สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเซลลูโลสจากน้ำทิ้งโรงงานเต้าหู้โดยใช้เชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าและการนำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษ

โดย

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

RCH
TP
248 65
.C45
2164 ก
เลขหมู่.....
73031
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี 27 มิ.ย. 2550

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

งบประมาณประจำปี 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b.11967467
i.

หัวข้อโครงการวิจัย **การผลิตเซลลูโลสจากน้ำทิ้งโรงงานเต้าหู้โดยใช้เชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าและการนำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษ**

ผู้วิจัย **รศ. ดวงใจ โอชัยกุล**

บทคัดย่อ

การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 จากน้ำทิ้งที่ได้จากการผลิตเต้าหู้ภายใต้สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าเป็นเวลา 7 วัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมจากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง การใช้น้ำตาลฟรุกโตส เปปโตน และกรดซิตริก (เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ ตามลำดับ) ทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด 14.13 กรัมต่อลิตร ขณะที่การเลี้ยงเชื้อในสภาวะเขย่า การใช้น้ำตาลแมนิทอล ยีสต์สกัด และแมกนีเซียมซัลเฟต (เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ ตามลำดับ) ทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด 5.26 กรัมต่อลิตร

จากการเลี้ยง *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารเวย์ที่ได้จากการผลิตเต้าหู้แผ่น พบว่าให้ความหนาและผลผลิตเซลลูโลส 0.68 เซนติเมตร และ 0.778 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อค่อ 100มิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 6 ของการหมัก จากนั้นนำอาหารสูตรเวย์มาผสมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อผลิตกระดาษ พบว่าการใช้สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะให้ความหนาของแผ่นเซลลูโลสสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นอื่น (ร้อยละ 0.0 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตร) กระดาษที่ได้จะมีคุณสมบัติเชิงกลสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นอื่น ค่ามอดูลัสของยังเท่ากับ 2,107.67 MPa ค่าความแข็งแรงดึงเท่ากับ 56.18 MPa และค่าการยืด ณ จุดขาดเท่ากับร้อยละ 2.33 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถผ่านแผ่นกระดาษได้ กระดาษมีค่าอัตราการซึมผ่านของน้ำ 1,105 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน อัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนเท่ากับ 22,750 ลูกบาศก์เมตรต่อตารางเมตรต่อวัน ซึ่งสูงกว่ากระดาษที่ได้จากเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Project	**Bacterial Cellulose Production from Soybean Whey by *Acetobacter xylinum* TISTR 976 under Static Culture and Agitated Culture and Paper production from Bacterial Cellulose**
Researcher	**Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul**

ABSTRACT

Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* TISTR 976 in soybean whey which byproduct of soybean protein under static culture and agitate culturefor 7 days. The result showed that fructose, peptone and citric acid (carbon source, nitrogen source and minerals, respectively) were suitable for the production of cellulose in static culture. *A. xylinum* TISTR 976 produced yield of cellulose was 14.13 g/l whereas in agitate culture, manitol, yeast extract and magnesium sulfate (carbon source, nitrogen source and minerals, respectively) were optimized for production of cellulose. The yield of cellulose was 5.26 g/l.

A. xylinum TISTR 976 was cultured in whey medium, the result showed that whey medium gave the thickness and yield of cellulose were 0.68 cm. and 0.778 g/media 100 ml, respectively in 6^{th} day of fermentation. Whey medium was mixed with various chitosan concentrations to produce paper. It found that 0.2 %(v/v)chitosan concentrations gave the highest thickness of bacterial cellulose than other (0.0 0.4 0.6 0.8 and 1.0 %,v/v) The paper had the mechanical properties higher than another chitosan concentrations, the value of young's modulus was 2,107.67 MPa, Tensile strength value 56.18 MPa and value of stretching to the rip 2.33%. Pathogenic bacteria didn't penetration through the paper, water vapor permeability was 1,105 $g/m^2/day$ and oxygen permeability was 22,750 $dm^3/m^2/day$ which higher than paper from bacterial cellulose.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณประจำปี 2549 ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาทั้งปริญญาตรี และปริญญาโท ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนมาใช้ในการทดลอง

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Abstract	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	42
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	60
เอกสารอ้างอิง	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

Acetobacter xylinum เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสออกมานอกเซลล์ เซลลูโลสดังกล่าวเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ของน้ำตาลกลูโคส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1 – 4 กลูโคซิดิก ($\beta 1 \rightarrow 4$ glucosidic bond) และอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีลักษณะคล้ายแผ่นวุ้นสีขาว เรียกว่า gelatinous membrane หรือ pellicle หรือแบคทีเรียเซลลูโลส (bacterial cellulose) ลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว (Brown, 1886) การสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อเกิดขึ้นเนื่องจาก เชื้อต้องการอากาศจึงลอยตัวอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลว เพื่อรับออกซิเจนให้ได้มากที่สุด (Schramn and Hestrin, 1954) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อบางชนิดต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) ก็สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้เช่นกัน (Cook and Colvin, 1980) โดยเฉพาะเซลลูโลสที่สร้างโดย Acetobacter พบว่ามีความบริสุทธิ์ทางเคมีโดยปราศจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลส

กลไกการสร้างเส้นใยเล็กๆ ที่ก่อเกิดเป็นเซลลูโลสในแบคทีเรียและปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์มีความแตกต่างด้านโครงสร้างของเซลลูโลสที่พบในพืช (Yamanaka et al. 1989; Ross et al. 1991) เซลลูโลสที่ได้จากการสังเคราะห์โดยแบคทีเรีย มีการสร้าง 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกกลูโคสในรูปของโมเลกุลอิสระเข้าไปภายในเซลล์และรวมตัวกันเป็นสารตั้งต้น คือโพลีกลูโคแซน โดยสารเหล่านี้จะถูกส่งผ่านออกมาภายนอกเซลล์ ขั้นที่สอง คือ สารโพลีเมอร์เหล่านี้จะรวมตัวกันทำให้เกิดเส้นใยขนาดเล็กๆ (microfibril) เมื่อมีจำนวนมากจะมีความแข็งแรงมากขึ้นเซลลูโลสที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นเมือกและเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (Colvin et al. 1977)

แบคทีเรียจะสร้างเซลลูโลสออกมาเป็นสายยาวประมาณครั้งละ 12 – 70 โมเลกุล สายเซลลูโลสที่สร้างออกมาจะลงไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและประสานกับสายเซลลูโลสอันอื่นๆ ด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) จะได้เส้นใยขนาดเล็ก เรียกว่า ไฟบริล (fibril) ไฟบริลเหล่านี้มีคุณภาพเหนือกว่าไฟบริลของพืช เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวขนานกันอย่างเป็นระเบียบ (crystalline structures) ซึ่งทำให้เซลลูโลสจากแบคทีเรียมีคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ความความต้านทานแรงดึงขาด (Tensile strength) ความต้านทานแรงดันทะลุ (Barsting strength) และค่าอื่นๆ มีค่าสูง ไฟบริลของเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กมาก ประมาณ 0.01 ไมครอน ซึ่งเล็กเป็น 300 เท่า เมื่อเทียบกับเส้นใยของไม้หรือพืชชนิดอื่นๆ ทั่วไป (Yamanaka et al., 1989) และไฟบริลของเซลลูโลสจากแบคทีเรียประสานกันจนคล้ายร่างแห จึงมีคุณสมบัติอุ้มน้ำไว้ได้มากเกินกว่าที่เส้นใยของพืชอื่นๆ จะทำได้ (Johnson, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yamanaka และคณะ (1989) ศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลส โดยใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* พบว่ากระดาษที่ได้มีค่า Young's modulus สูงกว่า 15 GPa ซึ่งแสดงว่าโมเลกุลเซลลูโลสจับตัวกันแน่นมาก ทำให้กระดาษที่ได้มีความแข็งแรง

มีการทดลองต่างๆ มากมายในการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย เช่น น้ำมะพร้าวแก่ กากสับปะรด กากน้ำตาล และน้ำซาวข้าว (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2542; ศิริพงษ์ เปรมจิต, 2542) ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้จะใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในอาหารในการเจริญเติบโต และสร้างเซลลูโลสขึ้นมาสำหรับน้ำทิ้งที่ได้จากกระบวนการผลิตเต้าหู้ ก็เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลส ในปัจจุบันนี้คนไทยนิยมบริโภคเต้าหู้กันมากขึ้น เนื่องจากเต้าหู้เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ ราคาถูก และสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายรูปแบบทำให้มีโรงงานผลิตเต้าหู้เพิ่มมากขึ้น และจากการศึกษาพบว่าน้ำส่วนที่เหลือจากการอัดเต้าหู้ให้เป็นก้อนจะมีปริมาณของแข็งร้อยละ 1.5 โดยมีน้ำตาล (saccharides) ร้อยละ 0.97 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.32 และน้ำส่วนนี้มีความเป็นกรด-ด่าง 4.5 (Ma, 2000) จากการผลิตเต้าหู้ 1 ตัน จะมีปริมาณน้ำส่วนที่เหลือและปล่อยออกมา 10 ตัน ซึ่งถ้าปล่อยน้ำส่วนนี้ออกไปสู่สิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดมลภาวะ งานวิจัยนี้จึงได้สนใจนำน้ำส่วนนี้ซึ่งถือว่าเป็นน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้มาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อผลิตเซลลูโลสโดยเลี้ยงในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าเปรียบเทียบกัน รวมทั้งนำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษและศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของกระดาษที่ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งโรงงานเต้าหู้ เช่น ปริมาณโปรตีน น้ำตาลแลคโตส ความเป็นกรด-ด่าง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *A.xylinum* TISTR 976 ในน้ำทิ้งโรงงานเต้าหู้ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าเปรียบเทียบกัน เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุบางชนิด
3. ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2 เปรียบเทียบผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า
4. นำเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งมาผลิตกระดาษ และศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของกระดาษที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในน้ำทิ้งโรงงานเต้าหู้ทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุบางชนิด และนำเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งมาผลิตกระดาษ และศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของกระดาษที่ได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเต้าหู้มาผลิตเซลลูโลสได้ โดยนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย และนำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่เกิดจากการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ ซึ่งนอกจากจะเป็นการนำของเหลือทิ้งกลับมาใช้ให้เป็นประโยชน์ ยังสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

น้ำทิ้งจากการอัดให้เป็นก้อนของการผลิตเต้าหู้ จะมีสารอาหารซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ในปริมาณมาก ถ้าปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ จะก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำได้ การนำไปใช้ประโยชน์โดยผลิตเป็นวุ้นมะพร้าว ด้วยเชื้อ *Acetobacter xylinum*

วุ้นมะพร้าวมีชื่อเรียกหลายอย่างเช่น วุ้นสวรรค์ วุ้นน้ำส้ม หรือเห็ดรัสเซีย หากผลิตจาก น้ำมะพร้าว ภาษาฟิลิปปินส์เรียกว่า " Nata de coco " (สมคิด, 2531) แต่หากผลิตจากสับปะรด เรียกว่า " Nata de pina " และถ้าเป็นน้ำทิ้งจากโรงงานเต้าหู้เรียกว่า " Nata de soya "โดยคำว่า Nata เป็นคำในภาษาสเปน ที่ถ่ายทอดมาจากคำในภาษาละตินคือ Natare ซึ่งหมายถึง ลักษณะที่ลอยได้ (อัจฉรา, 2536) ส่วนใน Encylopedia Universal Illustrada ได้ให้ความหมายของ nata ว่า เป็นวัตถุหนาจากบางส่วนของของเหลวโดยจะลอยอยู่เหนือของเหลวนั้น ดังนั้นจึงนำคำว่า nata มาใช้เรียกแผ่นของกลุ่มวุ้นที่เกาะอยู่บริเวณผิวหน้าของสารละลายที่มีน้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลทรายหรือน้ำตาลอ้อย (อัจฉรา, 2536) ต่อมาได้มีการให้ความหมายของ nata ในอีกแง่หนึ่งคือ เป็นเนื้อเยื่อของตัวเซลล์และสายของโมเลกุลน้ำตาล ลักษณะเป็นแผ่นหนามีสีขาวหรือครีมไม่ละลายน้ำเป็นแผ่นวุ้นที่เซลล์ *Acetobacter xylinum* สร้างขึ้นที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกรด น้ำตาล เอทิลแอลกอฮอล์และสารอาหารอื่นๆ ลักษณะของวุ้นมะพร้าวคล้ายวุ้นที่ทำขนมแต่เหนียวกว่ามีลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน โดยวุ้นธรรมดาประกอบด้วยน้ำตาลกาแล็กโตส และ 3,6-anhydrogalactose ต่อกันด้วยพันธะ β(1-4) หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสและแข็งตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ทิพรัตน์, 2535) แต่วุ้นมะพร้าวมีองค์ประกอบเป็นพวกเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ ต่อกันด้วยพันธะ β(1-4) มีคุณสมบัติทางเคมีอื่นๆ เหมือนเซลลูโลสที่ได้จากฝ้าย เช่นเมื่อต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ก็ไม่สามารถละลายน้ำได้

จากการศึกษาการเจริญของวุ้นในน้ำมะพร้าวและในน้ำผลไม้พบว่าเซลลูโลสสามารถดูดซับน้ำได้ประมาณร้อยละ 90 จากลักษณะทางกายภาพของชิ้นวุ้นสดและจากรายงานที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่ผลิตวุ้นมะพร้าว นำไปสู่การศึกษาเซลลูโลสทางด้านเคมี เช่น ความสามารถในการละลายและการทดสอบทางด้าน X- ray spectrometer และ Infrared spectrometer ซึ่งผลการทดสอบทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่าส่วนที่เป็นของแข็งของวุ้น คือ เซลลูโลส (อัจฉรา, 2536)

การทดสอบทางเคมีโดยทั่วไปและทางกายภาพในเชิงคุณภาพ พบว่าวุ้นมะพร้าว นี้คือเซลลูโลสตามธรรมชาตินั่นเอง ทั้งนี้เพราะเซลลูโลสสามารถทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกและสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโอดีนได้ สามารถละลายได้ในตัวทำละลายเซลลูโลส กรด และ เอนไซม์สามารถย่อยสลายได้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลกลูโคส (อัจฉรา, 2536)

การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว พบว่าน้ำมะพร้าวที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นจะต้องเป็นน้ำมะพร้าวแก่ที่สดและใหม่ มีไขมันน้อยในปริมาณร้อยละ 10-20 (โดยปริมาตร) ปรับสภาวะให้มีค่าความเป็นกรด 4-5 โดยใช้กรด อะซิติก และมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอ มีการเติมน้ำตาล และสารประกอบไนโตรเจน โดยน้ำตาล ได้แก่ กาแลคโตส เด็กซ์โตส แลคโตส และมอลโตส ใส่ในปริมาณร้อยละ 5-8 น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนให้เชื้อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต ใส่ในปริมาณร้อยละ 0.5-0.6 น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเร่งให้เชื้อผลิตแผ่นวุ้นเซลลูโลสได้หนาในระยะเวลาอันสั้น ถ้าใส่ในปริมาณมากจะทำให้ผลผลิตลดลง

ปริมาณเซลลูโลสในวุ้นน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้น แต่จะเริ่มคงที่เมื่อเวลาในการหมัก 10 วัน โดยมีปริมาณเซลลูโลสในแผ่นวุ้นเซลลูโลส เป็นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนัก และความหนาของแผ่นวุ้นเซลลูโลสเป็น 10 มิลลิเมตร

ส่วนประกอบของวุ้นน้ำมะพร้าว จากการศึกษาถึงส่วนประกอบของวุ้นน้ำมะพร้าวจากเชื้อ *A.xylinum* (ตารางที่1) พบว่าสารประกอบส่วนใหญ่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต และเมื่อนำมาวิเคราะห์ถึงชนิดของคาร์โบไฮเดรตพบว่าเป็นเซลลูโลส คิดเป็นองค์ประกอบร้อยละ 95-97 ของของแข็งทั้งหมด เซลลูโลสในวุ้นน้ำมะพร้าวมีโครงสร้างแบบเดียวกับเซลลูโลสในพืชแต่เส้นใยจะมีขนาดเล็ก ละเอียด (Microfibril) ไม่มีลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเพคตินปะปนทำให้สามารถแยกเซลลูโลสบริสุทธิ์ออกจากวุ้นน้ำมะพร้าวได้ง่าย

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของวุ้นน้ำมะพร้าว

ผลการวิเคราะห์โดย				
	Araceli	วิทยาศาสตร์บริการ	กองเกษตรเคมี	
น้ำ	67.7	94.4	94.6	เปอร์เซ็นต์
ไขมัน	0.2	0.05	0.06	”
ไฟเบอร์	-	1.10	1.15	”
โปรตีน	nil	0.68	0.84	”
เถ้า	-	0.77	0.10	”
คาร์โบไฮเดรต	-	3.00	3.20	มิลลิกรัม/100กรัม
แคลเซียม	12	3.45	5.20	”
เหล็ก	5	0.02	-	”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอสฟอรัส	2	22.0	5.70	”
วิตามินบี 1	Trace	0.01	-	”
วิตามินบี 2	0.01	0.02	-	”
ไนอาซีน	-	0.22	0.22	”

ที่มา : (สมคิด , 2529, 2530)

คุณค่าทางโภชนาการของวุ้นมะพร้าวจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อทำการยืดอายุด้วยวิตามิน และ เกลือแร่บางชนิด : (มิลลิกรัม / 100 กรัม) ไนอะซิน 7.522 ไรโบฟลาวิน 0.3682 ไทอะมีน 0.6443 กรดแอสคอร์บิก 27.67 แคลเซียม 62.86 ฟอสฟอรัส 9.14 สารอาหารที่ช่วยยืดอายุนี้จะทำให้สามารถเก็บวุ้นนี้ได้ที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิตู้เย็น (เชิดชัย และคณะ 2535)

คุณลักษณะที่ดีของวุ้นมะพร้าวจะต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ

1. วุ้นจะต้องมีสีขาว หรือสีครีม
2. แผ่นเนื้อหนา เหนียว และนุ่ม ไม่มีเส้นใย หรือมีเพียงเล็กน้อย

การที่จะได้มาซึ่งวุ้นที่มีประสิทธิภาพที่ดีดังกล่าว จะต้องมีการควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้

2.1 กระบวนการผลิตเต้าหู้

การผลิตเต้าหู้ในประเทศไทยมีปริมาณสูงขึ้นทุกปี เนื่องจากคนไทยนิยมบริโภคเต้าหู้กันมาก ไม่ว่าจะเป็นกลุ่มคนมีรายได้ต่ำหรือรายได้สูง ทั้งนี้เพราะเต้าหู้เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการราคาถูก และสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายรูปแบบ ปัจจุบันมีโรงงานผลิตเต้าหู้มากมายในบ้านเรา แต่ยังคงเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็ก

