ 100 การดึงหมู่อะซิทิลร้อยละ 82.04 ความหนืด 1372 เซนติพอยส์และไนโตรเจนร้อยละ 7.9 มีสมบัติอยู่ในเกณฑ์เดียวกับไคโตซานที่นำเข้าจากต่างประเทศ เมื่อนำไปดูดซับโลหะหนักในน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมชุบโลหะด้วยไฟฟ้าให้ประสิทธิภาพในการดูดซับอิออนของ ทองแดง นิกเกล สังกะสี เท่ากับร้อยละ 70 ร้อยละ10.12 และร้อยละ 20.49 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับไคโตซานจากต่างประเทศ

Pikul และคณะ (2003) ได้ศึกษาคุณสมบัติของแผ่นเมมเบรนที่ได้จากเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* พบว่าการใช้อาหารน้ำมะพร้าวที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 4 จะทำให้เชื้อผลิตแผ่นเมมเบรนได้เร็วกว่าสูตรของ Schramm and Hestrin's medium การเลี้ยงเชื้อนาน 2 วัน จากอาหารสูตรดังกล่าวและใช้ความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้นเพิ่มจาก 1×10^8 เป็น 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะทำให้ลดค่า water fux และลดค่า hydaulic permeability coefficient (L_p) จาก 3.6×10^{-10} เป็น 0.5×10^{-10} $m^3N^{-1}S^{-1}$ แผ่นเมนเบรนนี้มีลักษณะเป็น asymmetric hydrophilic type โดยมีความหนาน้อยกว่า 6.0 μm. ความเป็นรูพรุน (porosity) ของแผ่นเมนเบรนอยู่ในช่วงร้อยละ 1.4-2.4 โดยมีขนาด pore size โดยเฉลี่ย 0.08 μm. และแผ่นเมมเบรนไม่สามารถให้เซลล์ของสาหร่ายคลอเรลลาและโปรตีนโบรวีนเซรัมอัลบูมิน (BSA)ผ่านได้ Mosaoka และคณะ (1993) พบว่าผลผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสจะมีความสัมพันธ์กับการใช้สารอาหารน้ำตาลกลูโคส ผลผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิก และกรดคีโตกลูโคนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Geyer และคณะ (1994) ได้นำเซลลูโลสมาพัฒนารูปแบบการผลิตให้มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกเพื่อใช้เป็นวัสดุแทนท่อเลือด ท่อน้ำเหลือง ท่อปัสสาวะและหลอดลม

Yamanaka (1989) ได้นำเซลลูโลสที่ผลิตได้จาก *Acetobacter xylinum* มาทำเป็นลำโพง พบว่ามีข้อดีหลายประการคือ ให้เสียงสูงที่ดี มีความเร็วสูงเท่ากับอลูมิเนียม และยังมีคุณสมบัติในการลดเสียงรบกวนได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อจุลินทรีย์

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Bacillus subtilis *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* *Serratia* sp. *Micrococcus* sp. *Staphylococcus aureus* *Salmonella* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

2. วัตถุดิบ

น้ำมะพร้าวแก่

ไคโตซาน ซึ่งซื้อจากบริษัทสยามไบโอเนท จำกัด มีการขจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 85 (percent degree of deacetalation)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารสูตรน้ำมะพร้าว

MHA (Mueller hinton agar)

MHB (Mueller hinton broth)

4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เซลลูโลสชนิดผง (Cellulose, power grade)
2. เททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ $[(CH_3)_4NCl]$ เกรดวิเคราะห์
3. ไอโซโพรพานอล
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เกรดการค้า
5. กรดคลอโรแอซีติก ($ClCH_2COOH$) เกรดการค้า
6. กรดอะซิติกเข้มข้น
7. เอทานอล 80% เกรดการค้า
8. สารละลายเงินไนเตรต ($AgNO_3$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH)

5. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู (flask) ขนาด 500 ml.
2. บีกเกอร์ ขนาด 250 , 500,1000 ml.
3. กระบอกตรวง ขนาด 10 100 500 1000 ml.
4. Petri dish จำนวน 50 ใบ
5. ปิเปตขนาด 5 10 ml.
6. จุกยาง 2 อัน
7. แท่งแก้วคน
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. หลอดหยด
10. ขวด Duran ขนาด 500 ml.
11. ช้อนตักสาร
12. กรวยบุชเนอร์และขวดซักชั่น ขนาด 500 ml.
13. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) รุ่นHV-50 ประเทศญี่ปุ่น
14. ตู้เขี่ยเชื้อ (larmina air flow) รุ่น BVT 123 ประเทศญี่ปุ่น
15. เครื่อง Texture analyzer รุ่นTA plus ประเทศอังกฤษ
16. อุปกรณ์ในการสังเคราะห์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส รูปที่ 2.1
17. เครื่องไมโครมิเตอร์แบบตัวเลข (digital micrometer) RANGE 0-25 MM.,RESOLUTION 0.001 MM. ประเทศญี่ปุ่น
18. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectophotometer) รุ่นUV-1601 ประเทศออสเตรเลีย

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

การดำเนินงานแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

3.2.1 การผลิตแผ่นฟิล์มจากไคโตซานร่วมกับเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

โดยมีวิธีการ 2 วิธีด้วยกันดังนี้

วิธีที่ 1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและนำสารละลายไคโตซาน มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วนต่างๆ จากนั้นนำมาทำเป็นแผ่นฟิล์ม

3.2.1.1 วิธีเตรียมสารละลายไคโตซาน

ชั่งไคโตซานที่บดให้เป็นผงละเอียด 10 กรัม จากนั้นปิเปตกรดอะซิติกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเล็กน้อยลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมผงไคโตซานทีละน้อยและเติมกรดอะซิติกเจือจางลงไปเล็กน้อยโดยทำให้ไคโตซานละลายได้หมดเติมน้ำลงไปเล็กน้อยคนตลอดเวลาและอุณหภูมิในการคนไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมไคโตซานและสารละลายกรดอะซิติกเจือจางทุกๆ 15 นาที จนกระทั่งผงไคโตซานละลายหมด ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 500 มิลลิลิตร

