

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

**การแยกและจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้ในเขตร้อน และนำ
แบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษ**

**Isolation and Identification of Bacterial Cellulose from Tropical Fruits and
Paper Production from These Isolated**

รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล

RCH
TP
248.65
.C40
ด164ก

เลขหมู่.....**115226**
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.. **22 ก.พ. 2553**

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2552

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1226093
.....
1.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้ทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2552 ซึ่งสำเร็จด้วยความร่วมมือของนักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนมาใช้ในการทดลอง

รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล

หัวหน้าโครงการวิจัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะพร้าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์จากน้ำมันมะพร้าว โดยให้ผลผลิตเซลล์ 0.42 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อนำแผ่นเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมมาผลิตกระดาษ กระดาษที่ได้มีความหนา 0.02 เซนติเมตร นำกระดาษที่ได้มากรองอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำมันหอมระเหยจากพืช พบว่าไม่สามารถกรองได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Project Isolation and Identification of Bacterial Cellulose from Tropical fruits and Paper Production from These Isolated

Researcher Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Miss Mawinee Yamchantramat

ABSTRACT

Screening and selection of bacterial cellulose were from rotting fruits : calabura (*Muntingia calabura* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). Twenty isolated from each fruit which screen were selected as high cellulose producer. These isolated were further tested for their cellulose production under static and shake flask conditions. Three isolated from calabura : T01, T07 and T11 could produce cellulose 0.3620 ± 0.0154 0.3508 ± 0.0176 and 0.4416 ± 0.0376 g/100ml. from static conditions, respectively. Under shake flask conditions, the yield of cellulose were lower this static conditions. P06, P09 and P10 were isolated from papaya and gave the high yield of cellulose in static conditions. P06, P09 and P10 could produce cellulose 0.5485 ± 0.0635 0.4745 ± 0.0139 and 0.4786 ± 0.0543 g/100ml. from static conditions, respectively. Six isolated which gave the high yield of cellulose (T01 T07 T11 P06 P09 and P10) were studied on morphological and physiological. The colony on GEY Agar were white, round and smooth, gram negative, rod shape, catalase positive, could not oxidize ethanol to acetic acid except T07 and T12, oxidative microorganisms, could not produce acetoin from glucose, no indole and hydrogen sulfide production. Glucose was carbon source and could produce hydroxyl acetone from glycerol.

P09 and P11 were identified by partial 16s rDNA sequence analysis, they were *Gluconacetobacter nataicola*

Bacterial cellulose was fermented by *Gluconacetobacter nataicola* in coconut water under static culture for 7 days. The result showed that 5% (wt/v) sucrose, 0.1% (wt/v) corn steep liquor were suitable for carbon source and nitrogen source, respectively. Optimal temperature was 30°C, pH 5.5 and 0.1% (wt/v) ethanol. The yield of bacterial cellulose in these conditions was 0.42 g/100ml. Paper production from bacterial cellulose on these condition was thin (0.02 cm). Application of these paper to filter culture medium and aroma oil which was extracted from plant. It found that these paper could not filtered all of these.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
สารบัญเรื่อง	6
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	8
บทที่ 1 บทนำ	9
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	9
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	9
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	9
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	28
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานและการทดลอง	39
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงาน	82
บรรณานุกรม	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 การแปรผลและบันทึกผลการทดสอบ Oxidative fermentative	31
ตารางที่ 3.2 การแปรผลและบันทึกผลการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	33
ตารางที่ 3.3 การแปรผลและบันทึกผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต	33
ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตะขบและมะละกอที่เน่าเสีย	40
ตารางที่ 4.2 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียเชลลูโลส ที่แยกได้จากตะขบและมะละกอ	50
ตารางที่ 4.3 ปริมาณเชลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะขบในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า	61
ตารางที่ 4.4 ปริมาณเชลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากมะละกอในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า	62
ตารางที่ 4.5 การทดสอบทางชีวเคมีในการจัดจำแนกแบคทีเรียเชลลูโลส ที่แยกได้จากตะขบและมะละกอ	66
ตารางที่ 4.6 ผลผลิตเชลลูโลส ความหนา และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ <i>A.xylinum</i> TISTR 976 และเชื้อ <i>G. nataicola</i>	69
ตารางที่ 4.7 การใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i>	70
ตารางที่ 4.8 การใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i>	72
ตารางที่ 4.9 การใช้อุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i>	74
ตารางที่ 4.10 การใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i>	76
ตารางที่ 4.11 การใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ <i>G. nataicola</i>	78
ตารางที่ 4.12 ผลผลิตเชลลูโลส ความหนา และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ของเชื้อ <i>G. nataicola</i> และเชื้อ <i>A. xylinum</i> ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว	80