ขั้นตอนการผลิตเต้าหู้จะคล้ายการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง ขั้นตอนการผลิตมีดังนี้คือ คัดเลือกถั่วเหลืองที่มีคุณภาพ โดยเลือกถั่วที่ใหม่มาแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิห้องเล็กน้อยประมาณ 20-22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือค้างหนึ่งคืน จะส่งผลให้ถั่วเหลืองมีลักษณะนิ่มตัวดีและน้ำหนักจะเพิ่มขึ้น จากนั้นนำมาบดโดยผสมกับน้ำในอัตราที่เหมาะสม กล่าวคือ ถ้าใส่น้ำมากทำให้ได้โปรตีนในช่วงสกัดน้อยลง และเป็นผลให้เต้าหู้มีเนื้อหยาบ อัตราส่วนของถั่วต่อน้ำที่พอเหมาะ คือ น้ำต่อถั่วเท่ากับ 10 : 1 หรือ น้ำ 1 ลิตรต่อถั่วเหลือง 1 ขีด (ถั่วเมล็ดแห้ง) นำมากรองเอากากถั่วเหลืองออกจะได้น้ำเต้าหู้ออกมา จากนั้นใส่สารตกตะกอน เช่น Calcium Sulfate ($CaSO_4.H_2O$), Magnesium Sulfate ($MgSO_4$), Glucono Delta Lactone (GDL) เป็นต้น ซึ่งในกระบวนการผลิตช่วงนี้จะมีน้ำเหลือทิ้งจากการอัดให้เป็นก้อน น้ำที่ได้จากขั้นนี้จะนำไปใช้ในการศึกษาการผลิตวุ้นมะพร้าวส่วนโปรตีนจะตกตะกอนเป็นก้อนเต้าหู้ นำไปบรรจุหีบห่อและปิดผนึก หลังจากได้บรรจุเต้าหู้ใส่หีบห่อแล้ว จะนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เต้าหู้ที่ได้ไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40-60 นาที และทำให้เย็น ส่งขายตามท้องตลาด กรรมวิธีผลิตเต้าหู้ (แสดงไว้ในภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการผลิตเต้าหู้

ที่มา :(สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์นอกเหนือจากเฮมิเซลลูโลส เพคติน และลิกนิน พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วๆไปโดยเฉพาะในเซลล์พืชต่างๆและมีปริมาณที่แตกต่างกันตามชนิด อายุ และส่วนต่างๆกันของพืช พบมากในผัก ผลไม้ ธัญพืช (วิภาและคณะ 2541) ไม้เนื้ออ่อน หรือไม้ใบยาว เช่น สน 2 ใบ สน 3 ใบ ไม้เนื้อแข็ง หรือไม้ใยสั้น เช่น สนยูคาลิปตัส ซึ่งในต่างประเทศจะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสคุณภาพสูงและพืชที่ไม่ใช่ไม้ เช่น ฝ้าย ปอ นอกจากนี้ อะมีบา ราเมือก สาหร่ายทะเล และเชื้อ *Acetobacter* ก็สามารถผลิตเซลลูโลสจำนวนมากได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุที่เหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น หญ้า ฟางข้าว กากอ้อย สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสได้ (กองวิจัย, 2531)

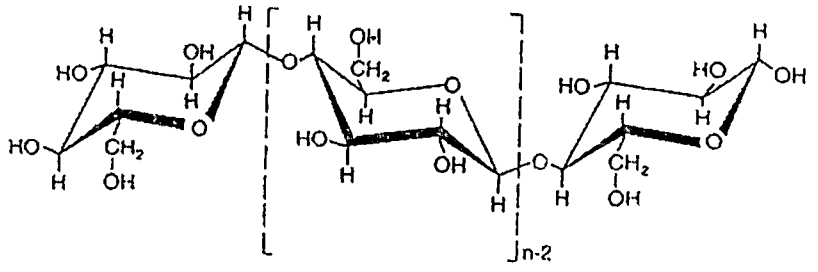
เซลลูโลสเป็นพอลีแซคคาร์ไรด์ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วย D-glucose หลายๆหน่วย ตั้งแต่ 15 ถึง 40,000 หน่วยมาต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glucosidic bond เป็นพอลีเมอร์ แต่ละหน่วยย่อยของเซลลูโลส เรียกว่า anhydroglucose มีสูตรทางเคมี คือ $C_6H_{12}O_5$ ในแต่ละ anhydroglucose มีอนุมูล OH 3 หมู่ ซึ่ งอนุมูลเหล่านี้จะเป็นตัวที่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นให้เกิดเป็นอนุพันธ์ และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 1,500,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา โดยทั่วไปสามารถพบเซลลูโลสในลักษณะเป็นสารประกอบ ส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในพืชสามารถนำมาสกัดเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ได้ นอกจากนี้ยังพบในสิ่งที่มีชีวิตอื่นๆ เช่น รา สาหร่าย และแบคทีเรีย พันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลทำให้เซลลูโลสในธรรมชาติสามารถคงรูปอยู่ได้ (Ross; et. al. 1991) รูปโครงสร้างมีการจัดเรียงตัวในลักษณะแบบขนาน (parallel) จนกลายเป็นผลึก

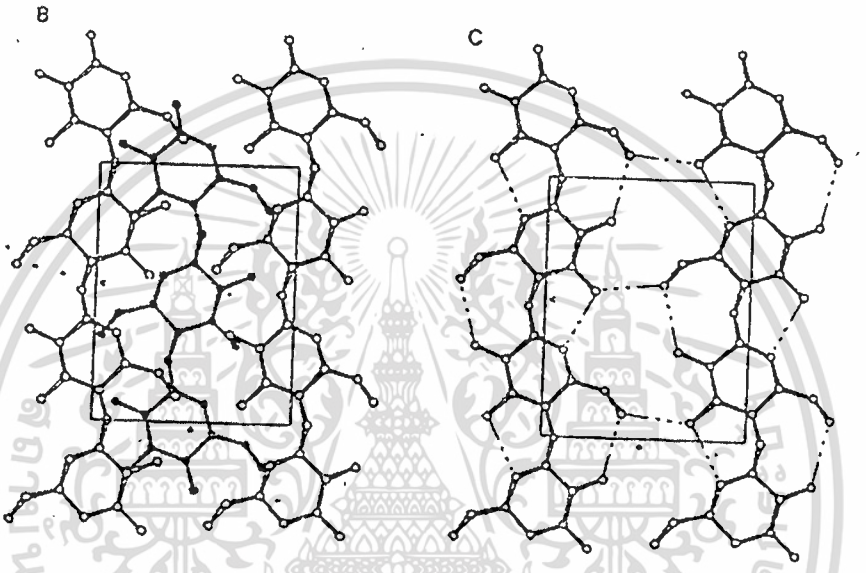
<u>การจัดเรียงตัวทำให้เกิดโครงสร้างของเส้นใย</u>

ในระดับ super molecular structure โดยส่วนที่เป็น crystalline micelles มีการจัดเรียง โมเลกุลอย่างเป็นระเบียบล้อมรอบอยู่ในตาข่ายของส่วนที่เป็นอสัณฐาน ซึ่งมีการจัดเรียงโมเลกุลไม่เป็นระเบียบ

เมื่อนำโมเลกุลของเซลลูโลสไปศึกษาโครงสร้างและการจัดเรียงตัวโดย electron microscope และ X-ray diffraction ดังแสดงภาพที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

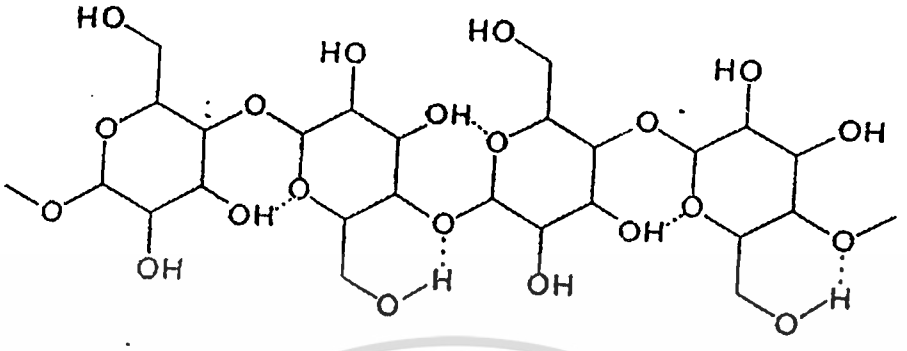




ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างและการจัดเรียงโมเลกุลของเซลลูโลส
ที่มา : (Ross; et. al.1991)

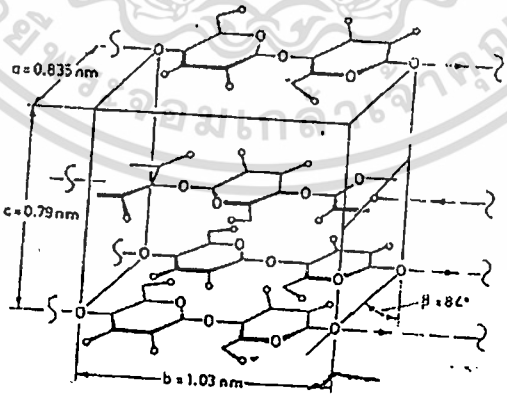
จากการจัดเรียงตัวแสดงว่ามีการเชื่อมโยงโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจน คือ กลุ่มของ ไฮดรอกซิลบนอะตอมคาร์บอนตัวที่ 3 (o-3) กับอะตอมของออกซิเจน pyronosring ตัวที่ 5 (o-5) ของหน่วยกลูโคสข้างเคียง และพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะตอมไฮโดรเจนของกลุ่ม (o-4) ไฮดรอกซิล บนอะตอมคาร์บอนตัวที่ 6 (o-6) ของหน่วยกลูโคสข้างเคียง (ดังแสดงภาพที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แสดงการเชื่อมโยงโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจน
ที่มา : (Belitz and Grosch 1999)

พันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลจะทำให้สายโซ่ของเซลลูโลสยึดตรงและเกิดโครงสร้าง Two-fold screw axis ทำให้มีความเสถียรสูง ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสในธรรมชาติ คงรูป นอกจากนี้พันธะไฮโดรเจนยังทำให้สายโซ่มีการจัดเรียงในลักษณะ parallel จนกลายเป็นผลึก ซึ่งการจัดเรียงตัวเช่นนี้ทำให้เกิดโครงสร้างของเซลลูโลสในระดับ super molecular structure (ดังแสดงภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงการจัดเรียงตัวโครงสร้างของเซลลูโลส
ที่มา : (Belitz and Grosch 1999)

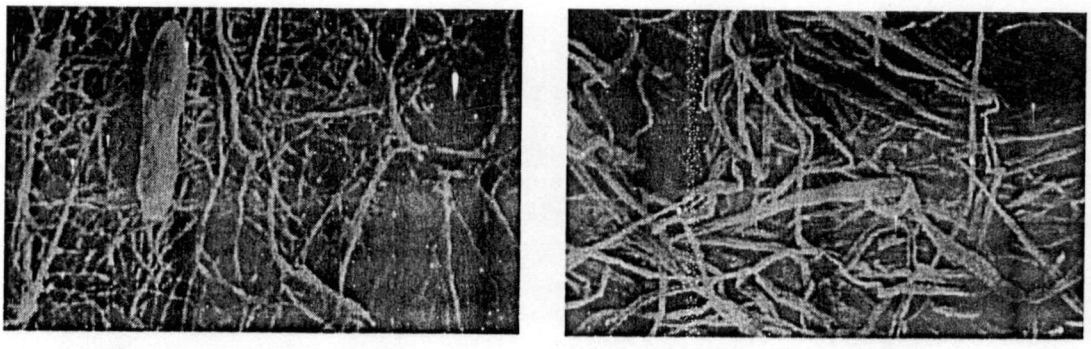
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิภา และคณะ (2541) ได้นำกากของดอกกระเจี๊ยบและเปลือกถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรมาทำให้บริสุทธิ์ และผลิตเป็นเซลลูโลสผง โดยผลการทดลองพบว่า การสกัดด้วยสารละลายด่าง (NaOH) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 และ 7 ภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจนจะได้ปริมาณผลิตภัณฑ์จากเปลือกถั่วเหลืองและกากดอกกระเจี๊ยบคิดเป็น ร้อยละ 39.16 และ 26.07 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบลักษณะผงของเซลลูโลสโดยใช้เทคนิค SEM พบว่าเซลลูโลสที่ได้จากกากถั่วเหลืองส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ผิวหน้าค่อนข้างเรียบ มีรูพรุนเล็กน้อย ส่วนเซลลูโลสที่ได้จากดอกกระเจี๊ยบมีรูปทรงไม่แน่นอนและมีรูพรุนมาก ซึ่งนำไปใช้เป็นข้อมูลในการผลิตเซลลูโลสบริสุทธิ์สำหรับการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร และนำไปใช้ประโยชน์ในงานอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ปัจจุบันพบว่าวัสดุที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลสมีความจำกัดและขึ้นอยู่กับสภาพดินฟ้าอากาศของแต่ละปี และยังมีการทำลายป่าเพิ่มขึ้น จึงทำให้วัตถุดิบที่จะใช้ในการสกัดลดลงจึงได้มีการศึกษาหาสิ่งทดแทนวัสดุที่สกัดจากพืช ปัจจุบันได้มีการศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากจุลินทรีย์ ซึ่งแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจอย่างมาก และเรียกแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตเซลลูโลสได้นี้ว่า แบคทีเรียเซลลูโลส มีการศึกษากันอย่างขว้างขวางเพื่อทดแทนการสกัดเซลลูโลสจากพืชและนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ให้มากขึ้น

เซลลูโลสจัดเป็นใยอาหารชนิดหนึ่งที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble dietary fiber, IDF) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ไม่ละลายในด่างและตัวทำลาย (Deveries and Reinhold, 1992) ส่วนเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ แต่จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่เพียงเล็กน้อย จัดได้ว่าเป็นประโยชน์ต่อร่างกายและเป็นแหล่งอาหารที่ไม่ให้พลังงานแต่เพิ่มกากอาหาร (ศศิเกษม และพรรณี. 2530; ประภาศรี, 2532) ผลจากการศึกษาค้นคว้ายังเชื่อว่าเซลลูโลสจะช่วยดูดซึมสารก่อมะเร็ง (carcinogens) และช่วยป้องกันการดูดซึมของน้ำตาลกลับเข้าสู่ร่างกายได้ (สันทนา, 2537)

ปัจจุบันพบว่าได้มีการนำเซลลูโลสจากเชื้อมาใช้ประโยชน์กันมากขึ้น ไมโครไฟบริลของเซลลูโลสที่พบจากแหล่งต่างๆมีขนาดแตกต่างกัน โดยเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อมีขนาดประมาณ 2 ไมโครเมตรและเซลลูโลสที่ได้จากพืชมีขนาดประมาณ 200 ไมโครเมตร (ดังแสดงในภาพที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียและพืช (Bacterial cellulose and plant cellulose)

สำหรับการนำเอาเซลลูโลสมาใช้ในอาหารนั้นส่วนใหญ่อยู่ในรูปของอนุพันธ์ เช่น Carboxymethyl Cellulose (CMC), Methyl Cellulose (MC), Hydroxy Propyl Methyl Cellulose (HPMC) และ MicroCrytalene Cellulose (MCC) (Pomeranz, 1991:569) ประจุลบของหมู่คาร์บอกซิล และลักษณะของหมู่แทนที่ จะมีผลต่อการละลายของโมเลกุลเซลลูโลส การใช้ CMC มีวัตถุประสงค์หลายอย่าง เช่น เป็นสารข้นหนืด และใช้ทำให้สารละลายใส นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการล้อมรอบน้ำและเพิ่มความหนืดอย่างรวดเร็ว ความหนืดของ CMC ส่วนหนึ่งเกิดจากแรงผลักระหว่างประจุลบดังนั้นภายใต้สภาวะซึ่งประจุถูกทำให้เป็นกลางในรูปของเกลือ และกรดจะไม่ได้รับการยอมรับเพราะทำให้ความหนืดลดลง อนุพันธ์ของเซลลูโลสบางครั้งใช้เป็นสารข้นหนืด แต่ก็มีความสามารถในการสร้างเจลเมื่อโดนความร้อน จากคุณสมบัตินี้จะถูกนำไปใช้ในเนย และใช้ห่อหุ้มเพื่อดูดซับไขมันขณะทอด CMCถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาหลายปี สาเหตุเริ่มต้นที่ทำให้ได้รับความนิยม เนื่องจากนำมาใช้เป็นสารทดแทนไขมันร่วมกับ ไฮโดรคอลลอยด์ชนิดอื่น (เบ็ญจรัก, 2543)

ณรงค์ (2538) กล่าวว่าคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสมีหลายรูปแบบมีน้ำหนักโมเลกุลและกลุ่มที่เกาะติดแตกต่างกัน เมื่อละลายน้ำจะให้สารละลายแบบ non-Newtonian มีความหนืดลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และอยู่ตัวดีเมื่อมีพีเอชระหว่าง 5-10 โดยจะอยู่ตัวดีที่สุดที่พีเอช 7-9 ทำปฏิกิริยากับอนุมูลบวกที่มีประจุเดียวให้เกลือที่ละลายน้ำได้ แต่จะขุ่นเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลบวกที่มีประจุเท่ากับสอง และจะเกิดเจลหรือตกตะกอนเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลบวกที่มีประจุเท่ากับสาม เมื่ออยู่ในอาหารจะช่วยให้โปรตีนละลายน้ำได้ดีขึ้นซึ่งมีผลให้ความหนืดเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 แบคทีเรียเซลลูโลส

ในปี 1886 Brown พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเซลลูโลสได้ ซึ่งจะสร้างเนื้อเยื่อที่มีความแข็งเมื่อเลี้ยงให้เจริญในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่มาก เขาพบว่าเยื่อเหนียวสามารถละลายได้ใน ammonium copper hydroxide และให้น้ำตาลรีดิวซ์ เนื่องจากเขาพบว่าในฝ้ายก็สามารถเกิดสารเหล่านี้เช่นกันและเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Bacterial Cellulose (BC) Producer ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Acetobacter, Achromobacter, Aerobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Azotobacter, Pseudomonas, Rhizobium* และ *Sarcina* (Deinema and Zevenhuizen 1971) โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลส (cellulose microfibril) ออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวและเจริญบนผิวหน้าอาหารมีการสร้างเส้นใยสีขาว (pellicle) ซึ่งประกอบกันเป็นเซลลูโลสในระหว่างที่มีการเจริญของเชื้อจะมีการสร้างเส้นใยไปพร้อมๆกัน เมื่อระยะเวลาการเจริญนานขึ้นก็จะมีปริมาณมากขึ้นจะสานและรวมตัวกันเป็นเส้นสายขุ่นขาวอยู่ในอาหารเหลวและจะค่อยๆ ลอยขึ้นสู่ผิวหน้าอาหาร เมื่ออยู่ที่ผิวหน้าอาหารเหลวจะเริ่มสานกันแน่นขึ้นเป็นแผ่นวุ้นมีลักษณะขุ่นมีความเหนียว ทั้งนี้ได้สันนิษฐานว่าการสร้างแผ่นวุ้นของเชื้อที่เกิดขึ้นนั้นเนื่องจากเชื้อที่ต้องการอากาศสามารถลอยตัวอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวได้เพื่อรับออกซิเจนให้ได้มากที่สุด (Schramn and Hestrin 1954) นอกจากนี้ยังพบว่ามีบางชนิดที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) ก็สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้เช่นกัน (Cook and Colvin 1980) โดยเฉพาะเซลลูโลสที่สร้างโดย *Acetobacter* นั้น พบว่ามีความบริสุทธิ์ทางเคมีโดยปราศจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลส

กลไกการสร้างเส้นใยเล็กๆที่ก่อเกิดเป็นเซลลูโลสในแบคทีเรียเซลลูโลสและปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์มีความแตกต่างด้านโครงสร้างของเซลลูโลสที่พบในพืช (Yamanaka ;et. al. 1989 ; Ross; et. al. 1991) เซลลูโลสที่ได้จากการสังเคราะห์โดยแบคทีเรียมีการสร้าง 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกกลูโคสในรูปของโมเลกุลอิสระเข้าไปภายในเซลล์และรวมตัวกันเป็นสารตั้งต้น คือพอลีกลูโคแซน โดยสารนี้จะถูกส่งผ่านออกมาภายนอกเซลล์ ขั้นที่สอง คือ สารพอลีเมอร์เหล่านี้จะรวมตัวกันทำให้เกิดเส้นใยขนาดเล็กๆ (microfibril) เมื่อมีจำนวนมากจะมีความแข็งแรงมากขึ้นเซลลูโลสที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นเมือกและเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (Colvin ; et. al. 1977)

กรรมวิธีในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลสส่วนใหญ่มักจะใช้การหมักแบบกะหรือในสภาพนิ่งและนำเส้นใยที่สร้างได้นั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

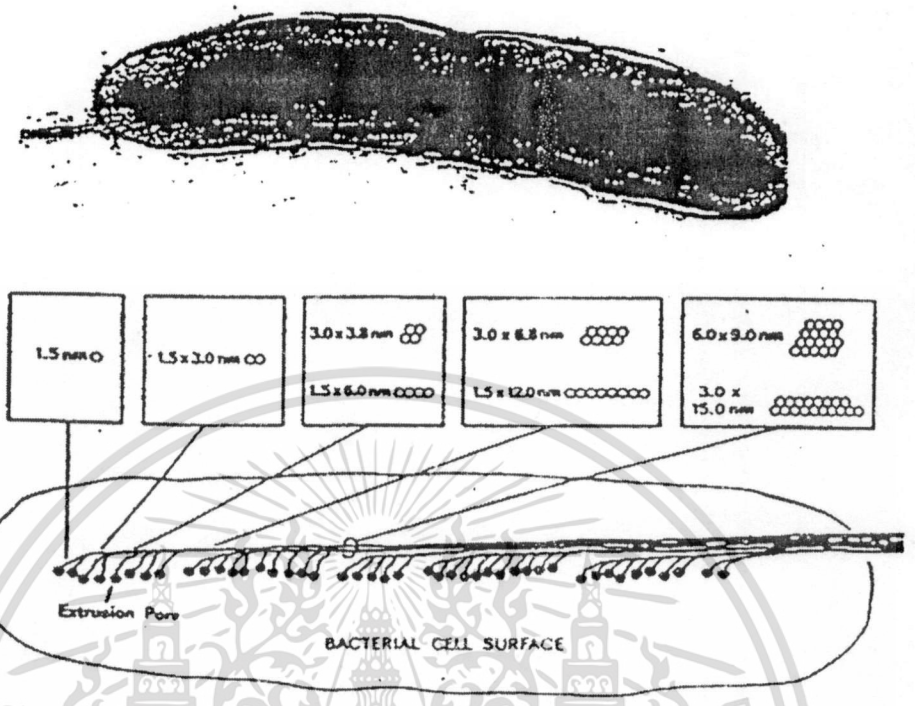
เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียเซลลูโลสจะใช้เชื้อ *Acetobacter* เป็นตัวแทนในการศึกษาการสร้างเซลลูโลส และเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ปริมาณมาก สามารถพบได้ทั่วไปจากแหล่งต่างๆ เช่น บนผักและผลไม้ ไวน์ น้ำผลไม้ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Krieg and Holt 1984) ผลไม้เน่าเสีย (rolting) เช่น มะม่วง ฝรั่ง สับปะรด ละมุด (Lapuz; et. al. 1967) ดอกไม้ ถั่ว ดิน(Seto; et. al. 1997 ; Toyosaki ; et. al. 1995) อ้อย (Coronel and Joson 1986) น้ำผึ้ง นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อได้จากน้ำเสีย (activated sluge) (Dienema and Zevenhuizen 1971)

ในปี 1861 ชาวฟิลิปปินส์ได้นำเชื้อแบคทีเรียมาหมักในน้ำมะพร้าว น้ำผลไม้ ซึ่งได้แก่ น้ำสับปะรด และตั้งทิ้งไว้จนเกิดแผ่นวุ้นหรือเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นเยื่อเหนียวมีลักษณะพิเศษ และเรียกเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในน้ำมะพร้าวว่า nata de coco ส่วนเซลลูโลสที่ได้จากการหมักจากน้ำสับปะรดว่า nata de pina (Sanchez,1990) และแบคทีเรียที่สร้างวุ้นเซลลูโลสนั้นว่า Bacterium xylinum ซึ่งต่อมาพบว่าเป็นเชื้อ *A.xylinum* (Brown, 1886) หรือมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *A. aceti subspecies xylinum* อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตน้ำส้มสายชู ซึ่งสามารถสร้างชิ้นวุ้นที่มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส แบคทีเรียนี้พบทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในผักและผลไม้ที่เน่าเสีย หรือในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆที่ตั้งไว้แล้วเกิดการหมัก

2.5 คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อ *Acetobacter*

โดยทั่วไปแล้วเซลล์ของ *Acetobacter* มีหลายลักษณะ (very heterogeneous morphological) แต่ปกติจะพบในรูปท่อนสั้น (rod) ตรง หรือโค้ง ขนาด 0.6-0.8 ไมครอน x 1.0-1.4 ไมครอน ไม่มี แฟลกเจลลา ที่ผนังเซลล์ปกคลุมด้วยชั้นของเมือกลื่น อาจพบเซลล์อยู่เดี่ยวๆ จับคู่ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ ไม่เคลื่อนที่ ซึ่งบางครั้งจะพบเซลล์ที่มีรูปร่างลักษณะที่ต่างจากที่กล่าวมา คือ อาจพบว่ามีลักษณะรูปร่างทรงกลม ยืดยาวบวม หรือรูปกระบอกบางตัวคล้ายดอกจิก โค้ง ไม่สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ระยะแรกของการเจริญส่วนใหญ่ติดสีแกรมลบ แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะติดสี Gram variable ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ แต่เมื่อเซลล์รวมอยู่กันมากๆ อาจมีสีชมพู เนื่องจากอิทธิพลของ พอร์ไฟรินส์ (porphyrins) และบางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลได้ ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถเจริญได้ในน้ำหมักที่เป็นกรด สามารถสร้างกรดกลูโคนิก เอซิลและโพรพิล แอลกอฮอล์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 แสดงรูปร่างลักษณะของเชื้อ *A.xylinum*

ที่มา : (Haigler ,1985 ;Haigler and Chanzy ,1988)

2.6 คุณสมบัติที่ใช้ในการแยกเชื้อ *Acetobacter*

แบคทีเรียสกุล *Acetobacter* จะมีปัญหาในการจัดจำแนกชนิด ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันและยังมีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลสตัวอื่นๆ เช่น *Pseudomonas, Achromobacter, Acrobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Azotobacter, Rhizobium* และ *Sarcina* (Deinema and Zevenhuizen 1971) ซึ่งได้จัดจำแนกลักษณะพิเศษต่างๆ ตาม Bergey's Manaul of Determinative Bacteriology (ดังตารางที่2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียเซลลูโลส

การทดสอบ/เชื้อ	*Acetobacter*	*Agrobacterium*	*Alcaligenes*	*Azotobacter*	*Pseudomonas*	*Rhizobium*	*Sarcina*
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	+
Cell shape							
Rods, or coccobacilli straight or curred	+	+	+	Ovoid	+	+	-
Cocci	-	-	-	-	-	-	+
Motility in liquid media	+ or -	+	+	+ or -	+ or -	-	-
Fluorescent pigment	-	-	-	+ or -	+ or -	-	
Yellow colonies	-	-	-	+ or -	+ or -	-	+
Red or orange colonies	-	-	-	-	+ or -		
Oxidase	-	+	+ or -	+ or -	+ or -	+ or -	
Acid from glucose	+	+	+		+ or -	+	
Oxdize ethanol to aceticacid at พีเอช 4.5	+	-	-		-	-	
Catalase test	+	+	+	+	+		-
Indole	-		-				-

ที่มา :(Krieg , 1984 ; Holt ; et. al. 1994)

Acetobacter ส่วนใหญ่แล้วต้องการอากาศในการดำรงชีวิต (Obligate aerobes) สายพันธุ์ที่สามารถผลิตวุ้นได้จัดเป็นเชื้อที่เจริญในสภาพที่มีออกซิเจน (Cook and Colvin 1980) แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสม จะจัดเป็นพวก microaerophilic (William and Connon 1989) สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่ย่อยเจลลาติน ไม่สร้างอินโดล (indole) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ ออกซิไดส์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก สามารถออกซิไดส์อะซิเตตและแลคเตตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้

2.7 ลักษณะทางกายภาพและการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter*

การเจริญเติบโตบนอาหารแข็งของ *Acetobacter* โคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งจะมีลักษณะเป็นทรงกลมนูน (pulvinate) สีขาว ผิวเรียบ แยกโคโลนีเดี่ยวๆ ชัดเจน (Toyosaki ; et. al. 1995) เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีผิวขาวขรุขระ หรือมีรอยย่น หรือสร้างโคโลนีซ้อนขึ้นมา ขุ่นเหนียวหรือสีน้ำตาลอ่อน ความเหนียวจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น โคโลนีมีทั้งขนาดใหญ่และเล็ก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.8 การสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลส

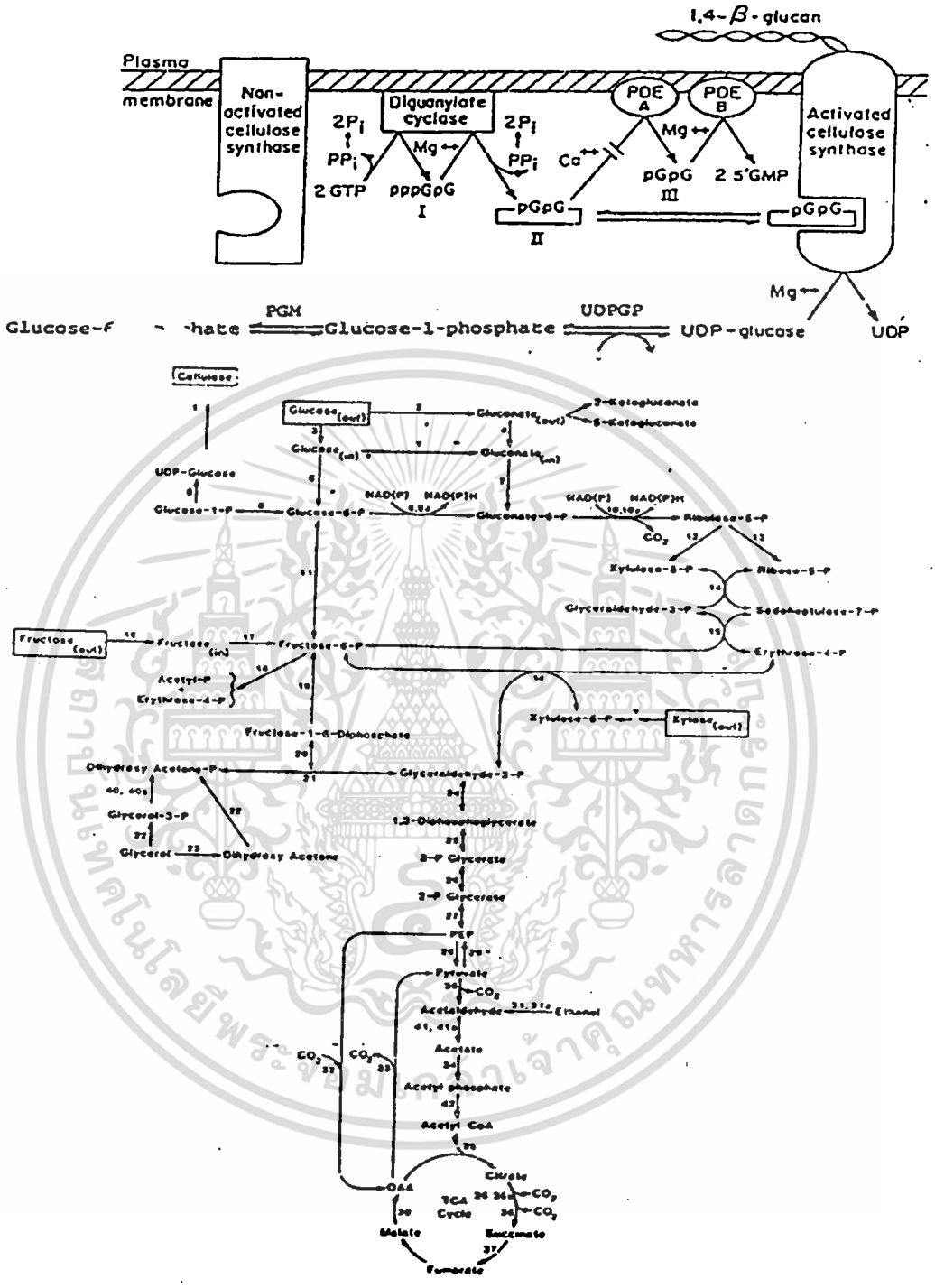
การศึกษาการสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรียเซลลูโลสนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า ใช้ *A.xylinum* เป็นตัวแทนของกลุ่มในการศึกษาการสังเคราะห์เซลลูโลส ทั้งด้านรูปร่างและด้านชีวเคมีในเซลล์ ซึ่งการศึกษาการสังเคราะห์เซลลูโลสส่วนใหญ่จะใช้กลูโคสเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นที่เข้าสู่ขบวนการสังเคราะห์ ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้การสังเคราะห์เซลลูโลสนอกจากกลูโคสแล้วยังสามารถใช้กลูโคเนตหรือฟรุกโตสในการสังเคราะห์เซลลูโลส โดยที่กลูโคสที่อยู่ในเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคเนต จากนั้นกลูโคสในส่วนที่เป็นกลูโคเนตจะถูกเปลี่ยนเป็น 2-ketogluconate และ 5-ketogluconate ซึ่งทั้งสองตัวนี้อาจถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งอาจเข้าร่วมหรือไม่เข้าร่วมในการสร้างเซลลูโลสก็ได้ส่วนในไพรูเวท อะซิเตท และตัวกลางในวงจรซิเตรทเมื่อถูกออกซิไดส์ จนได้คาร์บอนไดอกไซด์ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้นั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเซลลูโลสเลย

วัตถุดิบที่ใช้สร้างเซลลูโลสได้นั้นต้องสามารถเข้าสู่วงจรเพนโตสได้ด้วย ในขณะที่วัตถุดิบที่ให้คาร์บอนไดออกไซด์แต่ไม่ได้เข้าร่วมในการสังเคราะห์เซลลูโลสจะถือว่าเป็นส่วนที่ผ่านวงจร เพนโตสไป

วงจรที่แสดงการสังเคราะห์เซลลูโลสนี้เป็นวงจรของเพนโตสที่เป็นส่วนหนึ่งในการเข้าสู่ระบบวงจรหลายวิถีที่มีการให้กลูโคเนสต้องผ่านตัวกลางก่อน และจากวงจรที่แสดงยังได้แสดงอีกหลายวิธีที่ต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงจากกลูโคสเป็นกลูโคเนทก่อน ซึ่งกลูโคเนทนี้สามารถเข้าสู่วงจรได้ 2 วิธี คือ การเข้าโดยตรง ซึ่งจะต้องใช้กลูโคไอเนส และทางอ้อมจะต้องผ่านเข้าทาง 5-ketogluconate และ 2-ketogluconate (Ross ; et. al. 1991)

73031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

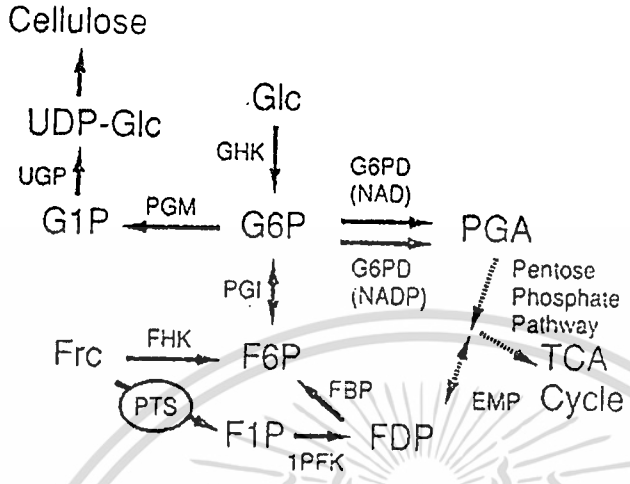


ภาพที่ 7 แสดงวงจรการสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

ที่มา :(Ross ; et. al. 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yoshinaga (1997) ศึกษาการสังเคราะห์เซลลูโลสแบคทีเรียมีวิถีสังเคราะห์ ดังแสดงในภาพที่ 8

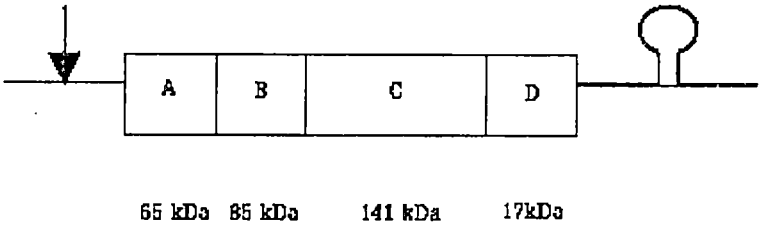


ภาพที่ 8 วิถีสังเคราะห์เซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum*

Glc, glucose; G6P, glucose-6-phosphate; G1P, glucose-1-phosphate; PGA,phosphogluconic acid; Frc, fructose; F1P, fructose-1-phosphate; FDP, fructose-1,6- phosglucomutase; UGP, UDP-glucose pyrophosphorylase; PGH, phosphoglu-comutase; UGP, UDP-glucose pyrophorylase; G6PD, glucose-6-phosphate dehy-drogenase; PGI, phosphoglucose isomerase; FHK, fructose hexokinase; 1 PFk,fructose-1-phosphate kinase; FBP, fructose bis-phosphatase; PTS, phosphotransferase system; EMP, Embden-Myerhoff pathway.

ได้มีการศึกษาถึงขบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียและพบว่าน้ำตาลกลูโคสจะถูกใช้โดยผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต โดยวิถีเซลลูโลสจะแยกออกที่ glucose-6-phosphate (G6P) และสารตั้งต้นของการสังเคราะห์เซลลูโลสก็คือUDP-glucose ซึ่งการสังเคราะห์ UDP-glucose จาก G6PD นั้น จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนด้วยกัน โดยพบว่าการทำงานของเอนไซม์ phosphoglucose isomerase จะแตกต่างกันหรือใช้เอนไซม์นี้จะมี activity สูงเมื่อแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลฟรุกโตส UDP-glc จะถูก polymerized ไปเป็นเซลลูโลส และ เซลลูโลสจะถูกปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะมีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเส้นใยนี้จะประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 4 ชนิด ซึ่งจะถูกควบคุมโดยcellulose synthase operon (ภาพที่ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 โครงสร้างของCellulose Synthase *(bcs)* Operon.

Box A, B, C, and D represent the coding regions of the bcs genes. Arrow and stem loop indicate the transcription initiation site and the terminator. The size of each gene product is also shown under its coding region.

โดยยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลส คือ *bcs* A, *bcs* B, *bcs* C และ *bcs* D ได้มีการทดลองพบว่ายีน *bcs* A, B และ C มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ ต่าง ๆ ส่วนยีน *bcs* D นั้นจะมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์เซลลูโลส ซึ่งผลของการทดลองพบว่าถ้าทำให้ยีน *bcs* D ลดกิจกรรมลงพบว่าจะทำให้การสังเคราะห์เซลลูโลสลดลงถึงร้อยละ 40 ด้วย

2.9 กระบวนการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสโดยเชื้อ *A.xylinum*

ลักษณะการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *A.xylinum* เป็นแบบ Growth associated (Ishikawa ; et. al. 1995) มีลักษณะสำคัญคือการเจริญเติบโตและการผลิตเซลลูโลสเกิดพร้อมกัน โดยในระหว่างช่วงการเจริญเติบโต (trophophase) แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการผลิตเซลลูโลสออกมาน้อย แต่ในช่วงการผลิตผลิตภัณฑ์คือแบคทีเรีย (idiophase) จะมีการเจริญของเซลล์เพียงเล็กน้อยแต่มีการผลิตเซลลูโลสสูงสุด สำหรับกระบวนการต่างๆในการผลิตเซลลูโลสแบ่งออกได้ดังนี้

<u>กระบวนการหมักในสภาวะนิ่ง</u>

การหมักวิธีนี้โดยทั่วไปใช้น้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นวัตถุเหลือใช้จากโรงงานอาหารและภาชนะที่ใช้หมักเป็นถาดอลูมิเนียมหรือพลาสติกผิวเรียบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5-10 และ พีเอชเริ่มต้นปรับด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นให้อยู่ในช่วงพีเอช 4.0-5.0 ธาตุอื่นๆที่เติม เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (วราวุฒิและคณะ 2535) หรือไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) (Lapus ; et. al. 1967) สำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจน การฆ่าเชื้อใช้วิธีการต้มให้เดือด เมื่ออาหารเย็นลงเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในถาดอลูมิเนียมหรือพลาสติกผิวเรียบ ให้มีระดับความลึก 10-15 เซนติเมตร คลุมภาชนะด้วยผ้าขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางที่ฆ่าเชื้อแล้ว ห้องบ่มรมควันฆ่าเชื้อด้วยก๊าซไซยาไนด์ก่อนการหมัก 2-3 วัน ห้องมีระบายอากาศ จากนั้นใส่กล้าเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ประมาณร้อยละ 10-40 (วราวุฒิ และคณะ 2536) หลังจากการหมักเป็นเวลา 7-14 วัน แบคทีเรียจะผลิตเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะสีขาวครีม มีเนื้อสัมผัสที่เหนียวและแน่น และที่สำคัญ คือมีปริมาณเซลลูโลสสูง ซึ่งมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่นวุ้นสวรรค์ วุ้นมะพร้าว และเห็ดรัสเซีย

การหมักวิธีนี้อัตราการผลิตเซลลูโลสในช่วง10วันแรกของการหมักจะมีอัตราการผลิตสูง ดังนั้นในการควบคุมการหมักจำเป็นต้องคำนึงถึงแหล่งอาหารให้มีทั้งชนิดและปริมาณให้เหมาะสม หลังจาก 10 วันแรกของการหมัก พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลสต่ำลง เนื่องจากธาตุอาหารเหลือน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อแบคทีเรียผลิตเซลลูโลสบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนามากขึ้น ทำให้อากาศซึมผ่านลงไปได้ยากขึ้น จึงมีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตเซลลูโลส ในระหว่างการหมักควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28-35 องศาเซลเซียส และปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 3.5-4.0 โดยการเติมกรดอะซิติก

นอกจากน้ำมะพร้าวและน้ำสับปะรด ยังสามารถผลิตเซลลูโลสได้จากหางนมหรือเวย์(whey) (วราวุฒิ และคณะ 2536) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ส่วนใหญ่จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยก เคซีน (casein) ซึ่งหางนมมีส่วนประกอบโดยประมาณดังนี้ น้ำตาลแลคโทสร้อยละ 4.8 โปรตีนร้อยละ0.85 ไขมันร้อยละ 0.35 แร่ธาตุร้อยละ 0.6 และน้ำร้อยละ 93.40 (Delhi, 1980)หางนมสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *A.xylinum* แบบอยู่กับที่ในถาด อัตราการผลิตเซลลูโลสขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลผลิตเซลลูโลสมีความสัมพันธ์กับการใช้สารอาหาร การผลิตเซลลูโลสจะมีอัตราลดลงเมื่อสารอาหารมีความเข้มข้นสูงเนื่องจากมีการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลกลูโคสบางส่วน และเกิด catabolite repression มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำหมักมีผลทำให้ปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง (Tahara; et. al. 1997)

<u>กระบวนการหมักในสภาวะเขย่าหรือในถังหมัก</u>

Toyosaki ; et. al. (1995)ได้รายงานผลการผลิตเซลลูโลส โดยใช้เชื้อ *A.xylinum* BPR 2001 ในถังหมักและใช้อาหารเหลว CSL-fructoose medium พบว่าการผลิตเซลลูโลสมีประสิทธิภาพสูง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยน้ำแช่ข้าวโพด (CSL) และน้ำตาล ฟรุคโตส อาหารเลี้ยงเชื้อฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นลงจะใส่กล้าเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ประมาณร้อยละ 5-10 ให้เชื้อเจริญในสภาพที่มีอัตราการกวน และการให้อากาศ ควบคุมพีเอชในระหว่างการหมักให้คงที่ประมาณ 5.0ด้วยกรดซัลฟูริค และก๊าซแอมโมเนีย ควบคุมอุณหภูมิการหมักที่ 28-32 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีระยะเวลาการหมัก 3-5 วัน ซึ่งแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการหมักจะมีลักษณะเป็นเม็ด การหมักในอาหารเหลวมีหลายรูปแบบ อาทิเช่น การหมักแบบกะ (batch culture) (Toyosaki; et. al. 1995) ทั้งการหมักในถังหมักเดี่ยวและหลายถังหมัก (single and multi stage) แบบกึ่งกะ (fed batch culture) (Yang; et. al. 1998) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) โดยทั่วไปการผลิตเซลลูโลสก็ยังใช้กรรมวิธีการหมักแบบกะเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง

การหมักแบบกะในอาหารเหลวมีข้อดีคือ ใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้ทุกชนิด ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าการหมักบนอาหารเหลวร้อยละ 40 ปรับปรุงวิธี และควบคุมกระบวนการหมักได้ง่าย ใช้พื้นที่และแรงงานคนน้อย และสามารถควบคุมสภาพปลอดเชื้อได้ง่าย

2.10 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

การเจริญของเชื้อที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ องค์ประกอบของอาหาร เครื่องมือ วิธีการเพาะเลี้ยง และองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

อุณหภูมิ

เชื้อ *Actetobacter* ส่วนใหญ่มีการเจริญและผลิตเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่านี้มากๆ เชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมและเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส (Kouda; et. al. 2000)

Lapuz ; et. al.(1967) พบว่าการสร้างเซลลูโลสมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการสร้างเซลลูโลสขึ้นได้เร็วเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี และอุณหภูมิที่เจริญเติบโตของเชื้อระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียส

ความเป็นกรด-ด่าง

Acetobacter เจริญในอาหารที่มีพีเอช ระหว่าง 3.0-7.0 และเจริญได้ดีที่สุดอยู่ในช่วง พีเอช 4.0-5.0 (Kouda; et. al. 2000) และถ้าอาหารมีพีเอชต่ำกว่า 3.0 หรือสูงกว่า 8.0 จะไม่มีการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้น

Verschuren ; et. al. (2000) ศึกษาการหมักที่สภาพนิ่ง โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นน้ำหมักและมีการเติมซูโครสลงไป โดยการศึกษาที่พีเอชต่างๆ กันได้แก่ 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; et. al. (1993) ศึกษาการผลิตเซลลูโลสโดย *A.xylinum* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร Standard medium ที่พีเอช ระหว่าง 2.5-7.0 พบว่าที่พีเอช 4.0-6.0 เชื้อสามารถสร้างเซลลูโลสสูง โดยเฉพาะพีเอช 5.0 สามารถสร้างเซลลูโลสได้สูงที่สุด

Oikawa; et. al. (1995) ศึกษาการเจริญของ *A.xylinum* KU-1 ในอาหารสังเคราะห์ Standard medium ที่มีน้ำตาล D-Arabitol เป็นองค์ประกอบของอาหารที่พีเอชต่างๆ ได้แก่ 3.0-8.0 พบว่าที่พีเอช 5.0 เชื้อมีการเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สุด

แหล่งคาร์บอน

เชื้อ *A.xylinum* สามารถใช้คาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ในการผลิตเซลลูโลส นอกจากกลูโคสแล้วยังสามารถใช้คาร์บอนแหล่งอื่นๆ ได้แก่ เช่น ฟรุคโตส แมนนิทอล ซอร์บิทอล กลีเซอรอล กาแลคโตส แลคโตส ซูโครส มอลโตส (Hestrin , 1947) ทั้งนี้เชื้อสามารถสร้างวุ้นได้จากเด็กโตรสและซูโครส เซลลูโลสที่ได้มีความหนาแน่นและแข็ง ดังนั้นจึงเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต เนื่องจากหาง่ายและราคาไม่แพง

แหล่งของซูโครสจะอยู่ในรูปของแป้ง กากส้ม กากผักหวาน (beet) กากของผักหรือผลไม้ที่คัดแล้ว หรือชานอ้อย (Kouda; et. al. 2000)

Masaoka; et. al (1993) ได้ศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณการใช้คาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส กลีเซอรอล และคาร์บอนจากแหล่งต่างๆ ในปริมาณจำนวนที่เท่ากัน คือ 0.3 กรัมต่อฟลาสก์ ในอาหาร Standard medium โดยเลี้ยงเชื้อ *A.xylinum* ให้เจริญเป็นระยะเวลา 3 วัน แล้ววัดปริมาณเซลลูโลสที่ได้โดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโมเมตร พบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอนได้จากแหล่งต่างๆ ในการผลิตเซลลูโลสในปริมาณที่ได้แตกต่างกันไป ดังตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แหล่งคาร์บอนที่เชื้อ *A.xylinum* ใช้ในการผลิตเซลลูโลส

แหล่งคาร์บอน (Carbon source)		ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้ร้อยละ (Cellulose yield relative)
Monosaccharide	D-fructose	92
	D-galactose	15
	D-glucose	100
	D-manose	3
	D-xylose	11
	L-arabinose	14
	L-sorbose	11
Disaccharide	lactose	16
	moltose	7
	sucrose	33
Polysacchride	starch	18
Alcohols	ethanol	4
	ethylene glycol	1
	di-ethylene glycol	1
	propylene glycol	8
	glycerol	93
	mMyo-inositol	17
Organic acids	citric acid	20
	L-malic acid	15
	succinic acid	12
Other	D-glucono lactone	62
No carbon source		2

ที่มา : Masaoka : et. al. (1993)

จากการทดลองของ Masaoka ; et. al. (1993) พบว่าการสร้างเซลลูโลสของเชื้อนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตเซลลูโลสแล้ว ยังขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเหลว ส่วนความลึกและปริมาณอาหารไม่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสเมื่อเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่ง

Oikawa; et. al. (1994) ศึกษาเลี้ยงเชื้อ *A.xylinum* KU-1 ในอาหารที่เติมน้ำตาล แมนนิทอล (D-mannitol) ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สภาวะเหมาะสมที่สุดในการผลิตเซลลูโลส คือ น้ำตาลแมนนิทอล ร้อยละ 1.5 โพลีเปปโตน ร้อยละ 0.5 สารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 2.0 พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ผลผลิตของเซลลูโลสจากน้ำตาลแมนนิทอลนั้นมากกว่าผลผลิตจากน้ำตาลกลูโคสถึง 3 เท่า ภายใต้สภาวะเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเซลลูโลสจากน้ำตาลแมนนิทอล โดย *A.xylinum* KU-1

สภาวะ	ค่าที่ตรวจสอบ	ค่าที่เหมาะสม
D-แมนนิทอลเข้มข้น (%)	0 – 3.0	1.5
ยีสต์สกัดเข้มข้น (%)	0 – 2.0	2.0
โพลีเปปโตนเข้มข้น (%)	0 – 2.0	0.5
อุณหภูมิการหมัก (°C)	25 – 45	30
พีเอชเริ่มต้น	3 – 9	5
ปริมาตรอาหาร (ml)	25 – 100	50
ปริมาตรฟลาสก์ (ml)	50 – 1000	1000
ปริมาณหัวเชื้อ (%)	0.1 – 5.0	1.0
เวลาเพาะเลี้ยง (h)	0 – 120	48

ตารางที่ 5 แสดงผลผลิตสูงจากน้ำตาลแมนนิทอล โดย *A.xylinum* KU-1

แหล่งคาร์บอน	เซลลูโลส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)[a]	ผลผลิต (เปอร์เซ็นต์)[b]
D-แมนนิทอล	4.6	31
D-กลูโคส	1.2	8

[a] ต่อมิลลิลิตรของอาหาร

Oikawa; et. al. (1995) ศึกษาเลี้ยงเชื้อ *A.xylinum* KU-1 ในอาหาร Standard medium และเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล D-glucose กับ D-Arabitol ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารในการเจริญเติบโตและผลิตเซลลูโลส พบว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาล D-Arabitol ในการผลิตเซลลูโลสได้ดีกว่าใช้น้ำตาล D-glucose โดยปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากน้ำตาล D-Arabitol จำนวน 12.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และจากน้ำตาล D-glucose จำนวน 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Seto; et. al. (1996) ได้คัดเลือก *Acetobacter* ที่เหมาะสมเพื่อผลิตเซลลูโลสและใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีจากอาหาร CSL medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจน

เป็นที่ทราบกันทั่วไปแล้วว่าการเจริญของแบคทีเรียเซลลูโลสที่เจริญที่สภาวะนิ่ง สภาวะเขย่า การให้อากาศ การกวนด้วยใบพัดมีความสำคัญในการผลิตเซลลูโลส ตามปกติแบคทีเรีย *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญเติบโต ดังนั้นในการหมักเพื่อให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้เร็วและสร้างเซลลูโลสได้ดีที่สภาวะนิ่ง ภาชนะที่ใช้หมักต้องมีผิวหน้ากว้างเพื่อให้มีการซึมผ่านและถ่ายเทออกซิเจนได้ดี เชื้อจะลอยตัวอยู่บนผิวหน้าอาหารที่สภาวะนิ่ง และเมื่อเชื้อมีจำนวนและความหนาแน่นในระดับหนึ่งจะเริ่มสร้างวุ้นขึ้น (Schramm and Hertrin 1954) นอกจากนี้ Masaoka ; et. al. (1993) พบว่า การเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่งในอาหารเหลว การสร้างเซลลูโลสขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเหลวที่ใช้ ส่วนความลึกและปริมาณไม่มีผลต่อการสร้างความหนาของเซลลูโลส จึงได้มีการนำวิธีเพิ่มออกซิเจนให้กับเชื้อ โดยวิธีการเขย่าในฟลาสก์และใช้วิธีการกวนด้วยใบพัดเพื่อเพิ่มออกซิเจนระหว่างการหมักในถังหมัก แต่พบว่าปริมาณของเซลลูโลสที่ผลิตได้กลับน้อยลงกว่าที่สภาวะนิ่ง (Schramm and Hestrin. 1954; Dudman, 1960; Yamanaka, 1989) ซึ่งต่อมา Kouda; et. al. (1997) พบว่าความเร็วรอบในการเขย่า การกวน ชนิดและสายพันธุ์มีผลต่อการสร้างเซลลูโลส นอกจากนี้ขนาดและชนิดของใบพัดที่ใช้กวนก็มีผลต่อการผลิตเช่นกัน ซึ่งผลของการศึกษาออกซิเจนและความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตเซลลูโลสที่สภาวะการเจริญแบบมีการให้อากาศในถังหมักและมีใบพัดกวน โดยใช้วิธี Static gassing out method ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนและอัตราการผลิตเซลลูโลสสูงขึ้น

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

นอกจากการเติมอากาศลงในอาหารโดยตรงเพื่อเป็นการเพิ่มออกซิเจนให้กับเชื้อในระหว่างการหมักแล้ว ยังได้มีการเติม micro-particle ลงในอาหารหมักที่สภาวะเขย่า เช่น cellulose porous beads (CPBs) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสที่การหมักในสภาพกวน (agited condition) ได้ด้วย (Krusong; et. al. 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นสารที่มีความสำคัญในการสร้างเซลลูโลส อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของอาหารจะทำให้ *Acetobacter* ไม่สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ แหล่งไนโตรเจนได้แก่ สารพวกอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียฟอสเฟต อยู่ในรูปของไนเตรต เช่น ยูเรีย หรืออยู่ในรูปของสารอาหารที่สกัดจากธรรมชาติที่มีอยู่ใน Bacto-peptone, Bacto-soytone, Yeast-extract CSL (corn steep liquor) และ Bean-Condensate (Kouda; et. al. 2000)

จากการศึกษาของ Lapuz and Gallardo (1967) พบว่าการใช้ $NH_4H_2PO_4$ ร้อยละ 0.5 สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ $(NH_4)_2SO_4$ และเปปโตน ในขณะที่การใช้ KNO_3 และ $NaNO_3$ ไม่พบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และไม่เกิดการสร้างเซลลูโลสเลยเนื่องจากพบว่าเป็นสารประกอบไนเตรทที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียชนิดนั้น

เอทานอลและกรดอะซิติก

Acetobacter เป็นกลุ่มเชื้อที่สามารถออกซิไดส์เอทานอลเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ ดังนั้น *Acetobacter sp.* ทั้งหมดสามารถใช้ไวน์ได้ ซึ่งกระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับระดับอัตราการหายใจของเชื้อ โดยส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนเกือบทุกสายพันธุ์รวมทั้ง *A.aceti* สามารถเจริญในอาหารเหลวและลอยบนผิวอาหารได้โดยมีการสร้างเส้นใยสีขาวเกิดขึ้นที่สภาวะนิ่งนอกจากนี้ *A.xylinum* สามารถสร้างเส้นใยและจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเซลลูโลสด้วย (Brow ; et. al. 1976) แต่เชื้อจะไม่มีการสร้างเซลลูโลสเกิดขึ้นถ้าหากไม่มีกลูโคสในอาหาร นอกจากนี้ยังไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีเอทานอลเดี่ยวๆ ถ้าหากไม่มีการเติมกรดอะซิติก เกลืออะซิเตตหรือกลูโคสลงไปด้วย

Toda; et. al. (1997) ศึกษาการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งของเชื้อ *A.xylinum* ในอาหร glucose medium เมื่อมีการเติมกรดอะซิติกลงไปจะไปทำให้การสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจากเดิม 4 เท่า และนอกจากนี้ถ้าเติมกรดอะซิติกลงไป 20 กรัม/ลิตร พบว่ามีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *A.pasteurianus* ที่สภาวะเดียวกัน