3.2.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ

นำน้ำมะพร้าวแก่มากรองด้วยผ้าขาวบางให้สะอาดจากนั้นนำไปตั้งไฟ เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 ต้มให้ละลายนำลงจากเตาทิ้งไว้ 5-10 นาที เติมกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 ของปริมาตรน้ำมะพร้าว แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ลงไปร้อยละ 20 ของปริมาตรอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาพนิ่งนาน 3 วัน

3.2.1.3 การหมักเพื่อให้ได้แผ่นเซลลูโลส

นำน้ำมะพร้าวแก่มากรองด้วยผ้าขาวบางให้สะอาด จากนั้นนำไปตั้งไฟ เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 ตั้งไฟให้ละลาย ยกลงจากเตา ทิ้งไว้ 5-10 นาที เติมกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 ของปริมาตรน้ำมะพร้าว แบ่งใส่ฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตร เติมสารละลายไคโตซานในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ร้อยละ0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปิดจุก นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อที่เตรียมได้ร้อยละ 20 ของปริมาตรอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่งนาน 7 วัน เก็บวุ้นมะพร้าวหรือเซลลูโลสออกมาแล้ว จากนั้นนำไปแช่ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดอีก 30 นาที นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้ไปรีดน้ำจะได้แผ่นฟิล์มในลักษณะแผ่นเปียกนำไปวัดค่าทางกล เช่น ค่ามอดุลัสของยัง ค่าความแข็งแรงดึง ค่าการยืด ณ จุดขาดโดยใช้เครื่อง Texture analyzer จากนั้นนำแผ่นฟิล์มเปียกที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จะได้แผ่นฟิล์มในลักษณะแห้ง จากนั้นก็นำแผ่นแห้งไปวัดค่าทางเชิงกลอีกครั้งเพื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเปียก

3.2.1.4 การทำผงเซลลูโลสแห้ง

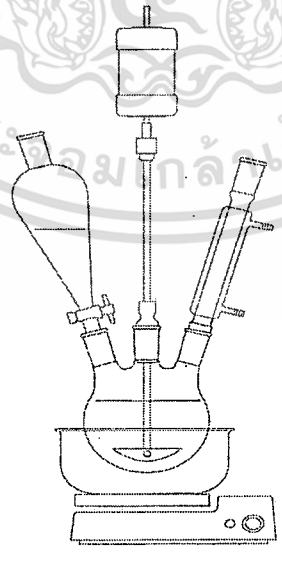
นำเซลลูโลสที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 7 วัน นำมาล้างน้ำเพื่อกำจัดเอากรดอะซิติกออกต้มในน้ำเดือดนาน 1 ชั่วโมง นำมาอัดรีดน้ำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จะได้แผ่นเซลลูโลสแห้ง นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆหรือนำมาปั่นให้ละเอียดก็จะได้ผงเซลลูโลสแห้ง

วิธีการที่ 2 นำผงเซลลูโลสแห้งมาทำเป็น CMC (carboxy methyl cellulose) เพื่อให้มีสมบัติในการละลายน้ำได้ นำมาผสมในสารละลายไคโตซานเพื่อผลิตแผ่นฟิล์ม

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า นอกจากได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.5 การเตรียม Carboxymethyl cellose (CMC)

ชั่งเซลลูโลส 6 กรัม เกลือเททระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.1 กรัม แล้วตวงไอโซโพรพานอล 130 มิลลิลิตร เทสารผสมทั้งหมดลงถังปฏิกรณ์ขนาด 500 มิลลิลิตร ตั้งเครื่องมือดังรูปที่ 1 กวนของผสมด้วยเครื่องกวนเชิงกลที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ใบพัดกวนด้วยความเร็วประมาณ 300-500 รอบต่อนาทีค่อย ๆ หยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 36 โดยน้ำหนัก จำนวน 15 กรัม จากกรวยแยกจนหมดในเวลา 10 นาที แล้วกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีให้ความร้อนแก่ของผสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยควบคุมความเร็วรอบในการปั่นกวนที่ 300 รอบต่อนาทีเทสารละลายกรดคลอโรอะซีติก (เตรียมโดยชั่งกรดคลอโรอะซีติก 6 กรัม ละลายในไอโซโพรพานอล 20 มิลลิลิตร) อย่างรวดเร็ว แล้วปั่นกวนที่ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำมาแช่ในน้ำเย็น นำของผสมมาปรับให้เป็นกลางด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นเพื่อหยุดปฏิกิริยา ทำการทดสอบด้วยกระดาษลิตมัสจนไม่เปลี่ยนสีจากแดงเป็นน้ำเงินกรองตัวอย่างของผสมผ่านกระดาษกรองโดยเครื่องกรองเพื่อแยกไอโซโพรพานอลออก ล้าง CMC ด้วยเอทานอล (ร้อยละ80 โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผ่านเครื่องกรองแบบสูญญากาศ เพื่อกำจัดเกลือคลอไรด์ทดสอบเกลือคลอไรด์ที่เหลืออยู่ โดยนำเอทานอลที่ใช้ล้างคาร์บอกซีเมิลเซลลูโลส 5 หยดสุดท้ายจากกรวยกรองมาหยดด้วยสารละลายเงินไนเตรต 2-3 หยด จนพบว่าสารละลายไม่มีตะกอนสีขาวของเงินคลอไรด์เกิดขึ้นล้างต่ออีกครั้งด้วยเอทานอลที่ปราศจากน้ำ กรองให้แห้ง ถ่ายสารจากกรอยกรองลงบนกระจกนาฬิกา อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำให้เย็นในเครื่องดูดความชื้นจะได้ผง CMC จากนั้นนำมาละลายน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5



รูปที่ 3.1 การจัดอุปกรณ์ในการสังเคราะห์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.6 การนำ CMC มาผสมกับสารละลายไคโตซาน

เมื่อได้สารละลาย CMC มาผสมกับสารละลายไคโตซานโดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณสารละลาย CMC ต่อปริมาณสารละลายไคโตซานดังนี้ 0:30 5:20 10:20 15:15 20:10 25:5 และ 30:0 จากนั้นนำมาใส่จานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร ปริมาตรของสารผสม 30 มิลลิลิตรต่อจานเพะเชื้อ นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 4 ชั่วโมงแล้วนำแผ่นฟิล์มไปอบให้แห้งอีกครั้งในตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมง จะได้แผ่นฟิล์มแห้ง

3.2.2 ศึกษาสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม คือ ค่าความแข็งแรงดึง (Tensile Strength) ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด (Percent Elongation at Maximum Load) ค่ามอดุลัสของยัง (Young's Modulus)ตาม มอก. 1353 เล่ม 3-2540 โดยใช้เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ Texture Analyzer รุ่น TA plu

3.2.2.1 ค่าความแข็งแรงดึง (Tensile Strength)

วิธีการคำนวน

ความแข็งแรงดึง (นิวตัน/ตารางเมตร) = F/A

เมื่อ F = แรงดึงสูงสุด (นิวตัน)

A = พื้นที่หน้าตัดของชิ้นทดสอบ (ตารางมิลลิเมตร)

3.2.2.2 ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด (Percent Elongation at Maximum Load)

วิธีการคำนวน

$$\text{ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด (ร้อยละ)} = \frac{L_t - L_0}{L_0} \times 100$$

เมื่อ L_0 = ความยาวเริ่มต้น

L_t = ความยาว ณ จุดที่รับแรงสูงสุด

3.2.2.3 ค่ามอดุลัสของยัง (Young's Modulus)

คำนวณจากความชันในช่วงเริ่มต้นของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง tensile stress กับ tensile strain

$$\textit{Young}\text{'s Modulus} = \frac{\text{tensile stress}}{\text{tensile strain}}$$

$$\text{tensile stress} = \frac{\text{tensile force}}{\text{area of cross-section}}$$

$$= \frac{Mg}{A}$$

$$\text{Tensile strain} = \frac{L_t - L_0}{L_0}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tensile stress (ความเค้นดึง) คือ ความสามารถหรือความทนต่อแรงภายนอกที่มากระทำต่อวัตถุ (loads) ต่อหน่วยพื้นที่หน้าตัดมีหน่วยเป็นนิวตันต่อตารางเมตร (N/m^2) หรือพาสคัล (Pascals, Pa)

ในการทดลองได้ใช้ load cell น้ำหนัก 1000 กิโลนิวตัน ความเร็วการดึง 20 มิลลิเมตรต่อวินาที หัวจับแบบเหล็ก โดยทำการตัดตัวอย่างเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 20×20 มิลลิเมตร

จากการวัดสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ คัดเลือกความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสม ซึ่งทำให้แผ่นฟิล์มมีความแข็งแรงมากขึ้น นำแผ่นฟิล์มที่ความเข้มข้นเหมาะสมมาใช้ในการทดลองต่อไป

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของดันแคน (Duncan ' s new multiple range test)

3.2.3 ศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของแบคทีเรียผ่านแผ่นฟิล์ม

3.2.3.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่จะใช้ทดสอบ

โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ *Bacillus subtilis* *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* *Serratia* sp. *Micrococcus* sp. *Staphylococcus aureus* *Salmonella* sp. ลงในอาหารเหลว MHB นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายของเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรให้ได้ 0.2 ซึ่งมีความหนาแน่นของจุลินทรีย์ประมาณ 10^6-10^7 เซลล์ต่อมิลลิเมตร สารละลายของเชื้อที่ได้นำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.2.3.2 วิธีการเตรียมแผ่นฟิล์มที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ

แผ่นฟิล์มที่นำมาใช้ทดสอบมี 3 ชนิดดังนี้ แผ่นฟิล์มที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย แผ่นฟิล์มที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมไคโตซานในความเข้มข้นที่เหมาะสมและแผ่นฟิล์มไคโตซานอย่างเดียว ซึ่งแผ่นฟิล์มที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียและแผ่นฟิล์มไคโตซานใช้เป็นชุดควบคุม (control) ตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 20×20 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

3.2.3.2.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มที่เป็นไคโตซานอย่างเดียวซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม

เตรียมโดยเทสารละลายไคโตซานลงในจานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 4 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำแผ่นฟิล์มอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงอีกครั้ง จะได้แผ่นฟิล์มไคโตซาน

3.2.3.2.2 การเตรียมแผ่นฟิล์มที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวโดยไม่ได้เติมสารละลายไคโตซาน เลี้ยงเชื้อสภาวะนิ่งนาน 7 วัน นำเซลลูโลสที่ได้มาแช่ในแอมโมเนียมไฮ -

ดรอกไซด์ (NH_4OH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 12 ชั่วโมง นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้รีดน้ำออก นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมง

3.2.3.2.3 การเตรียมแผ่นฟิล์มที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานความเข้มข้นที่เหมาะสม

เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวที่เติมสารละลายไคโตซานในความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3.2.2 เลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งนาน 7 วัน นำเซลลูโลสที่ได้มาแช่แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 12 ชั่วโมง นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้รีดน้ำออกนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

3.2.3.3 วิธีการทดสอบการซึมผ่านของแบคทีเรียผ่านแผ่นฟิล์ม

เทอาหาร MHA ใส่จานเพาะเชื้อ ทิ้งให้อาหารเย็นลง นำแผ่นฟิล์มที่ต้องการทดสอบทั้ง 3 ชนิดมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดสารละลายของเชื้อที่ใช้ทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนแผ่นฟิล์ม นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ยกแผ่นฟิล์มออกจากจานเพาะเชื้อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงในจานเพาะเชื้อ ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อที่อยู่บนอาหารใต้แผ่นฟิล์ม นำมาลากลงบนจานเพาะเชื้อ MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อ