Naritome; et. al. (1998) ศึกษาเอทานอลที่มีผลต่อการสร้างเซลลูโลสโดยใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการเจริญแบบต่อเนื่อง จากการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *A.xylinum subsp. sucrofermentans* BPR3001A ในอาหาร CSL-Fru medium ซึ่งมีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมเอทานอลลงไปในอาหาร 10 กรัม/ลิตรน้ำ จะมีการสร้างเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ร้อยละ 46 แต่เมื่อเปลี่ยนเอทานอลจาก 10 กรัม/ลิตร เป็น 15 กรัม/ลิตร หรือมากกว่า พบว่าอัตราการสร้างเซลลูโลสลดลง ซึ่งเอทานอลจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและการใช้น้ำตาลในขบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Matsuoka; et. al. (1996) ได้ทดลองกระตุ้นการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* โดยเติมกรดแลคติคลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการทดลองเติมโคซับสเตรต (cosubstrate) หลายชนิดลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยง *Acetobacter* sp. V6 เพื่อดูผลกระทบที่เกิดกับการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส สารที่ทดลองเติมลงไปได้แก่ เอทานอล และ กรดอินทรีย์หลายชนิด โดยใช้ปริมาณร้อยละ0.2 ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบร้อยละ 1.5 (Son; et. al. 2001) ผลที่ได้เป็นไปดังตารางที่ โคซับสเตรทที่เติมลงไปทั้งหมดมีผลทำให้การผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 6 ผลของโคซับสเตรทต่างๆที่มีต่อการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter sp.V6*

ความเข้มข้น(0.2%)	ผลผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลส (กรัม/ลิตร)
None	1.31
Acetic acid	3.01
Citric acid	3.16
Ethanol	3.22
Fumaric acid	3.11
Lactic acid	3.19
Pyruvic acid	3.19
Succinic acid	3.18

เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นเวลา7 วันที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

<u>สารอื่นๆ</u>

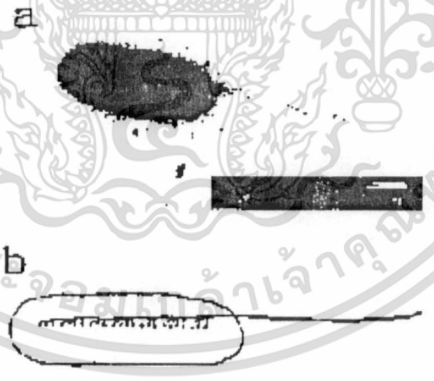
นอกจากน้ำตาล ไนโตรเจนแล้ว ยังมีสารอื่นๆ ที่เติมลงไปในอาหารในรูปแบบต่างๆ เช่น สารอินทรีย์ที่อยู่ในรูปของกรดอะมิโน วิตามิน กรดไขมัน นิวคลีอิคแอซิค 2,7,9 tricarboxy-1 Hpyrro(2,3,5)-quinoline-4, 5-dione, sulfite pulp น้ำทิ้งเยื่อกระดาษ

สารอินทรีย์ในรูปของเกลือต่างๆ เช่น ฟอตเฟส แมกนีเซียม แคลเซียม โคบอล โมลิปเดต ฮีมาไตท์ คีเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิตเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการเลี้ยง *Acetobacter* เพื่อผลิตเซลลูโลสนั้นพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ การเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการให้อากาศและมีการเขย่าจะให้ผลดีที่สุด สำหรับการสร้างเซลลูโลส จะเกิดขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรียและเส้นใยเหล่านี้จะถูกขับออกมาทางรูของเซลล์เมมเบรน (ภาพที่ 10) โดยมีลักษณะการเจริญเติบโตแสดง ดังภาพที่13 แสดงการเจริญเติบโตของ *Acetobacter* ในถังหมัก โดยในการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* นี้ใช้น้ำตาลฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และจะให้เซลลูโลสสูงถึง 9 กรัมต่อลิตรในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* นั้นได้ทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในสภาพนิ่ง (static) และสภาพที่มีการเขย่า (agitation) พบว่าการเลี้ยงแบบสภาพนิ่งจะทำให้เส้นใยเจริญและจับตัวกันแน่น ทำให้สภาพอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงกว่าการเลี้ยงแบบเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มกรดคาร์บอนิกจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตดีในช่วงของ lag phaseและยังช่วยเพิ่มการผลิตเซลลูโลสด้วย การเพิ่มกรดแลคติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้เชื้อสังเคราะห์ATP ได้ดีขึ้น โดยจะไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของแลคเตทดีไฮโดรจีเนส และ TCA cycle นอกจากนี้ ปัจจัยอื่น ได้แก่ ชนิดของใบพัดในถังหมัก ความเร็วรอบในการกวน ปริมาณอากาศและพีเอชก็มีผลต่อการผลิตเซลลูโลสด้วย



ภาพที่ 10 แสดงรูปร่างของ *A. xylinum*BPR2001 และเซลลูโลสที่สร้างขึ้นโดย กล้องอิเลคตรอนแบบส่องกราด (a) และ (b) แสดงแบบจำลองในการสร้างเซลลูโลส

เชื้อ *Acetobacter xylinum* นอกจากผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสแล้วยังผลิตอะซิแตนควบคู่ไปด้วย อะซิแตนมีลักษณะเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้จัดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ โครงสร้างหลักของอะซิแตนประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกการสังเคราะห์อะซิแตน(Iannino;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et. al. 1998) เริ่มจากอะซิแตนถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกนอกเซลล์โดยเชื้อ *Acetobacter aceti subsp.xylinum* โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบทางเคมีของอะซีแตน ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ D-glucose L-mannoseและ O-acetyl ในอัตราส่วน 4:1:1 ตามลำดับ (Shramm; et. al. 1957) ในการสังเคราะห์อะซิแตนจะใช้UDP-glucose เป็นสารตั้งต้นเช่นเดียวกับเซลลูโลส การสังเคราะห์อะซิแตนเพิ่มขึ้นทำให้การผลิตเซลลูโลสลดลง (Hwang; et. al. 1999) ในกระบวนการหมักเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้นปริมาณการสังเคราะห์อะซิแตนจะสูงด้วย การลดปริมาณอะซิแตนโดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถลดปริมาณการสังเคราะห์อะซิแตนได้ มีผลทำให้เซลลูโลสจากแบคทีเรียเพิ่มขึ้น

2.12 ประโยชน์ของเซลลูโลสและการนำไปใช้

<u>ด้านอาหาร</u>

ปัจจุบันพบว่าการนำแผ่นวุ้นหรือเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในน้ำมะพร้าวมาทำเป็นส่วนประกอบของอาหารทั้งคาว หวาน และทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น วุ้นในสลัด เจลลี นมเปรี้ยว ไอศกรีม วุ้นผสมน้ำผลไม้ และยังทำเป็นส่วนประกอบอาหารคาวที่มีแคลอรี่ต่ำๆ เช่น kamaboko (boiled fish paste) แฮมเบอร์เกอร์และ ไส้กรอก (Okiyama; et al. 1992)

นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ (healthy food) โดยใช้ในการเพิ่มเยื่อใยและกากอาหาร ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก

ด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในทางการแพทย์ มีการใช้เซลลูโลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *A.xylinum* โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่งให้เชื้อสร้างเซลลูโลสเป็นแผ่นวุ้น และนำแผ่นวุ้นที่ได้มาใช้ในการรักษาบาดแผลที่ผิวหนังเนื่องจากการไหม้ในระยะที่ 2 และที่ 3 โดยใช้เป็นผ้าซับแผล หรือใช้พันแผลแทนผ้าพันแผล และยังใช้ในการตบแต่งเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ (Ring; et. al. 1986 ; Fontana; et. al. 1990,1991)

นอกจากนี้ Geyer; et. al. (1994) ได้นำเซลลูโลสมาพัฒนารูปแบบการผลิตให้มีลักษณะเป็นทรงกระบอกเพื่อใช้เป็นวัตถุแทนท่อเลือด ท่อน้ำเหลือง ท่อปัสสาวะและหลอดลม

<u>กระดาษลำโพง</u>

กระดาษที่ผลิตเพื่อใช้เป็นลำโพงต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ต้องให้คลื่นเสียงความเร็วสูง (high sonic velocity) และต้องลดคลื่นที่รบกวนได้ดี เพื่อให้ได้คุณภาพเสียงที่ชัดเจนวัสดุที่ใช้ในการผลิตกระดาษลำโพงมีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป เช่น บางชนิดมีข้อเสียที่มีคุณสมบัติในการลดคลื่นรบกวนได้ไม่ดี ในขณะที่บางชนิดให้ความเร็วคลื่นได้ต่ำเกินไป เช่น เพียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1,500 เมตรต่อนาทีเท่านั้น แต่จากการนำเซลลูโลสที่ผลิตได้จาก *A.xylinum* มาทำเป็นกระดาษลำโพง พบว่ามีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ให้เสียงสูงที่ดี มีความเร็วสูงเท่ากับอลูมิเนียม และยังมีคุณสมบัติในการลดเสียงรบกวนได้ดี (Yamanaka, 1989)

ผลิตภัณฑ์กระดาษ

ฟีนอลเรซิล (phenol resin fiber) หรือเส้นใยคาร์บอน (carbon fiber) ซึ่งโดยปกติไม่สามารถทำเป็นแผ่นได้ แต่เมื่อนำเซลลูโลสที่ผลิตได้จาก *A.xylinum* ที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงแล้วมาผสมเป็นตัวเชื่อม (binder) จะทำให้เส้นใยเหล่านี้ขึ้นรูปเป็นแผ่นได้ ในการผลิตกระดาษคาร์บอน (Activated carbon fiber sheets) เพื่อใช้ในการดูดซับสารพิษ การเติมเซลลูโลสลงไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับสารให้ดีขึ้น

ใช้ในการยืดอายุความสดของผลไม้

เซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK ที่ผ่านการตีปั่นอย่างละเอียดสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเตรียมสารเคลือบผิวของกล้วยไข่ได้ดี โดยสูตรที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งมันต่อเซลลูโลสต่อน้ำเท่ากับอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ต่อ 60 การเคลือบผิวกล้วยไข่ด้วยสูตรดังกล่าวสามารถช่วยยืดความสดโดยเฉพาะช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงสีผิวของกล้วยไข่ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกล้วยไข่ที่ไม่ได้ผ่านการเคลือบผิว

สารให้ความหนืดและความคงตัว

การนำเซลลูโลสจากการผลิตในอาหารเหลวของ *A.xylinum* ผสมกับพอลิเมอร์อื่นๆ เช่น พอลีไวนิลแอลกอฮอล์ เพื่อผลิตวัสดุที่มีความแข็งแรงและทนทาน ใช้เป็นสารให้ความหนืดและความคงตัวในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

นอกจากนี้ยังได้นำเซลลูโลสที่ผลิตได้มาทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose derivatives) เช่น ไฮดรอกซีเมทิลเซลลูโลส (hydroxymethyl cellulose) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) หรือเซลลูโลสอะซิเตต (celluose acetate) จึงทำให้การใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสของ *A.xylinum* เป็นไปอย่างกว้างขวางทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา ผงซักฟอก กาว สิ่งทอ กระดาษ และ เครื่องสำอาง เป็นต้น

2.13 วิธีการทำให้เป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์

วิธีการผลิตเซลลูโลสที่สร้างขึ้นมาแล้วจะมีเซลล์ของแบคทีเรียอื่นๆ รวมอยู่ด้วย จึงต้องทำให้เซลลูโลสที่ผลิตได้ มาทำให้บริสุทธิ์โดยนำวิธีการต่างๆ

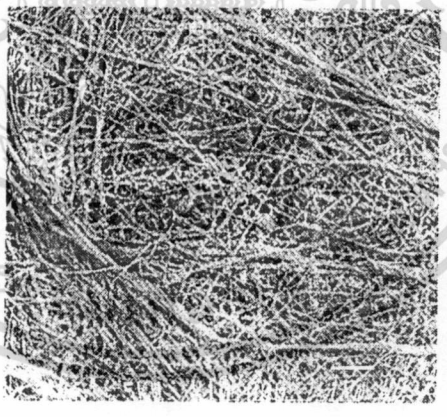
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

การล้างด้วยน้ำเป็นการเอาอาหารออกจากเซลลูโลส จ ากนั้น ส กัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเอาเซลล์ของแบคทีเรียออก ล้างด้วยน้ำให้หมด นำไปอบด้วยตู้อบแห้งแบบสุญญากาศ (vacumm oven) ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อทำให้เซลล์แห้ง

Kasaoka (1993) ทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสจากการเลี้ยงด้วย *A.xylinum* ในอาหารเหลวจากนั้นนำเซลลูโลสที่ได้กรองด้วยตะแกรง ขนาด 45 ไมครอน จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก ไอออนหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปต้มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออนอีกหลายๆ ครั้ง จนหมดด่าง นำเซลลูโลสไปอบที่ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาหนึ่งคืน ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้

Ramana; et. al. (2000) ศึกษาการใช้ด่าง (alkali treatment) ในการล้างอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเซลลูโลส ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโครงสร้างที่เป็นรูพรุน (porous structure) และลักษณะเส้นใย (fibrillar structure)หลังการล้างด้วยด่าง จะเห็น



ภาพที่ 11 โครงสร้างของเซลลูโลสที่ผ่านการล้างด้วยด่าง
ที่มา Ramana; et. al. (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1.เชื้อจุลินทรีย์

ใช้เชื้อ *Acetobacter xylinum*TISTR 976

2.อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารสูตรน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้ (ภาคผนวก ก)

น้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้

น้ำตาลซูโครส ร้อยละ 3

เปปโตน ร้อยละ 1

กรดซิตริก ร้อยละ 0.1

3.สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำตาลกลูโคส
2. น้ำตาลฟรุคโตส
3. น้ำตาลซูโครส
4. น้ำตาลแมนนิทอล
5. เปปโตน
6. ยีสต์สกัด
7. แอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. น้ำแช่ข้าวโพด(corn steep liquor)

9. กรดซิตริด

10. แมกนีเซียมซัลเฟต

11. ซิงค์ซัลเฟต

12. โซเดียมไฮดรอกไซด์

13. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้ (ภาคผนวก ข)

4.เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ผ้าขาวบาง

2. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3. ปิเปตขนาด 1 , 5 และ 10 มิลลิลิตร

4. บีกเกอร์ขนาด 1000 และ 5000 มิลลิลิตร

5. กระบอกตวงขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร

6. ตะเกียงแอลกอฮอล์

7. โถดูดความชื้น

8. เครื่องชั่งชนิด 4 ตำแหน่ง

9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ

10. ตู้อบลมร้อน

11. ตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ

12. เครื่องใช้ในครัวเรือนต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ พีเอช มิเตอร์(pH meter) วัดปริมาณโปรตีนตามวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl method) (A.O.A.C,1990)

3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้ทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ (Starter)

นำน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้มากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกรองเอาตะกอนออก แล้วนำมาเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 3 เปปโตนร้อยละ 1 อุ่นให้ละลาย รอให้เย็นเติมกรดซิตริก ร้อยละ 0.1 นำน้ำทิ้งที่มีการเติมสารอาหารใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ร้อยละ 10 เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 3-4 วัน จะได้หัวเชื้อเริ่มต้น

3.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและเขย่า

1. ศึกษาแหล่งคาร์บอน โดยใช้แหล่งคาร์บอนดังนี้
   - น้ำตาลกลูโคส
   - น้ำตาลซูโครส
   - น้ำตาลฟรุคโตส
   - น้ำตาลแมนนิทอล

นำน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้มากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆในน้ำทิ้งโดยเติมร้อยละ 3 และเติมเปปโตนร้อยละ 1 อุ่นให้ละลาย รอให้เย็นเติมกรดซิตริก ร้อยละ 0.1 นำไปใส่ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆอย่างละ 6 ฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นถ่ายเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ลงไปร้อยละ5 เขย่าให้เข้ากัน การศึกษาในสภาวะนิ่งให้นำฟลาสก์บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 7 วัน สำหรับการศึกษาในสภาวะเขย่า ให้นำฟลาสก์วางบนเครื่องเขย่า(Incubator shaker) ที่ มีความเร็วรอบ 100รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา7วันเช่นกัน เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้และวัดพีเอชของน้ำหมักทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาแหล่งไนโตรเจน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนดังนี้
   - เปปโตน
   - แอมโมเนียมซัลเฟต
   - ยีสต์สกัด
   - น้ำแช่ข้าวโพด(corn steep liquor)

นำน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้มากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วเติมน้ำตาลซูโครสในน้ำทิ้งร้อยละ 3 และเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆร้อยละ 1 อุ่นให้ละลาย รอให้เย็นแล้วเติม กรด ซิตริกร้อยละ 0.1 นำไปใส่ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนต่างๆอย่างละ 6 ฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ลงไปร้อยละ5 เขย่าให้เข้ากัน การศึกษาในสภาวะนิ่งให้นำฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 7 วันสำหรับการศึกษาในสภาวะเขย่า ให้นำ ฟลาสก์วางบนเครื่องเขย่า (Incubator shaker) ที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันเช่นกัน เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลส ที่ได้และวัดพีเอชของน้ำหมักทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

3. ศึกษาแหล่งแร่ธาตุ โดยใช้แร่ธาตุดังนี้
   - กรดซิตริก
   - แมกนีเซียมซัลเฟต
   - ซิงค์ซัลเฟต

นำน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้มากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วเติมน้ำตาลซูโครสในน้ำทิ้งร้อยละ 3 และเติมเปปโตนร้อยละ 1 อุ่นให้ละลาย รอให้เย็นแล้วเติมแร่ธาตุต่างๆร้อยละ 0.1 นำไปใส่ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งแร่ธาตุละ 6 ฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ลงไปร้อยละ 5 เขย่าให้เข้ากัน การศึกษาในสภาวะนิ่งให้นำฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน สำหรับการศึกษาในสภาวะเขย่าให้นำฟลาสก์วางบนเครื่องเขย่า(Inaubator shaker)ที่มีความเร็วรอบ100รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้และวัดพีเอชของน้ำหมักทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลส

เก็บเซลลูโลสด้วยการกรองโดยใช้บุชเนอร์(Buchner funnel) โดยใช้ผ้าขาวบางแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง วางเซลลูโลสบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำเซลลูโลสมาชั่งน้ำหนัก (กรัมเซลลูโลส/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) (ภาคผนวก ค)

3.5 เปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเหมาะสมของสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของแหล่งอาหารจากการทดลองขั้นต้นทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า นำสภาวะที่เหมาะสมเหล่านั้นมาเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ทั้งสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าเป็นเวลา7วันแล้วเปรียบเทียบผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากทั้งสองสภาวะ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส ทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ ดันคัน โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.0

3.6 การหมักโดยใช้อาหารสูตรเวย์

นำเวย์ที่ได้จากกระบวนการผลิตเต้าหู้มากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นต้มให้เดือดนาน 10 นาที เติมน้ำตาลทรายร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 กรดอะซิติกร้อยละ 0.1 ปรับพีเอชให้ได้ 4.5 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาพนิ่งนาน 12 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันนำมาวัดความหนาของแผ่นเซลลูโลสที่ได้โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์และผลผลิตของเซลลูโลสโดยการหาน้ำหนักแห้ง

3.6.1 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ผลิตได้

นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมักโดยใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าวและสูตรเวย์มาล้างด้วยน้ำหลายๆครั้งให้สะอาด วัดความหนาโดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ จากนั้นนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 นาน 30 นาทีเพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียที่เหลืออยู่ จากนั้นนำเข้าเครื่องอัดรีดน้ำแล้วนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งแผ่นเซลลูโลสที่ได้ รายงานเป็นค่าของน้ำหนักแห้งของแผ่นเซลลูโลสต่อปริมาตรอาหารที่ใช้

<u>หมายเหตุ</u> การวัดความหนาของแผ่นเซลลูโลส 1 แผ่นให้ทำการวัดความหนาที่จุดต่างๆ กัน 10 จุด แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยของแผ่นวุ้นนั้นๆ

3.7 ศึกษาการผลิตกระดาษจากเซลลูโลสร่วมกับไคโตซาน

3.7.1 การเตรียมสารละลายไคโตซาน

ชั่งไคโตซานที่บดให้เป็นผงละเอียด 10 กรัม จากนั้นปิเปตกรดอะซิติกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเล็กน้อยลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมผงไคโตซานทีละน้อยและเติมกรดอะซิติกเจือจางลงไปเล็กน้อยโดยทำให้ไคโตซานละลายได้หมด เติมน้ำลงไปเล็กน้อยคนตลอดเวลาและอุณหภูมิในการคนไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมไคโตซานและสารละลายกรดอะซิติกเจือจางทุกๆ 15 นาทีจนกระทั่งผงไคโตซานละลายหมด ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 500 มิลลิลิตร

3.7.2 การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียร่วมกับสารละลายไคโตซาน

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายไคโตซานลงไปในอาหาระเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานร้อยละ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปิดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารที่ใช้ บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาพนิ่งนาน 10 วัน เก็บเซลลูโลสที่ได้มาวัดความหนา

3.7.3 การผลิตกระดาษจากแบคทีเรียเซลลูโลส

โดยการนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาดแช่แผ่นเซลลูโลสในสารละลายแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปิดฝาภาชนะทิ้งไว้ 1 คืน เป็นการปรับแผ่นเซลลูโลสให้เป็นกลาง นำแผ่นเซลลูโลสต้มในน้ำเดือด 30 นาที เพื่อไล่แอมโมเนียออก นำมาเข้าเครื่องอัดรีดน้ำ จากนั้นนำไปฟอกสีโดยต้มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 นาน 30 นาที ล้างน้ำให้สะอาด เข้าเครื่องอัดรีดน้ำ ขึงตึงด้วยกรอบยึด อบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จะได้กระดาษจากเซลลูโลสจากนั้นนำไปศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของกระดาษที่ได้

นำกระดาษที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติเชิงกลดังนี้ ค่ามอดูลัสของยัง (Young's Modulus) ค่าความแข็งแรงดึง (Tensile Strength) และค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation at break) โดยใช้เครื่อง Texture analyzer รุ่น TA plus เปรียบเทียบคุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากการใช้สารละลายไคโตซานในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่เหมาะสมต่อการผลิตกระดาษและคัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตกระดาษต่อไป

3.9 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของกระดาษที่ผลิตได้

3.9.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ *Escherichia coli, Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus* sp. , *Serratia* sp., *Micrococcus* sp. โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ลงในอาหารเหลว MHB นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางสารละลายของเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำสารละลายของเชื้อไปวัดค่ากาดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร(ใช้อาหาร MHB เป็น Blank) เพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.9.2 วิธีการเตรียมกระดาษที่จะนำมาใช้ในการทดสอบ

กระดาษที่จะนำมาใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิด ดังนี้ กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นที่เหมาะสมและแผ่นที่เป็น ไคโตซานอย่างเดียว ซึ่งกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย และแผ่นที่เป็นไคโตซานอย่างเดียวจะใช้เป็นชุดควบคุม(control) ตัดกระดาษให้มีขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.9.3 การเตรียมแผ่นที่เป็นไคโตซานอย่างเดียวซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม

เตรียมโดยเทสารละลายไคโตซานลงในจานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง12 เซนติเมตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำแผ่นไคโตซานแช่ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นที่เป็นไคโตซานอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง อีกครั้ง จะได้แผ่นไคโตซาน

3.9.4 การเตรียมกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรเวย์โดยไม่ได้เติมสารละลาย ไคโตซาน เลี้ยงในสภาวะนิ่งนาน 10 วัน นำเซลลูโลสที่ได้มาแช่ในแอมโมเนียมไฮดรอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซด์ (NH_4OH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 12 ชั่วโมง นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้รีดน้ำออก นำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

3.9.5 การเตรียมกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นที่เหมาะสม

เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรเวย์ที่เติมสารละลายไคโตซานในความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3.2.2 เลี้ยงในสภาวะนิ่งนาน 10 วัน นำเซลลูโลสที่ได้มาแช่ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์(NH_4OH)ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 12 ชั่วโมง นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้รีดน้ำออก นำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

3.9.6 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของกระดาษที่ผลิตได้

โดยเตรียมอาหาร MHA เทใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) ชุบสารละลายของแบคทีเรียมาป้ายให้ทั่วอาหารแข็ง MHA จากนั้นวางแผ่นกระดาษลงบนอาหารที่ป้ายเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ การเช็คผลโดยวัดบริเวณส่วนใสรอบแผ่นกระดาษ (Clear zone or inhibition zone)

3.10 ทดสอบการซึมผ่านของแบคทีเรีย (Penetration of Bacteria)

3.10.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบเช่นเดียวกับข้างต้น

3.10.2 วิธีการเตรียมกระดาษที่จะนำมาใช้ในการทดสอบเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ตัดกระดาษให้มีขนาด 1.5 x 1.5 ตารางเซนติเมตร

3.10.3 วิธีการทดสอบการซึมผ่านของแบคทีเรียบนกระดาษที่ผลิตได้

โดยเตรียมอาหาร MHA เทใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้เย็น จากนั้นนำกระดาษที่ต้องการทดสอบวางลงบนจานอาหาร หยดสารละลายของเชื้อทดสอบลงบนกระดาษปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจสอบผลโดยยกแผ่นกระดาษออกจากจานเพาะเชื้อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อที่อยู่บนอาหารซึ่งอยู่ใต้แผ่นกระดาษ ลากบนจานอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญของจุลินทรีย์

3.11 ทดสอบความสามารถในการอมน้ำของกระดาษ

โดยการนำกระดาษมาชั่งเพื่อหาน้ำหนัก จากนั้นนำไปแช่น้ำ 1 นาที นำกระดาษขึ้นมาแขวนผึ่งไว้ 1 นาที ชั่งน้ำหนักของกระดาษอีกครั้ง

$$\text{ความสามารถในการอมน้ำของกระดาษ(ร้อยละ)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A = น้ำหนักของกระดาษหลังแช่น้ำ (กรัม)

B = น้ำหนักของกระดาษก่อนแช่น้ำ (กรัม)

3.12 ทดสอบความสามารถในการซึมน้ำของกระดาษ (มอก. 214-2520)

โดยหยดน้ำลงบนพื้นราบที่มีความเรียบเสมอกัน วางแผ่นกระดาษที่ต้องการทดสอบการซึมน้ำลงบนหยดน้ำพร้อมกับบันทึกเวลาจนกระทั่งหยดน้ำซึมขึ้นมาถึงด้านบนของกระดาษ

3.13 ทดสอบความสามารถในการซึมน้ำมันของกระดาษ

วิธีการหาการซึมน้ำมันของกระดาษสามารถทำได้ด้วยวิธีการเดียวกับการทดลองเรื่องความสามารถในการซึมน้ำของกระดาษ

3.14 ทดสอบอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (Determination of Water Vapour Transmission Rate)

โดยใช้วิธี ISO 151061 : 2003 (E) Plastic-Film and Sheeting – Determination of Water Vapour Transmission Rate Part I : Humidity Detection sensor method เครื่องมือที่ใช้ทดสอบคือ Water vapor permeation tester ; Lyssy L80-4000

3.15 ทดสอบอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน

โดยวิธี ASTM D 3985-02 Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastis Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor เครื่องที่ใช้ทดสอบคือ Oxygen permeation tester ; Illinois 8000

วิธีการทดสอบในข้อ 3.14 และ 3.15 ได้ส่งตัวอย่างกระดาษไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบบรรจุภัณฑ์ ศูนย์การบรรจุหีบห่อไทย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1. ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่น

จากการศึกษาองค์ประกอบบางประการของน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่นซึ่งนำมาใช้ผลิตเป็นเซลลูโลส พบว่าน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่นมีสภาพเป็นกรด มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.86 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.38 ซึ่งถือว่ามีปริมาณน้อยมาก แต่สอดคล้องกับรายงานของ (Ma. 2000) ที่น้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่นประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 0.32 ดังนั้นจึงต้องนำมาเติมสารอาหารต่างๆ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ต่อไป

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

4.2.1 แหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่น โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด เปรียบเทียบกันคือ น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 3 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เช่นกัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวแผ่นเซลลูโลสและคำนวณหาน้ำหนักแห้งต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตร พบว่าจากการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง เมื่อใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเซลลูโลสที่ได้มีน้ำหนักสูงสุดเท่ากับ 13.25 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นน้ำตาลแมนนิทอล แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Xue; et. al. (2004) ที่ผลิตเซลลูโลสจาก *A. xylinum* C5 ในสภาวะเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลแมนนิทอลจะให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด และในสภาวะเขย่าพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเซลลูโลสที่ได้สูงสุดเท่ากับ 5.97 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นการใช้น้ำตาลซูโครส แสดงดังตารางที่ 7 และรูปที่ 12

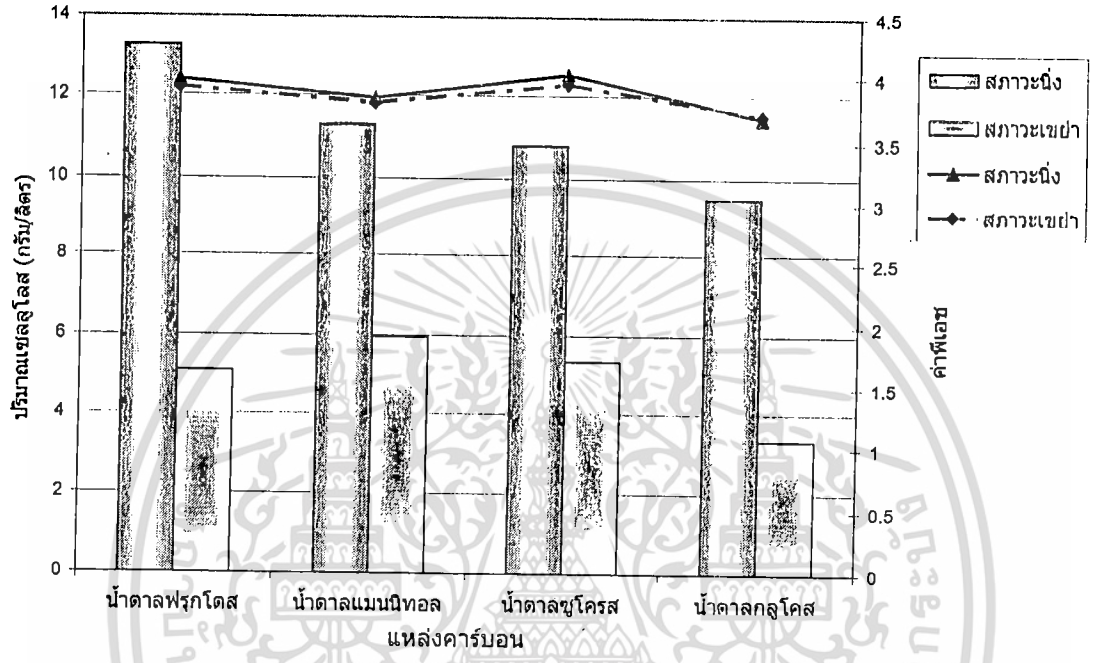
ตารางที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)[1]		พีเอชหลังการหมัก	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
น้ำตาลฟรุกโตส	13.25 [a(2)]	5.11 [a]	3.98	3.92
น้ำตาลแมนนิทอล	11.32 [ab]	5.97 [a]	3.84	3.80
น้ำตาลซูโครส	10.83 [ab]	5.36 [a]	4.03	3.95
น้ำตาลกลูโคส	9.49 [b]	3.33 [a]	3.69	3.71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 12 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

และเมื่อนำผลของปริมาณเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จากการเลี้ยงในสภาวะนิ่งปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลซูโครสไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) กับการใช้น้ำตาลกลูโคส สำหรับการเลี้ยงอย่างในสภาวะเขย่าพบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.2.2 <u>แหล่งไนโตรเจน</u>

เลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่น โดยทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด เปรียบเทียบกันคือ เปปโตน ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เช่นกัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวแผ่นเซลลูโลสและคำนวณหาน้ำหนักแห้งต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตร พบว่าจากการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง เมื่อใช้เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน เซลลูโลสที่ได้มีน้ำหนักสูงสุดเท่ากับ 13.67 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

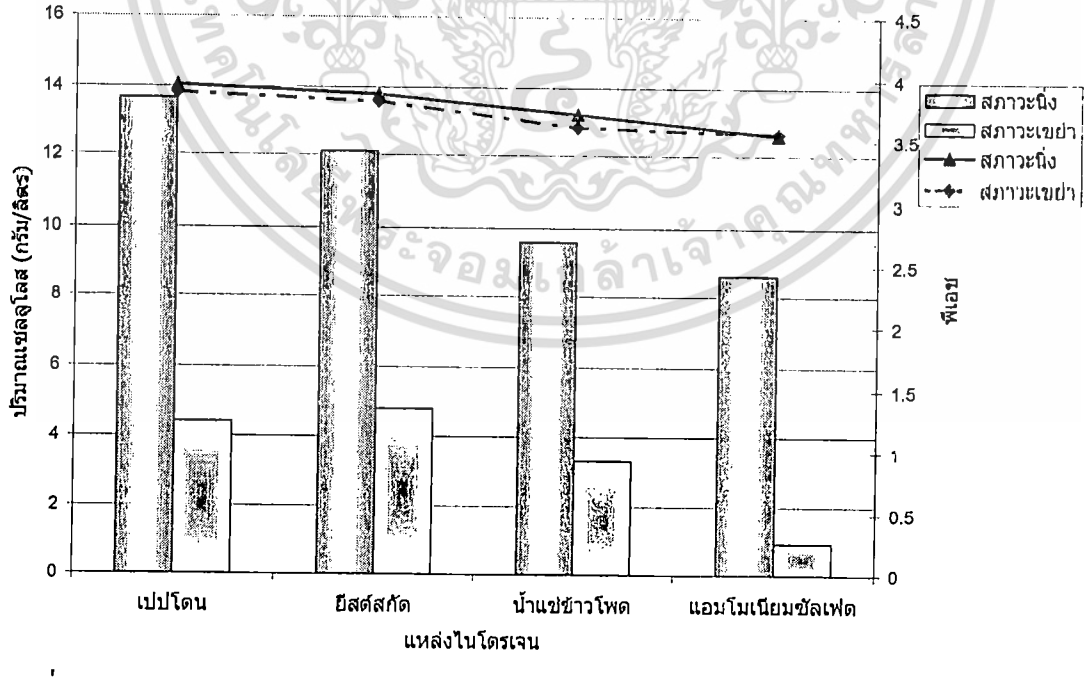
สกัด แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Xue; et. al. (2004) ที่ผลิตเซลลูโลสจาก *A. xylinum* C5 ในสภาวะเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้เปปโตนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต อัตราส่วน 1:1 จะให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด และในสภาวะเขย่าพบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัด เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเซลลูโลสที่ได้สูงสุดเท่ากับ 4.81 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นการใช้เปปโตน แสดงดังตารางที่ 8 และรูปที่ 13

ตารางที่ 8 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะ เขย่า

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) (1)		พีเอชหลังการหมัก	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
เปปโตน	13.67 a(2)	4.43 a	3.95	3.89
ยีสต์สกัด	12.12 a	4.81 a	3.88	3.82
น้ำแช่ข้าวโพด	9.59 b	3.32 b	3.72	3.61
แอมโมเนียมซัลเฟต	8.63 b	0.93 c	3.55	3.56

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 13 ผลของแหล่งไนโตรเจน ต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อนำผลของปริมาณเซลลูโลสจากแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จากการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้เปปโตน และยีสต์สกัด ไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการใช้น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับการเลี้ยงในสภาวะเขย่าพบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้เปปโตน และยีสต์สกัด ไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการใช้น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟตเช่นกัน

4.2.3 แร่ธาตุ

เลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่น โดยทำการศึกษาแร่ธาตุ 3 ชนิด เปรียบเทียบกันคือ กรดซิตริก แมกนีเซียมซัลเฟต และซิงค์ซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เช่นกัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวแผ่นเซลลูโลสและคำนวณหาน้ำหนักแห้งต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตร พบว่าจากการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง เมื่อใช้กรดซิตริกเป็นแร่ธาตุ เซลลูโลสที่ได้มีน้ำหนักสูงสุดเท่ากับ 13.07 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นซิงค์ซัลเฟต แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Xue; et. al. (2004) ที่ผลิตเซลลูโลสจาก *A. xylinum* C5 ในสภาวะเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตจะให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด และในสภาวะเขย่าพบว่าเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นแร่ธาตุ ปริมาณเซลลูโลสที่ได้สูงสุดเท่ากับ 5.15 กรัมต่อลิตร รองลงมาเป็นการใช้กรดซิตริก แสดงดังตารางที่ 9 และรูปที่ 14 แต่มีรายงานของ Hong J.; et. al. (2003) ที่ผลิตเซลลูโลสจาก *A. xylinum* V6 ในอาหารกลูโคส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เมื่อเติมกรดซิตริกลงไปร้อยละ 0.2 จะได้ปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 3.16 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติมแร่ธาตุจะได้ปริมาณเซลลูโลสเพียง 1.31 กรัมต่อลิตร แสดงว่าแร่ธาตุมีผลทำให้การผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด

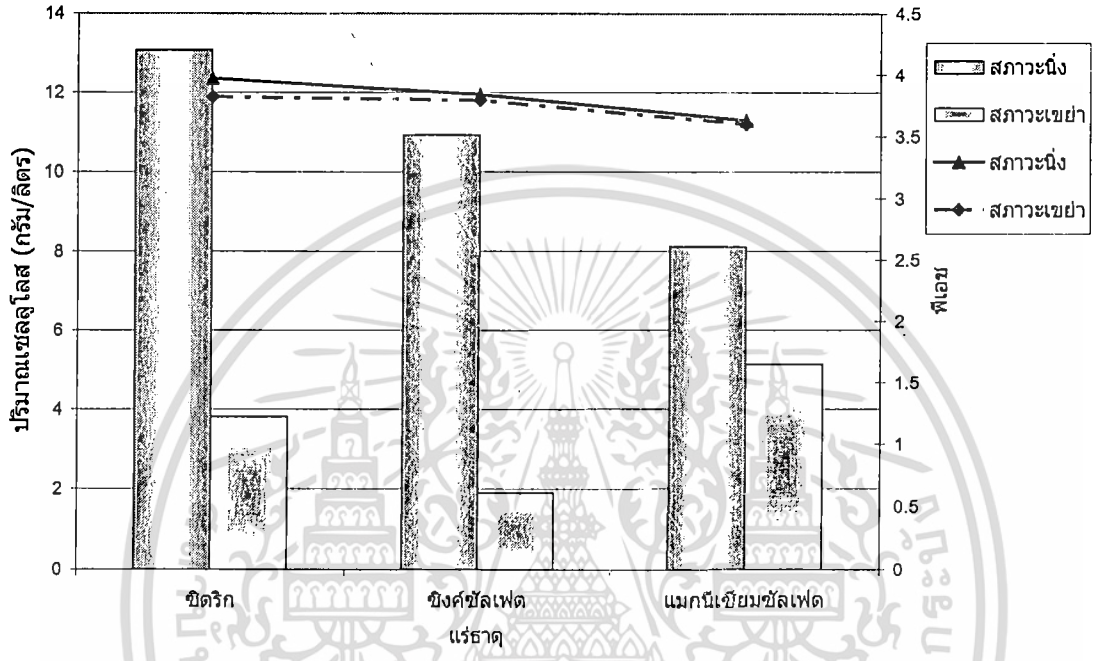
ตารางที่ 9 ผลของแร่ธาตุต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