3.2.4 ศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor permeability)

นำแผ่นฟิล์มวัดความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำ โดยใช้ เครื่อง Water vapor permeation tester ; Lyssy L800-4000 ทดสอบโดยใช้วิธี ISO 15106-1 : 2003 (E) Plastics-Film and sheeting-Determination of water vapour transmission rate -Part 1 : Humidity detection sensor method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 ศึกษาการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (Oxygen Gas Transmission Rate)

นำแผ่นฟิล์มวัดความสามารถในการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน โดยใช้เครื่อง Oxygen permeation tester ; Illinois 8000 ทดสอบโดยใช้วิธี ASTM D3985-02 Oxygen Gas Transmission Rate Throungh Plastic Film and Sheeting Using a Coulometic Sensor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานและการทดลอง

4.1 ศึกษาแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียร่วมกับไคโตซาน

วิธีที่ 1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและนำสารละลายไคโตซาน มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วนต่างๆ จากนั้นนำมาทำเป็นแผ่นฟิล์ม พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของไคโตซานในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งมีการสร้างเซลลูโลสที่ค่อนข้างบางกว่าแผ่นฟิล์มที่เป็นเซลลูโลสอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเติมสารละลายไคโตซานลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไปรบกวนการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ทำให้ความหนาของแผ่นฟิล์มเซลลูโลสลดลง แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 4.1 ผลความหนาของแผ่นฟิล์มเมื่อใช้สารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของไคโตซาน (เปอร์เซ็นต์)	ความหนาเฉลี่ยของแผ่นเปียก (มิลลิเมตร)	ความหนาเฉลี่ยของแผ่นแห้ง (มิลลิเมตร)
0	0.754	0.063
0.2	0.225	0.055
0.4	0.212	0.050
0.6	0.151	0.048
0.8	0.145	0.033
1.0	0.144	0.033

วิธีการที่ 2 นำผงเซลลูโลสแห้งมาทำเป็น CMC (carboxy methyl cellulose) เพื่อให้มีสมบัติในการละลายน้ำได้ แล้วนำมาผสมในสารละลายไคโตซานเพื่อผลิตแผ่นฟิล์ม จากการทดลองพบว่าเมื่อผสมสารละลาย CMC กับสารละลายไคโตซานในอัตราส่วนต่างๆ สารละลายทั้งสองไม่สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายทั้งสองชนิดมีตัวทำละลายต่างกันโดยสารละลาย CMC มีน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ขณะที่สารละลายไคโตซานมีกรดอ่อนเป็นตัวทำละลายเมื่อนำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน จึงทำให้ได้สารผสมที่มีลักษณะบางส่วนที่ไม่สามารถผสมรวมกันได้ลักษณะของแผ่นฟิล์มที่ได้ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อวัดความหนาของแผ่นฟิล์มที่ได้จากการผสมสารละลายทั้งสองชนิดพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณสารละลาย CMC สูงขึ้น แผ่นฟิล์มที่ได้จะมีความหนาลดลง แสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองไม่สามารถหาความหนาของแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกได้ เนื่องจากเมื่อนำแผ่นฟิล์มแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.5 แผ่นฟิล์มจะเปื่อยยุ่ยไม่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มแผ่นฟิล์มที่ได้จากวิธีการนี้มีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน จึงไม่เลือกการผลิตแผ่นฟิล์มโดยวิธีนี้มาศึกษาต่อ

ตารางที่ 4.2 ความหนาของแผ่นฟิล์มที่ได้จากการผสมสารละลาย CMC กับสารละลายไคโตซานในปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณสารละลาย CMC ต่อปริมาณสารละลายไคโตซาน (มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร)	ความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์ม (มิลลิเมตร)
0 : 30	0.290
5 : 25	0.138
10 : 20	0.140
15 : 15	0.126
20 : 10	0.107
25 : 5	0.088
30 : 0	0.010

4.2 ศึกษาสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้จากการเติมสารละลายไคโตซานในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

4.2.1 ค่าความแข็งแรงดึง (Tensile Strength)