แร่ธาตุ	ปริมาณเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)[1]		พีเอชหลังการหมัก	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
กรดซิตริก	13.07 [a(2)]	3.82 [a]	3.97	3.82
ซิงค์ซัลเฟต	10.92 [a]	1.90 [b]	3.84	3.79
แมกนีเซียมซัลเฟต	8.12 [b]	5.15 [a]	3.63	3.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 14 ผลของแร่ธาตุต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

และเมื่อนำผลของปริมาณเซลลูโลสจากแร่ธาตุแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จากการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้กรดซิตริก และซิงค์ซัลเฟตไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต สำหรับการเลี้ยงในสภาวะเขย่าพบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้กรดซิตริก และแมกนีเซียมซัลเฟตไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการใช้ซิงค์ซัลเฟต

4.3 เปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

เลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่น โดยในสภาวะนิ่งมีน้ำตาลฟรุกโตส เปปโตน และกรดซิตริก เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ส่วนในสภาวะเขย่ามี น้ำตาลแมนนิทอล ยีสต์สกัด และแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวแผ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

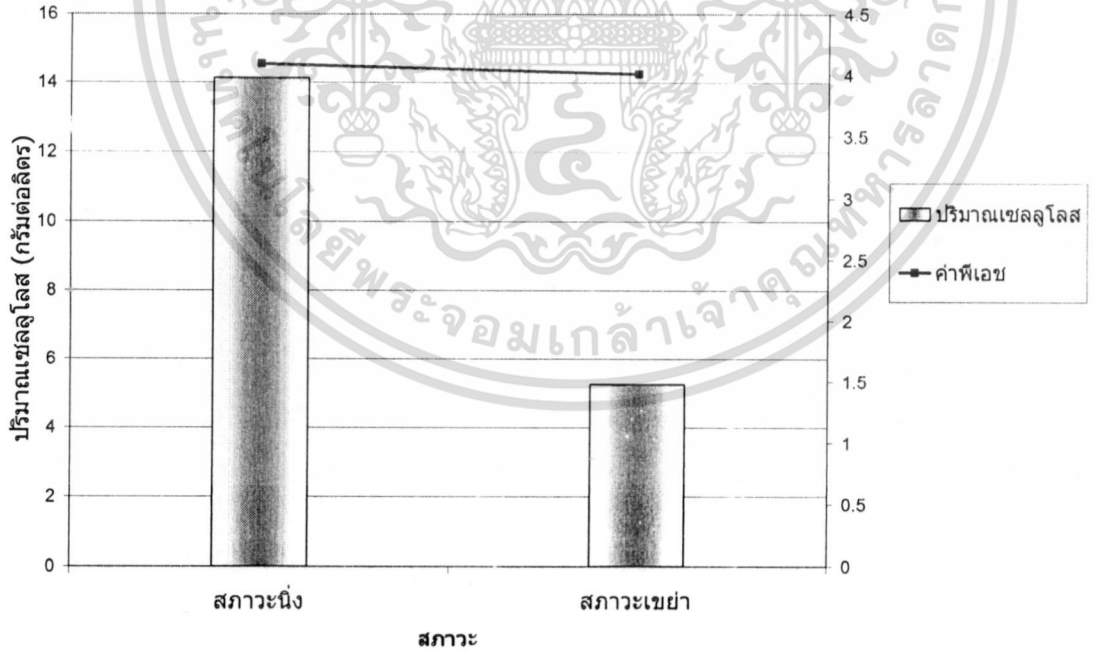
เซลลูโลสและคำนวณหาปริมาณเซลลูโลสต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตรของทั้ง 2 สภาวะ พบว่าเซลลูโลสที่เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งให้ผลผลิตเท่ากับ 14.13 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะเขย่าซึ่งได้เท่ากับ 5.26 และเมื่อนำผลของปริมาณเซลลูโลสที่ได้ของทั้ง 2 สภาวะมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 10 ผลการเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า เป็นเวลา 7 วัน

สภาวะ	ปริมาณเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร) (1)	พีเอชหลังการหมัก
สภาวะนิ่ง	14.13 a(2)	4.09
สภาวะเขย่า	5.26 b	4.01

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

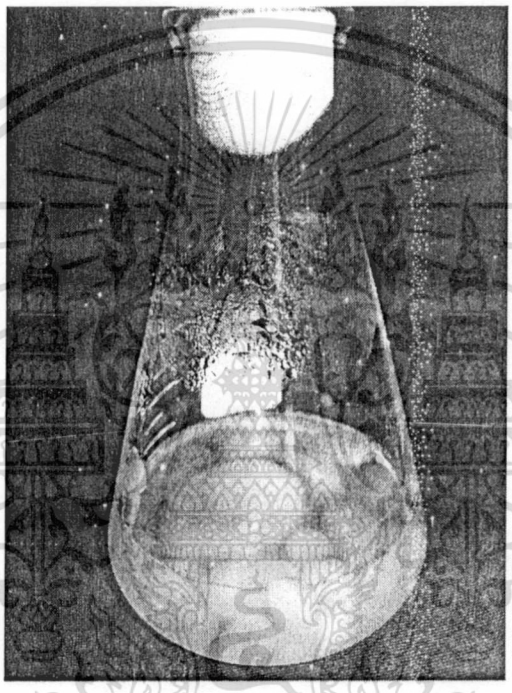
(2) ค่าที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 15 ผลเปรียบเทียบของการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้จากการศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเซลลูโลสที่เกิดในสภาวะทั้งสองนั้นแตกต่างกัน ซึ่งจากการสังเกตลักษณะการสร้างเซลลูโลสที่สภาวะนิ่งจะสร้างเซลลูโลสในลักษณะเป็นเส้นใยและรวมตัวกันเป็นแผ่นวุ้นหนา ลอยอยู่เหนือผิวหน้า อาหารเหลวเพื่อรับออกซิเจน ส่วนในสภาวะเขย่าการสร้างเซลลูโลสจะมีลักษณะเป็นเม็ดๆ หรือเกาะกันเป็นก้อน (pellet) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลอง
ของ ลำพึง (2002)



ภาพที่ 16 รูปแสดงเซลลูโลสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* TISTR 976 ในสภาวะเขย่า

นอกจากนี้ปริมาณผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยง *A. xylinum* TISTR 976 ในสภาวะนิ่งมีปริมาณมากกว่าอย่างเห็นได้ชัด (ประมาณ 2.5 เท่า) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการรบกวนการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter* ในระหว่างการเขย่า (Yoshino; et. al. 1996) และสอดคล้องกับรายงานของ Toyosaki; et. al. (1995) ; Tsuchida และ Yoshinaga (1997) ที่กล่าวว่าแบคทีเรีย *Acetobacter* ส่วนใหญ่แล้วจะผลิตเซลลูโลสในสภาวะนิ่งได้ปริมาณมากกว่าในสภาวะเขย่า มีเพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้มากกว่าในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ศึกษาการผลิตกระดาษจากเซลลูโลสร่วมกับไคโตซาน

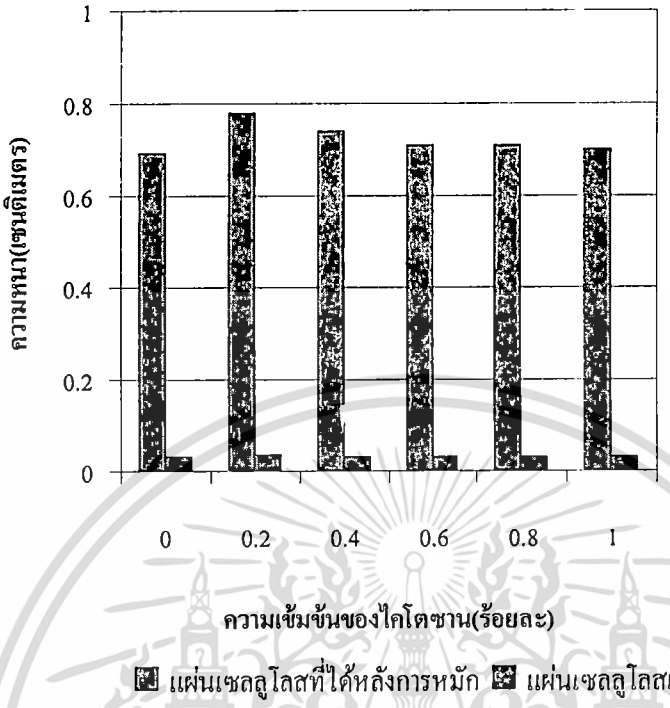
4.4.1 การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียร่วมกับสารละลายไคโตซาน

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรเวย์ผสมละลายไคโตซานลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานร้อยละ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เลี้ยงในสภาวะนิ่งนาน 10 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้วัดความหนาโดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ พบว่าการใช้สารละลายไคโตซานร้อยละ 0.2 จะทำให้ได้แผ่นเซลลูโลสมีความหนาสูงสุดเท่ากับ 0.78 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จากนั้นแช่แผ่นเซลลูโลสในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปิดฝาภาชนะทิ้งไว้ 1 คืน เป็นการปรับแผ่นเซลลูโลสให้เป็นกลาง นำแผ่นเซลลูโลสต้มในน้ำเดือด 30 นาที เพื่อไล่แอมโมเนียออก นำมาเข้าเครื่องอัดรีดน้ำ จากนั้นนำไปฟอกสีโดยต้มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 นาน 30 นาที ล้างน้ำให้สะอาด เข้าเครื่องอัดรีดน้ำ ขึงตึงด้วยกรอบยึด อบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จะได้แผ่นเซลลูโลสแห้งหรือกระดาษจากเซลลูโลสร่วมกับไคโตซาน นำแผ่นเซลลูโลสแห้งมาวัดความหนาโดยใช้ไมโครมิเตอร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของไคโตซานร้อยละ 0.2 มีความหนาของแผ่นเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 0.0333 เซนติเมตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้สารละลายไคโตซานในความเข้มข้นอื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ความหนาของแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรเวย์ภายหลังการเลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ความเข้มข้นของไคโตซาน (ร้อยละ)	ความหนาของแผ่นเซลลูโลสภายหลังการหมัก (เซนติเมตร)	ความหนาของแผ่นเซลลูโลสแห้ง (เซนติเมตร)
0	0.69	0.0315
0.2	0.78	0.0333
0.4	0.74	0.0325
0.6	0.71	0.0316
0.8	0.71	0.0316
1.0	0.70	0.0300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ความหนาของแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรเวย์ภายหลังการเลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

4.5 ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของกระดาษจากแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับสารละลายไคโตซาน

จากการผลิตกระดาษโดยใช้อาหารสูตรเวย์ผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้นต่างๆเลี้ยงเชื้อนาน 10 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษพบว่า การใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จะทำให้กระดาษที่ได้มีค่ามอดูลัสของยัง (Young's Modulus) เท่ากับ 2,107.67 MPa ซึ่งสูงกว่าการใช้สารละลายไคโตซานในความเข้มข้นอื่น และมีค่าใกล้เคียงกับแผ่นเซลลูโลสที่ไม่ได้ผสมสารละลายไคโตซานในอาหารเลี้ยงเชื้อ(ชุดควบคุม) โดยมีค่าเท่ากับ 2,108.39 MPa และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่ามอดูลัสของยังมีแนวโน้มลดลงดังแสดงในตารางที่ 4.3

เมื่อนำกระดาษที่ผลิตได้มาวัดค่าความแข็งแรงดึง (Tensile Strength) พบว่าการใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จะทำให้กระดาษที่ได้มีค่าความแข็งแรงดึงสูงกว่าการใช้สารละลายไคโตซานในความเข้มข้นอื่นๆรวมทั้งชุดควบคุม โดยมีค่าความแข็งแรงดึงเท่ากับ 56.18 MPa สำหรับค่าการยืด ณ จุดขาด(Elongation at Break) พบว่ากระดาษที่ได้จากการเติมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จะมีค่าการยืด ณ จุดขาดสูงสุดคือร้อยละ 2.33 ขณะที่การเติมสารละลายไคโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซานร้อยละ 0.4 0.6 0.8 1.0 และไม่เติมสารละลายไคโตซาน(ชุดควบคุม) มีค่าการยืด ณ จุดขาด ดังนี้ ร้อยละ 1.89 2.04 2.02 1.99 และ 1.26 ตามลำดับ

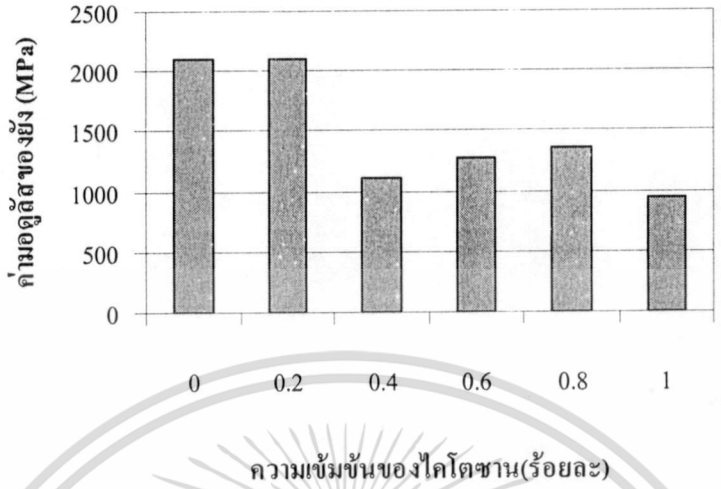
ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากระดาษที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรเวย์ที่เติมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จะทำให้กระดาษที่ได้มีค่ามอดูลัสของยัง ค่าความแข็งแรงดึง และค่าการยืด ณ จุดขาด สูงกว่าการเติมสารละลายไคโตซานในความเข้มข้นอื่นรวมทั้งการไม่เติมสารละลายไคโตซาน จึงได้เลือกความเข้มข้นสารละลายไคโตซานร้อยละ 0.2 มาผลิตกระดาษและศึกษาคุณสมบัติของกระดาษที่ผลิตได้ต่อไป

ตารางที่ 4.3 คุณสมบัติเชิงกลของกระดาษที่ผลิตจากแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับไคโตซานในความเข้มข้นที่ต่างกันในอาหารสูตรเวย์ภายหลังการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

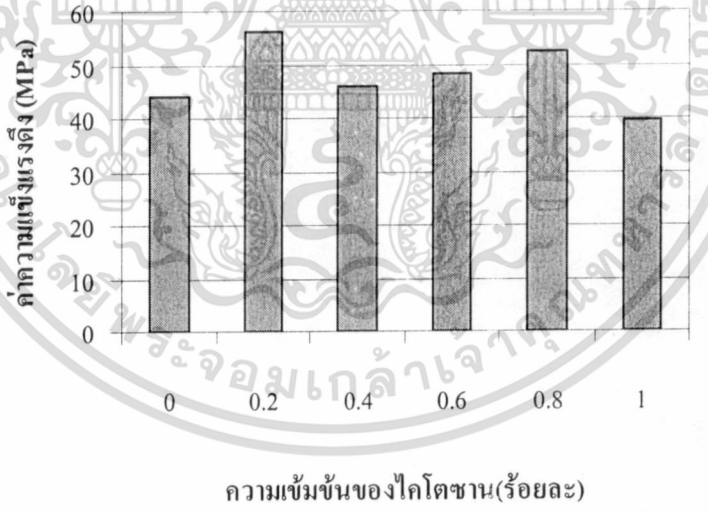
ความเข้มข้นของไคโตซาน (ร้อยละ)	ค่ามอดูลัสของยัง (MPa)	ค่าความแข็งแรงดึง (MPa)	ค่าการยืด ณ จุดขาด (ร้อยละ)
0	2,108.39^{a}	44.13^{a}	1.26^{b}
0.2	2,107.67^{a}	56.18^{a}	2.33^{a}
0.4	1,107.06^{c}	46.18^{a}	1.89^{ab}
0.6	1,278.71^{bc}	48.31^{a}	2.04^{a}
0.8	1,357.88^{b}	52.55^{a}	2.02^{a}
1.0	951.73^{d}	39.61^{a}	1.99^{a}

อักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

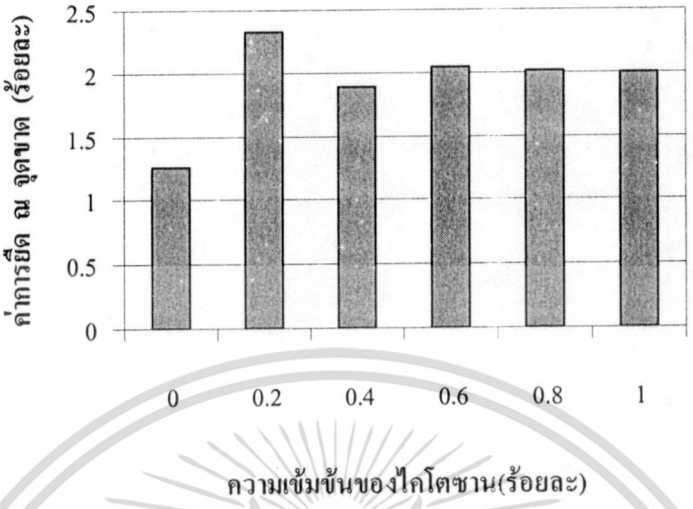


รูปที่ 4.4 ค่ามอดูลัสของยังที่ได้จากกระดาษที่ผลิตจากแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับไคโตซาน ใน ความเข้มข้นที่ต่างกันในอาหารสูตรเวย์ภายหลังการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.5 ค่าความแข็งแรงดึงที่ได้จากกระดาษที่ผลิตจากแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับไคโตซาน ในความเข้มข้นที่ต่างกันในอาหารสูตรเวย์ภายหลังการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ค่าการยืด ณ จุดขาดที่ได้จากกระดาษที่ผลิตจากแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับไคโตซานในความเข้มข้นที่ต่างกันในอาหารสูตรเวย์ภายหลังการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

4.6 ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของกระดาษ

จากการนำแผ่นกระดาษที่ได้จากเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และกระดาษที่ได้จากเซลลูโลสจากแบคทีเรียรวมทั้งแผ่นไคโตซานซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมวางลงบนอาหาร MHA ที่มีการใช้ไม้พันสำลีชุบสารละลายของแบคทีเรียมาป้ายให้ทั่วอาหารแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า กระดาษที่ผลิตได้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบทั้ง 7 ชนิด โดยไม่พบการสร้างบริเวณใสรอบแผ่นกระดาษที่นำมาวางบนอาหารรวมทั้งกระดาษที่เป็นชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5

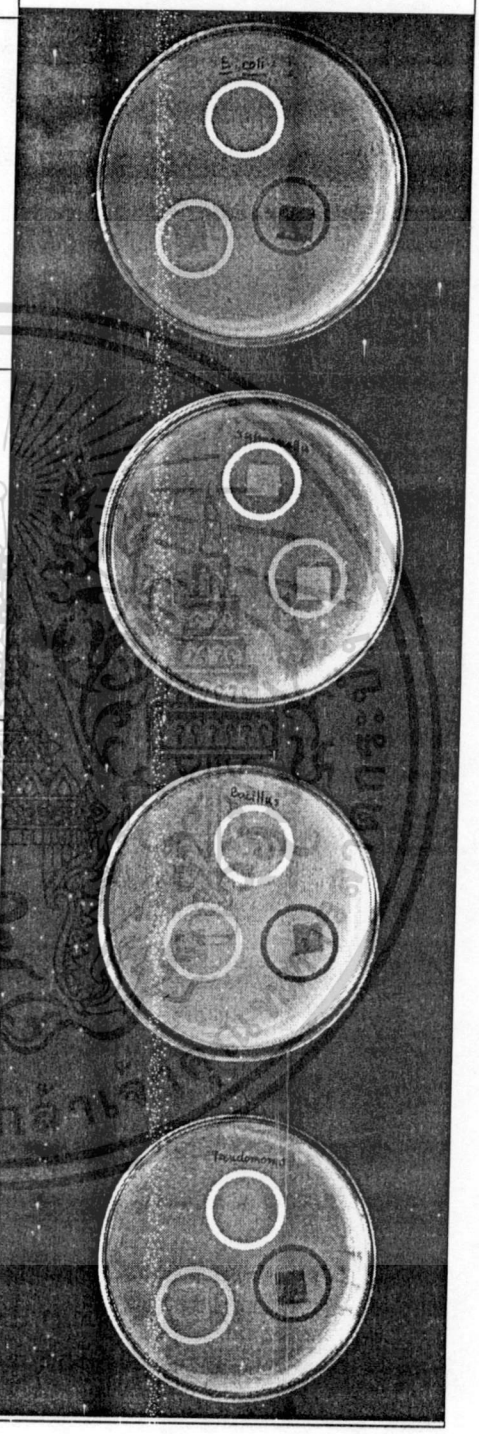
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition Zone) การเจริญของแบคทีเรีย เมื่อใช้ไคโตซานที่ผลิตได้มาทดสอบ

ชุดการทดลอง	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง(มิลลิลิตร)						
	E. coli	*Serratia* sp.	*Bacillus* sp.	*P. aeruginosa*	*Salmonella* sp.	*S. aureus*	*Micrococcus* sp.
กระดาษจากแบคทีเรียเซลลูโลส	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
แผ่นไคโตซาน	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
กระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับสารละลายไคโตซาน	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

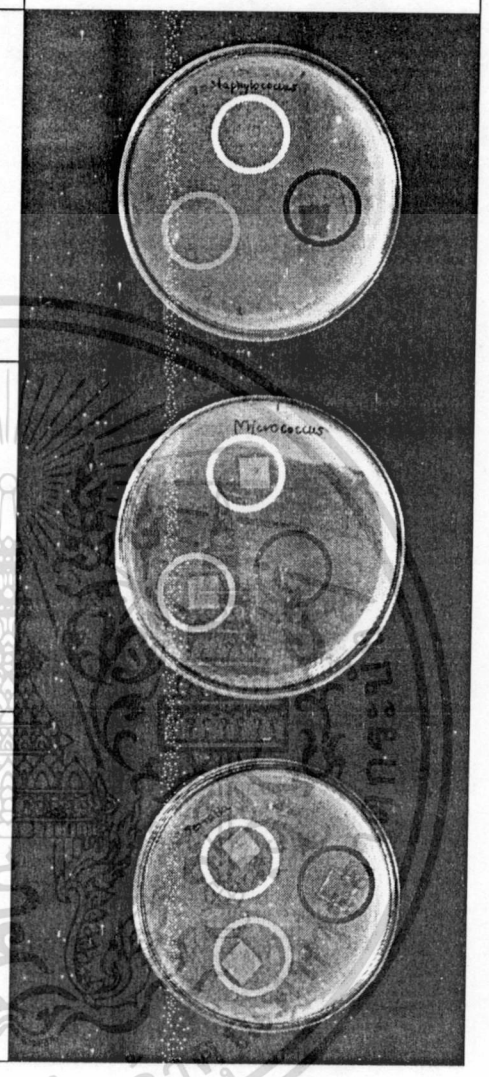
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ จากกระดาษที่ผลิตได้

เชื้อจุลินทรีย์	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น
Escherichia coli	
Salmonella sp.	
Bacillus sp.	
Pseudomonas aeruginosa	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น
Staphylococcus aureus	
Micrococcus sp.	
Serratia sp.	

กระดาษจากแบคทีเรียเซลลูโลส

แผ่นไคโตซาน

กระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับสารละลายไคโตซาน

4.7 การศึกษาการซึมผ่านของแบคทีเรีย

โดยเตรียมอาหาร MHA เทใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้เย็น จากนั้นนำกระดาษที่ต้องการทดสอบวางลงบนจานอาหาร หยดสารละลายของเชื้อทดสอบลงบนกระดาษปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจสอบผลโดยยกแผ่นกระดาษออกจากจานเพาะเชื้อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อที่อยู่บนอาหารซึ่งอยู่ใต้แผ่นกระดาษ ลากบนจานอาหาร MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหาร MHA แสดงว่าแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้ง 7 ชนิดไม่สามารถซึมผ่านกระดาษที่ผลิตได้

4.8 ทดสอบความสามารถในการอมน้ำของกระดาษ

โดยการนำกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย มาชั่งเพื่อหาน้ำหนัก จากนั้นนำไปแช่น้ำ 1 นาที นำกระดาษขึ้นมาแขวนผึ่งไว้ 1 นาที ชั่งน้ำหนักของกระดาษอีกครั้ง คำนวณหาค่าความสามารถในการอมน้ำของกระดาษตามภาคผนวก ข. พบว่ากระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีความสามารถในการอมน้ำร้อยละ 122 และกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย มีความสามารถในการอมน้ำร้อยละ 133 ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการอมน้ำของกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในเวลา 1 นาที

ผลิตภัณฑ์กระดาษ	น้ำหนักของแผ่นกระดาษที่นำมาทดสอบการอมน้ำ		ค่าการอมน้ำของกระดาษ (ร้อยละ)
	ก่อน	หลัง	
กระดาษจากเซลลูโลสผสมไคโตซาน	0.009	0.020	122
กระดาษจากเซลลูโลส	0.018	0.042	133

4.9 ทดสอบความสามารถในการซึมน้ำของกระดาษ

นำกระดาษที่ผลิตจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาเปรียบเทียบความสามารถในการซึมน้ำ โดยทำการหยดน้ำ (ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร) ลงบนพื้นราบเรียบโดยใช้หลอดหยด จากนั้นวางชิ้นทั้งสองชนิดลงไปแล้วทำการจับเวลาตั้งแต่เริ่มวางจนกระทั่งเห็นน้ำเริ่มซึมผ่านที่ด้านบนของกระดาษ พบว่า กระดาษที่ผลิตจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ใช้เวลาประมาณ 1.40 วินาที และกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียใช้เวลาประมาณ 1.37 วินาที ดังแสดงในตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบความสามารถในการอมน้ำของเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ชนิดของกระดาษ	ความสามารถในการซึมน้ำของกระดาษ(วินาที)
เซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2	1.40
กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	1.37

4.10 ทดสอบความสามารถในการซึมน้ำมันของกระดาษ

นำกระดาษที่ผลิตจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ0.2 และกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาเปรียบเทียบความสามารถในการซึมน้ำมัน โดยทำการหยดน้ำมัน (ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร) ลงบนพื้นราบเรียบโดยใช้หลอดหยด จากนั้นวางชิ้นทั้งสองชนิดลงไป แล้วทำการจับเวลาตั้งแต่เริ่มวางจนกระทั่งเห็นน้ำมันเริ่มซึมผ่านที่ด้านบนของกระดาษ พบว่ากระดาษที่ผลิตจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียไม่มีความสามารถในการซึมน้ำมัน

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการซึมน้ำมันของกระดาษเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ชนิดของกระดาษ	ความสามารถในการซึมน้ำมันของกระดาษ(วินาที)
เซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2	-
กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	-

- ไม่มีความสามารถในการซึมน้ำมัน

4.11ทดสอบอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ

พบว่ากระดาษที่ได้จากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรเวย์ผสมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำเท่ากับ 1,105 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 และกระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยไม่ได้ผสมสารละลายไคโตซาน(ชุดควบคุม) มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำเท่ากับ 916 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบอัตราการซึมผ่านไอของกระดาษเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ชนิดของกระดาษ	อัตราการซึมผ่านไอน้ำ (กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน)
เซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2	1,105
กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	916

4.12ทดสอบอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน

พบว่ากระดาษที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสร่วมกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.2 มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนเท่ากับ 22,750 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวันที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 0 และกระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลสโดยไม่ได้ผสมสารละลายไคโตซาน (ชุดควบคุม) มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนเท่ากับ 1,256 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 0 ของกระดาษเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ชนิดของกระดาษ	อัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน)
เซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2	22,750
กระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	1,256

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 ศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่น

จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่นซึ่งนำมาใช้ผลิตเป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย พบว่าน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่นมีสภาพเป็นกรด มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.86 และมีปริมาณโปรตีนเมื่อใช้วิธีวิเคราะห์แบบเจลดาห์ลในรูปของ crude protein ร้อยละ 2.18

5.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

5.2.1 แหล่งคาร์บอน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในสภาวะนิ่งนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆกัน พบว่าน้ำตาลฟรุกโตสจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 13.25 กรัมต่อลิตร สำหรับการเลี้ยงในสภาวะเขย่าพบว่าน้ำตาลแมนนิทอลจะให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด คือ 5.97 กรัมต่อลิตร เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จากการเลี้ยงในสภาวะนิ่งปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลซูโครสไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการเลี้ยงในสภาวะเขย่าพบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากน้ำตาลทั้งสี่ชนิดไม่มีความแตกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5.2.2 แหล่งไนโตรเจน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในสภาวะนิ่งนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน พบว่าเปปโตนจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 13.67กรัมต่อลิตร สำหรับการเลี้ยงในสภาวะเขย่าพบว่ายีสต์สกัดจะให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด คือ 4.81 กรัมต่อลิตร เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จากการเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้เปปโตน และยีสต์สกัด ไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการเลี้ยงในสภาวะเขย่าพบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้เปปโตน และยีสต์สกัด ไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เช่นกัน

5.2.3 แร่ธาตุ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในสภาวะนิ่งนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้แร่ธาตุต่างๆกัน พบว่ากรดซิตริก จะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 13.07 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตร สำหรับการเลี้ยงในสภาวะเขย่า พบว่าแมกนีเซียมซัลเฟต จะให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด คือ 5.15 กรัมต่อลิตร เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า

จากการเลี้ยงในสภาวะนิ่งปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้กรดซิตริก และซิงค์ซัลเฟตไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับการเลี้ยงในสภาวะเขย่าพบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต และกรดซิตริกไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการซิงค์ซัลเฟตที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5.3 เปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมของสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

การศึกษาเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้แผ่นในสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า โดยใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละสภาวะ คือสภาวะนิ่งใช้ น้ำตาลฟรุกโตส เปปโตน และกรดซิตริก ส่วนสภาวะเขย่าใช้ น้ำตาลแมนนิทอล ยีสต์สกัด และแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุตามลำดับ เมื่อทำการเก็บเกี่ยวปริมาณเซลลูโลสในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าจะได้ปริมาณเซลลูโลสเท่ากับ 14.13 และ 5.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองนี้การผลิตเซลลูโลสในสภาวะนิ่งจะให้ผลผลิตสูงกว่าสภาวะเขย่าและเมื่อนำผลที่ได้นี้ไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5.4 การหาระยะเวลาและสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแผ่นเซลลูโลสจากอาหารสูตรเวย์

โดยใช้เชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 พบว่า ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 6 วัน เซลลูโลสที่ผลิตได้จากเวย์จะมีความหนาและน้ำหนักแห้งของแผ่นเซลลูโลสสูงสุด โดยมีค่า 0.68 เซนติเมตร และ 0.778 กรัมต่อปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรเวย์ผสมกับไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำแผ่นเซลลูโลสที่ผลิตได้มาผลิตเป็นกระดาษ นำกระดาษที่ได้ไปวัดความหนาของแผ่นเซลลูโลสก่อนและหลังทำเป็นกระดาษ พบว่าที่ความเข้มข้นของไคโตซานร้อยละ 0.2 มีความหนาของแผ่นเซลลูโลสก่อนทำกระดาษเท่ากับ 0.78 เซนติเมตร ความหนาของแผ่นเซลลูโลสแห้ง(หลังจากทำเป็นกระดาษแล้ว)เท่ากับ 0.033 เซนติเมตร ซึ่งมีค่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้สารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นอื่นๆ และกระดาษที่ได้มีค่ามอดูลัสของยัง เท่ากับ 2107.67 MPa ค่าความแข็งแรงดึงเท่ากับ 56.18 MPa และค่าการยืด ณ จุดขาดเท่ากับร้อยละ 2.33 ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกระดาษที่ใช้ไคโตซานความเข้มข้นอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการนำกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียผสมกับไคโตซานในความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และกระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบทั้ง 7 ชนิด และเมื่อนำกระดาษที่ได้มาทดสอบความสามารถในการซึมผ่านได้ของแบคทีเรียบนกระดาษ พบว่าแบคทีเรียที่นำมาทดสอบทั้ง 7 ชนิดไม่สามารถซึมผ่านกระดาษที่ผลิตได้ กระดาษที่ผลิตได้มีความสามารถในการอมน้ำร้อยละ 122 มีความสามารถในการซึมน้ำ โดยใช้เวลา 1.40 และไม่มีความสามารถในการซึมน้ำมัน

กระดาษที่ผลิตได้มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำเท่ากับ 1,105 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 ขณะที่กระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลสโดยไม่ได้ผสมสารละลายไคโตซาน(ชุดควบคุม) มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำเท่ากับ 916 กรัมต่อตารางเมตรต่อวัน กระดาษที่ผลิตได้มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนเท่ากับ 22,750 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 0 ขณะที่กระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลสโดยไม่ได้ผสมสารละลายไคโตซาน(ชุดควบคุม) มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนเท่ากับ 1,256 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อตารางเมตรต่อวัน ซึ่งอัตราการซึมผ่านของไอน้ำและอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของกระดาษที่ได้จะมีค่าสูงกว่ากระดาษที่เป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรีย แสดงว่าเมื่อผสมสารละลายไคโตซานลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจะสร้างแผ่นเซลลูโลสขึ้นมาโดยมีไคโตซานเข้าไปมีส่วนเกี่ยวข้องบกับการสร้างเซลลูโลส ทำให้แผ่นเซลลูโลสที่ได้มีช่องว่างมากขึ้น ไอน้ำและก๊าซออกซิเจนซึมผ่านได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นีโลบล สุวรรณาภินันทน์. 2545. กระดาษ parchment ชนิดใหม่จากวุ้นน้ำมะพร้าว เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร "เทคนิควิธีการผลิตกระดาษด้วยวุ้นน้ำมะพร้าวและนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์แบบ" 20-23 พฤษภาคม 2545

วราวุฒิ ครูส่ง, กรวิภา สุขศรีวงศ์ และปนัดดา พวงเกษม. 2536. การผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ Acetobacter xylinum ในน้ำหางนม. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 1(1) : 47-50

เยาวพา สุวัตถิ. http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/cellu.html. งานวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ.

อุทัย ไชยานนท์. 2543. ถั่วเหลือง. พิมพ์ครั้งแรก. กรุงเทพ.

Alban, C.A. 1962. Studies on the optimum conditions for Nata de coco bacterium or Nata formation in coconut water. The Philipine Agricutruist. 45 : 490-415.

Ebner, H. 1982 Vinegar. In G. Reed (ed.). Proscott and Dunn's Industrial Microbilogy. 4th. Reed. A VI Publishing com., Inc Wesport, Connecticut.

Cousins, S. K. and R. M. Brown. 1995. Cellulose microfibril assembly : computational molecular machanics energy analysis flavous bonding by Vander Waals forces as the intial step in crystallization. Polymer. 36 : 3,885-3,888

Crueger, W. and A, Crueger. 1982. Biotechnology : A textbook of industrial Microbiology. Sinauer Associates, Sunderland. P.380.

Duangjai Ochaikul, Suparat Rakchonlatee, Thanan Fapratanchai, Parkporn Soisant and Suranart Aramruang. 2004. Studied on optimal condition for paper production from bacterial cellulose *Acetobacter xylinum* TISTR 976. Processdings of The 1st KMITL International Conference, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Guzman, M.P., E.F. Alabastro and C.B. Tinsay. 1982. A submerged process for the production of Nata. NRCP Research Bull. 37(1) : 1-50.

Hestrin, S., M. Ascher and J, Mager. 1947. Synthesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum*. Nature (London). 159 : 64-65.

Ishikawa, A., M, Matsuoka, T, Tsuchuida and F, Yoshinaga. 1995. Increase in cellulose production by sulfaquanidine-resistant mutant derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans*. Bioscience Biotechnology Biochemistry 59(2) : 2,259 – 2,260.

Johnson, D.C. 1990. Pulp 2 Paer, May, 105-107.

Krusong, W. and T, Yoshida. 1995. Counteraction of negative effect on cellulose formation in agitaed culture of *Acetobacter xylinum* by addition of alginate gel beads as microaerophilic carrier. Annual Repport International Conference Biotechnology, Japan. Pp. 155-200.

Kouda, T., Y, Hisato, Y. Fumihiro and Y. Hisato. 1997. Effect of agitator configulation on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. J. Fermentataion and Bioengineering. 83(4) : 371-374.

Lapuz, M.M., E.G. Gallardo and M.A. Palo. 1967. The Nata organism-culture requirements characteristics and identity. The Philippine J. Science. 96 : 91-109.

Masaoka, S. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum* . J. Ferment. Bioeng. 75 : 18-22.

Naritomi, T., T. Kouda, H. Yano and F. Yoshinaga. 1998°. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. J.Fermentation and Bioengineering. 85910 : 89-95.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ohara, H., K. Hiyama and T. Yoshida. 1992. Kinetic study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis.* Applied Microbiology Biotechnology. 38 : 403-407.

Pranee Lertsutthiwong, Suwalee Chandrkrachang, Mousa M. Nazhad and Willem F. Stevens. Chitosan as a dry strength agent for paper. *Appita Journal*. 55(3): 208-212.

Satoshi, M., T. Ohe and N. Sakota. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum.* J. of fermentation and Bioengineering. 75 : 18-22.

Stanbury, P. F. and Whitaker. 1984. Principle of fermentation Technology. Oxford, Pergamon Press. P.459.

Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, M. Tsuchida and F. Yoshonaga. 1995. Screening of bacterial cellulose – producing *Acetobacter* strain suitable for agitated culture. Bioscience Biotechnology Biotechnology. 59 : 1,459 – 1,502.

Yamanaka et al. 1989. Yhe structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. J. Mat. Sci. 24. 3,141-3,145.

Yoshinaga, F., T. Naota and W. Kunihiko. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a industrial material. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 61 : 219-224.

http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/cellu.html

http://www. material.chula.ac.th/chitosan/CCB_thai_p9.htm

http://www.res.titech.ac.jp/~junkan/english/cellulose/.

http://www.smejelly.com/nata_whats.asp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://3w.doae.go.th/webboard/view.asp?room=6&ID=4189

http://thailabonline.com/chitin-chitosan.htm .

http://www.idahoforests.org/paprmake.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้