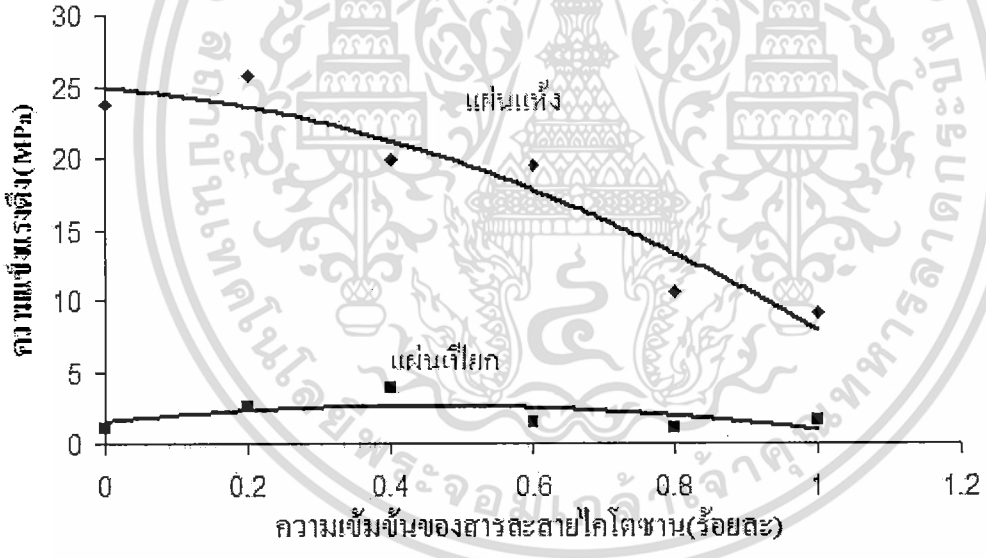
จากการเพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวที่เติมสารละลายไคโตซานในความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำมาทำเป็นแผ่นฟิล์มลักษณะเปียกและลักษณะแห้ง วัดค่าความแข็งแรงดึงของแผ่นฟิล์มทั้งสองลักษณะ พบว่าเมื่อเติมสารละลายไคโตซานจะทำให้แผ่นฟิล์มมีค่าความแข็งแรงดึงเพิ่มสูงขึ้นกว่าแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้เติมสารละลายไคโตซาน โดยแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกจะมีค่าความแข็งแรงดึงสูงสุดคือ 3.92 ± 1.74 MPa เมื่อเติมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว จะทำให้แผ่นฟิล์มที่ได้มีค่าความแข็งแรงดึงลดลง สำหรับแผ่นฟิล์มในลักษณะแห้งให้ผลการทดสอบค่าความแข็งแรงดึงมีแนวโน้มเช่นเดียวกับแผ่นเปียก โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานร้อยละ 0.2 แผ่นฟิล์มจะมีค่าความแข็งแรงดึงสูงสุดคือ 26.22 ±1.66 MPa เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มขึ้น ค่าความแข็งแรงดึงของแผ่นแห้งจะลดลง แสดงดังตารางที่4.3 และ รูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าความแข็งแรงดึง (Tensile Strength) ของแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ร้อยละ)	ค่าความแข็งแรงดึงของแผ่นเปียก (MPa)	ค่าความแข็งแรงดึงของแผ่นแห้ง (MPa)
0.0	0.97^{C}	23.19^{b}
0.2	2.44^{b}	26.22^{a}
0.4	3.00^{a}	18.98^{C}
0.6	1.46^{C}	19.35^{C}
0.8	1.50^{C}	10.85^{d}
1.0	1.40^{C}	9.74^{d}

*อักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.1 การเปรียบเทียบค่าความแข็งแรงดึงของแผ่นฟิล์มในลักษณะแผ่นเปียกและลักษณะแผ่นแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

4.2.2 ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด (Percent Elongation at Maximum Load)

จากการทดลองพบว่าแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้เติมสารละลายไคโตซานทั้งแผ่นเปียกและแผ่นแห้งมีค่าการยืด ณ จุดขาดสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่เติมสารละลายไคโตซาน โดยแผ่นฟิล์มลักษณะเปียกและลักษณะแห้งมีค่าการยืด ณ จุดสูงสุด คือร้อยละ 24.00 และ 3.02 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานจะทำให้แผ่นฟิล์มที่ได้ทั้งลักษณะเปียกและลักษณะแห้งมีแนวโน้มการ

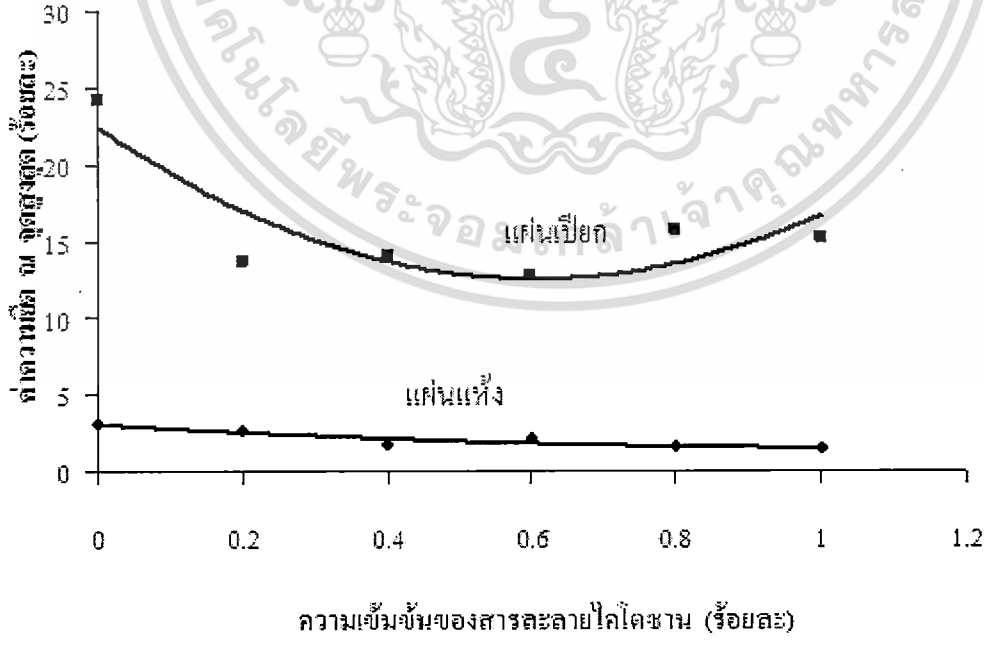
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนแปลงค่าการยืด ณ จุดสูงสุดลดลงเรื่อย ๆ โดยพบว่า การเติมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1.0 จะทำให้แผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกและแห้งมีค่าการยืด ณ จุดสูงสุดมีค่าร้อยละ 14.83และ 1.45 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกมีค่าการยืด ณ จุดสูงสุดสูงกว่าแผ่นฟิล์มในลักษณะแห้ง แสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.4 ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด ของแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ร้อยละ)	ค่าความยืด ณ จุดสูงสุดของแผ่นเปียก(ร้อยละ)	ค่าความยืด ณ จุดสูงสุดของแผ่นแห้ง(ร้อยละ)
0.0	24.00[a]	3.02[a]
0.2	13.90[C]	2.62[a]
0.4	13.71[C]	1.84[bc]
0.6	13.44[C]	2.03[b]
0.8	15.75[b]	1.65[bc]
1.0	14.83[bc]	1.45[C]

*อักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบค่าความยืด ณ จุดสูงสุดแผ่นฟิล์มไคโตซานในลักษณะแผ่นเปียกและแผ่นแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ค่ามอดุลัสของยัง (Young's Modulus)

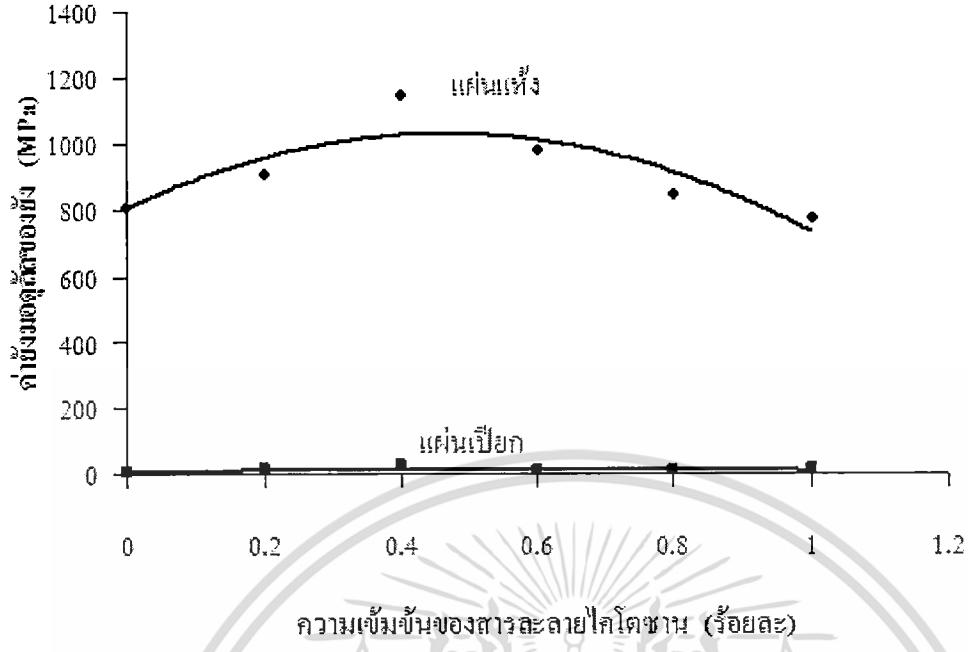
จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวที่เติมสารละลายไคโตซานในความเข้มข้นต่าง ๆ นำแผ่นฟิล์มที่ได้ทั้งลักษณะเปียกและลักษณะแห้งมาวัดค่ามอดุลัสของยัง พบว่า เมื่อเติมสารละลายไคโตซานลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแผ่นฟิล์มจะทำให้แผ่นฟิล์มที่ได้มีค่ามอดุลัสของยังเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่ไม่ได้เติมสารละลายไคโตซานซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม (control) โดยพบว่าแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกจะมีค่ามอดุลัสสูงสุดเมื่อใช้สารละลายไคโตซานร้อยละ 0.4 มีค่า 27.94 MPa เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานจะทำให้แผ่นฟิล์มมีค่ามอดุลัสของยังลดลง สำหรับแผ่นฟิล์มในลักษณะแห้งให้ผลทดสอบค่ามอดุลัสของยังมีแนวโน้มเช่นเดียวกับแผ่นเปียกโดยเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานร้อยละ 0.4 แผ่นฟิล์มจะมีค่ามอดุลัสของยัง 1,142.86 MPa เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มขึ้น ค่ามอดุลัสของยังของแผ่นแห้งจะลดลง แสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.5 ค่ามอดุลัสของยัง (Young's Modulus) ของแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ร้อยละ)	ค่ามอดุลัสของยังของแผ่นเปียก (MPa)	ค่ามอดุลัสของยัง ของแผ่นแห้ง (MPa)
0.0	4.67^{e}	793.29^{d}
0.2	18.01^{b}	907.13^{bc}
0.4	27.94^{a}	1142.86^{a}
0.6	8.67^{d}	988.91^{b}
0.8	12.95^{C}	845.20^{cd}
1.0	18.31^{b}	774.93^{d}

*อักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบค่ามอดุลัสของยังของแผ่นฟิล์มในลักษณะแผ่นเปียกและแผ่นแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว

จากการวัดคุณสมบัติเชิงกลเช่น ค่าความแข็งแรงดึง ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด และค่ามอดุลัสของยังของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ทั้งในลักษณะเปียกและลักษณะแห้ง พบว่า แผ่นฟิล์มในลักษณะแห้งมีค่าความแข็งแรงดึง และค่ามอดุลัสของยังสูงกว่าแผ่นฟิล์มในลักษณะเปียก จึงได้นำแผ่นฟิล์มลักษณะแห้งและใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ผสมในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จะได้แผ่นฟิล์มในลักษณะแห้งนี้มาใช้ในการศึกษาสมบัติต่างๆต่อไปเพื่อที่จะนำมาผลิตเป็นแผ่นฟิล์มปิดแผล

4.3 ศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของแบคทีเรียผ่านแผ่นฟิล์ม

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวและเติมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.4 มาผลิตแผ่นฟิล์มในลักษณะแห้งและนำมาทดสอบความสามารถในการซึมผ่านของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค พบว่าแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้ง 7 ชนิดไม่สามารถซึมผ่านแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ แสดงดังตารางที่ 4.6 อาจเนื่องมาจากแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้มีเส้นใยที่ละเอียดมากและประสานกันอย่างแน่นหนาทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถซึมผ่านไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลความสามารถในการซึมผ่านของแบคทีเรียผ่านแผ่นฟิล์ม

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค	ความสามารถในการซึมผ่านของแบคทีเรีย		
	แผ่นฟิล์มไคโตซาน	แผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย	แผ่นฟิล์มเซลลูโลสผสมกับไคโตซาน
Bacillus subtilis	×	×	×
*Pseudomona saeruginos*a	×	×	×
Escherichia coli	×	×	×
Serratia sp.	×	×	×
Staphylococcus aureus	×	×	×
Salmonella sp.	×	×	×
Micrococcus sp.	×	×	×

× หมายถึง ไม่สามารถซึมผ่านได้

√ หมายถึง สามารถซึมผ่านได้

4.4 ศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor permeability)

จากการนำแผ่นฟิล์มวัดความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำ พบว่า อัตราการซึมผ่านของไอน้ำที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 มีค่า 1,709 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน

4.5 ศึกษาการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (oxygen gas transmission rate)

นำแผ่นฟิล์มวัดความสามารถในการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน พบว่าอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 0 มีค่า 6,527 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการดำเนินงาน

จากการศึกษาการผลิตแผ่นฟิล์มเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียร่วมกับสารละลายไคโตซาน โดยการศึกษากระบวนการผลิตแผ่นฟิล์ม 2 วิธี วิธีการแรกโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและนำสารละลายไคโตซานมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในความเข้มข้นต่าง ๆ วิธีการที่สองโดยนำผงเซลลูโลสแห้งมาทำเป็น CMC จากนั้นนำสารละลาย CMC มาผสมในสารละลายไคโตซานในอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่า การผลิตแผ่นฟิล์มโดยวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและนำไคโตซานมาผสมอาหารเลี้ยงเชื้อในความเข้มข้นต่าง ๆ จะให้ลักษณะแผ่นฟิล์มที่ดีและมีความหนาพอที่จะนำมาผลิตแผ่นฟิล์มได้โดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานร้อยละ 0.4 จะดึงลดลงซึ่งการทดลองในแผ่นฟิล์มลักษณะแผ่นแห้งให้ผลการทดลองทำนองเดียวกับแผ่นเปียก แต่แผ่นแห้งจะมีค่าความแข็งแรงดึงสูงสุดเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เมื่อให้ความหนาของแผ่นเปียก 0.212 มิลลิเมตร ขณะที่ความหนาของแผ่นแห้งมีค่า 0.050 มิลลิเมตร สำหรับการผลิตแผ่นฟิล์มโดยวิธีการที่สองจะได้ลักษณะแผ่นฟิล์มที่ไม่ดี จึงไม่นำมาใช้ในการศึกษาต่อ

จากการศึกษาสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้จากการเติมสารละลายไคโตซานในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า แผ่นฟิล์มลักษณะเปียกมีค่าความแข็งแรงดึงสูงสุดเมื่อใช้ไคโตซานเข้มข้นร้อยละ 0.4 ถ้าใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานสูงกว่านี้จะทำให้แผ่นฟิล์มที่ได้มีค่าความแข็งแรงความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มขึ้นค่าความแข็งแรงดึงของแผ่นฟิล์มจะลดลง เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ค่าความแข็งแรงดึงของแผ่นฟิล์มในลักษณะแห้งเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จะมีค่าความแข็งแรงดึงสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ความเข้มข้นอื่น แต่ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม ขณะที่การใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ค่าความแข็งแรงดึงจะไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม

ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด พบว่า แผ่นฟิล์มทั้งในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งเมื่อผสมสารละลายไคโตซานในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้แผ่นฟิล์มที่ได้มีค่าการยืด ณ จุดสูงสุดลดลง เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ค่าการยืด ณ จุดสูงสุด เมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0 และ 0.2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.4 0.6 และ 0.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่ามอดุลัสของยัง พบว่า แผ่นฟิล์มทั้งในลักษณะเปียกและลักษณะแห้งจะมีค่าสูงเมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยแผ่นเปียกและแผ่นแห้งมีค่ามอดุลัสของยัง 27.94 MPa และ 1,142.86 MPa ตามลำดับ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มมากขึ้นค่ามอดุลัสของยังจะลดลง

เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ค่ามอดุลัสของยังของแผ่นฟิล์มในลักษณะแห้ง เมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.4 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.0 0.2 0.6 0.8 และ 1.0 นำแผ่นฟิล์มในลักษณะแห้งมาศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของแบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้ง 7 ชนิดไม่สามารถซึมผ่านแผ่นฟิล์มได้ จากการศึกษาความสามารถในการซึมผ่านไอน้ำพบว่า แผ่นฟิล์มมีอัตราการซึมผ่านไอน้ำที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 มีค่า 1,705 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน อัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 0 มีค่า 6,527 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการผลิตแผ่นฟิล์มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ควรเลี้ยงในตู้บ่ม (incubator) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ เพื่อจะได้ผลผลิตเซลลูโลสที่สม่ำเสมอ
2. การศึกษาแผ่นฟิล์มลักษณะแผ่นเปียก ควรควบคุมความชื้นในแผ่นฟิล์มให้คงที่
3. แบคทีเรียที่นำมาใช้ในการผลิตเซลลูโลสมีการกลายพันธุ์ได้ง่าย ควรศึกษาการเก็บรักษาเชื้อให้มีความคงตัวมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชิดชม ฮิรางะ. จุฬาลักษณ์ จารุนุช. กาญจนารัตน์ ทวีสุข. 2537. การผลิต carboxymethyl-chitin เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร.*วิทยาศาสตร์* ปีที่28 ฉบับที่2 หน้า 273-282 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิมพ์ทิพย์ โภชนะวิทย์. 2542. "การผลิตและคุณสมบัติของไคโตซานจากจุลินทรีย์." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545.ไคติน-ไคโตซานในประเทศไทย.*เมืองเกษตร* ปีที่13 ฉบับที่146 หน้า37-38

รัฐ พิชญากูร. 2544. "การตัดไคตินและไคโตซานโดยเอนไซม์." หน้า 41-51. *ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซาน จากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้*. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วราวุฒิ ครูส่ง. 2536. การยืดอายุความสดใสของกล้วยไข่โดยอาศัยการเคลือบผิวด้วยวุ้นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*. 19(2):42-49

Colvin M. R., Dennis J. Grab and Irukulla R., 1972. The intracellular pathway of newly formed rat liver catalase. *Journal of Biochemistry. 152(2) :496-501*

Geyer U., Heinze Th., A. Stein and D. KlemmS. Marsch and Schumann D., 1994. Schmauder Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. *Journal of bacteriology. 16(6): 343-347*

Hestrin, 1947. Systhesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum*. Nature. *Journal of bacteriology. 159:64-65*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Houston P., Schnell S., Philip K. M., McInerney D.and David J., 2002. Gavaghan Models for pattern formation in somitogenesis: a marriage of cellular and molecular biology. *Journal of Biochemistry 325(3): 179-189*

Jonas R. and Farah L.F. , 1998. Production and Application of Microbial Cellulose, Polymer Degradation and Stability. *Journal of bacteriology 59:101-106.*

Kamst E., Jaarsveld K.Z., Gijs A., Jacques H., Ben J. J. and Spaink P., 1999. Chemical synthesis of N-acetylglucosamine derivatives and their use as glycosyl acceptors by the *Mesorhizobium loti* chitin oligosaccharide synthase NodC *Crabohydrate Research. Journal of Biochemistry. 321(3-4): 176-189*

Khen T.A., Peh K.K., and Ch'ng, S., 2000. Mechanical, Bioadhesive strength and biological evolutions of chitosan film for wound dressing. *J. Pharm.Pharmaceut. Sci* (www.ualberta.ca/~csps) *3(3):303-311.*

Khen T.A., Peh K.K., 2003. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci* (www.ualberta.ca/~caps) *6(1):20-26.*

Kouda T., Nagata Y., Yano H.and Yoshinaga F., 2000. Method for cutivating apparatus for the production of bacterial cellulose in and aerated and agitated culture. Bio Polymer. *Applied Microbiology Biotechnology 57(1) : 321-328*

Kren R., Rajnochová E., Hunková Z., Dvoráková J. and Sedmera P., 1998. Unusual nonreducing sugar GlcNAcβ(1$\leftrightarrow$1)Manβ formation by β-*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae. Crabohydrate Research 39(52): 9777-9780*

Lapus MM., Gallardo EG. And Palo MA.,1967. The nata organism-cultural requirements, characteristics and identify. Phillippine. *J. Science. 96 : 91-109.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Long. M., Shin S., Shyong. J., Huang. R., 2001. The Fabrication and Characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci* 72 (2) : 326-329

Masaoka S., Ohe T. and Sakota N., 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum* . *Journal of bacteriology 75(1): 18-22*

Naritomi T., Kouda T., Yano H. and Yoshinaga F., 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of bacteriology 85 (1): 89-95*

Nichi J., Sugiyama M., Kohno M. and Ogura R., 1990. ESR study of the mechanism of lipid radical formation in epidermis exposed to ultraviolet light . *Journal of Biochemistry 9(1) :78*

Oikawa T., Ohtori T. and Ameyama M.,1995. Production of Cellulose from D-mannitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Biosci. Biotech. Biochem. 59(2):331-332*

Pharm J., Khan T., Peh K., and Ch'ng H., 2000. Mechanical Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing *J Pham Pharmacent 3(3) : 303-311*

Ramana V., John D., Doppalapudi B.and Adam G., 2000. The synthesis and evaluation of 3-substituted-7-(alkylidene)cephalosporin sulfones as β-lactamase inhibitors. *Journal of Biochemistry 10(9): 853-857*

Sashiwa H., Shigemasa Y.and Roy R., 2001. Chemical modification of chitosan 8: preparation of chitosan–dendrimer hybrids via short spacer. *Journal of Food Science. 47(2): 191-199*

Savidge G. F., Colombo M., Carnelli V., Gazengel C., Mannucci P. M., and Schimpf K., 2001 Transmision of non-A, non-B hepatitis by heat-treated factor VII concentrate. *Journal of Biochemistry 326(8445):s 1-4*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Seto A., Kojima Y. and Tonouchi N., 1994. Screening of Bacteria Cellulose-producing Acetobacter Strains Suitable for Sucrose as a Carbon Source. *Biosci. Biotech. Biochem. 61(4):735-736*

Shi X.-Y. and Tan T.W., 2002. Preparation of chitosan/ethycellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D_2 Biomaterials. *Journal of bacteriology 23:4469-4473.*

Srikumlaithong S.,Vicharnathakan P.,Laixuthai P.,Nakdee R.,Aiba S.,Shinagawa S., 1998. Production of chitosan from carapace of black tiger shrimp and its utilization for heavy metal adsorption. *Bangkok:TISTE,Res,Proj no 39-06 Rep no 2*

Tokuyasu K., Ono H., Mitsutomi M., Hayashi K. and Mori Y., 2000. Synthesis of a chitosan tetramer derivative, β-D-GlcNAc-(1β4)-β-D-GlcNAc- (1β4)- β-D-GlcNAc- (1β4) -D –GlcN through a partial N-acetylation reaction by chitin deacetylase. *Crabohydrate Research 325(3): 211-215*

Verschuren G., Thomas D., Cardona M. J., Nout R., and Johannes C., 2000. Location and limitation of cellulose production by *Acetobacter xylinum* established from oxygen profilese. *Journal of bacteriology 89(5): 414-419*

Wang S.L., and Chio S.H., 1998. Deproteinization of shrimp and crab shell with protease of *Pseudomonas aerginosa* K187. *Enzyme and Microbial Technology 22 : 629-633.*

Watanabe T., Akutsu Y., Hara T., Michihata T., Yamanaka H., Okazaki O., Kashida M., Hasegawa M., Harumi K. and Katagir T.,1995. Functional role of coronary collaterals with exercise in infarct-related myocardium . *Biosci. Biotech. Biochem 51(1): 47-55*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yoshinaga F.,Tonochi N. and Watanabe K.,1997. Research Progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its Application as a New Industrial Material. *Biosci.Biotech.Biochem. 61(2) : 219-224*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้