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1	วิธีการสังเคราะห์เซลลูโลสของแบคทีเรีย	11
รูปที่ 2.2	โครงสร้างของ cellulose synthase operon	12
รูปที่ 2.3	การสร้างเซลลูโลสในเซลล์ของแบคทีเรีย	13
รูปที่ 2.4	สาย DNA เกี่ยวข้องพันกับโปรตีนและห่อตัวเป็นสายโครมาตินจนเห็นเป็นโครโมโซมในระยะเมตาเฟส	19
รูปที่ 2.5	หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR	20
รูปที่ 2.6	แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้น โดยวิธี agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยสี ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้แสง ultraviolet	21
รูปที่ 2.7	agarose gel electrophoresis นำไปส่องในแสงอัลตราไวโอเลต ethidium bromide ที่ย้อมติดดีเอ็นเออยู่จะเรืองแสงสีส้ม	22
รูปที่ 2.8	Hybridization	23
รูปที่ 2.9	การเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่แผ่น nitrocellulose	24
รูปที่ 2.10	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (1)	25
รูปที่ 2.11	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (2)	26
รูปที่ 4.1	ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะกอนในอาหาร HS medium ในสถานะนิ่งและสถานะเขย่า	63
รูปที่ 4.2	ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากมะละกอในอาหาร HS medium ในสถานะนิ่งและสถานะเขย่า	64
รูปที่ 4.3	ผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ <i>A. xylinum</i> TISTR 976 และเชื้อ <i>G. nataicola</i> ในการหมักที่สถานะนิ่ง อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน	69
รูปที่ 4.4	การใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i> ต่อผลผลิตเซลลูโลส	71
รูปที่ 4.5	การใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i> ต่อผลผลิตเซลลูโลส	73
รูปที่ 4.6	การใช้อุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i> ต่อผลผลิตเซลลูโลส	75
รูปที่ 4.7	การใช้ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i> ต่อผลผลิตเซลลูโลส	77
รูปที่ 4.8	การใช้ความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ <i>G. nataicola</i> ต่อผลผลิตเซลลูโลส	79

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากเชื้อที่นำมาใช้ผลิตเซลล์ลูโลสหรือวุ้นมะพร้าวเป็นเชื้อ *Acetobacter xylinum* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเซลล์ลูโลสสูง แต่เนื่องจากเมื่อเลี้ยงไปนานๆ เชื้อสายพันธุ์นั้นก็ตายได้ง่าย ผลผลิตเซลล์ลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงแต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอ ในงานวิจัยนี้จึงสนใจหาสายพันธุ์จากแบคทีเรียเซลล์ลูโลสที่มีอยู่ในผลไม้พื้นเมืองในประเทศไทย ซึ่งอาจจะได้สายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์เดิมแต่มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลล์ลูโลสที่สูงขึ้น จากนั้นนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาทำการจัดจำแนกว่าเป็นสายพันธุ์ใด นำสายพันธุ์ที่ได้มาเป็นหัวเชื้อในการผลิตกระดาษโดยใช้น้ำมะพร้าวแก่ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อผลิตเซลล์ลูโลสจากนั้นนำเซลล์ลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียมาผลิตกระดาษโดยกรรมวิธีต่างๆ เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ากระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลล์ลูโลส มีสมบัติทางกล เช่น ค่าความต้านทานแรงดึง (Tensile strength) ค่ามอดุลัสของยังส์ (Young's Modulus) และค่าความยืด ณ จุดขาด (Elongation at break) มีค่าสูงเมื่อเทียบกับกระดาษโดยทั่วไป รวมทั้งอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน และค่าการซึมผ่านของไอน้ำน้อยกว่ากระดาษโดยทั่วไป กระดาษชนิดค่อนข้างเหนียวและเปราะ จึงมีปัญหาในการนำมาขึ้นรูป งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะสารบางชนิดมาผสมในเซลล์ลูโลสจากแบคทีเรีย เช่น พลาสติก ไชเซอร์ชนิดต่างๆ และพอลิเมอร์บางชนิด ซึ่งคาดหวังว่ากระดาษที่ได้จะมีสมบัติที่ดีขึ้นกว่าเดิม สามารถที่จะนำกระดาษไปใช้เป็นภาชนะบรรจุอาหาร หรือกระดาษลำโพงได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์กระดาษที่ได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1 เพื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียเซลล์ลูโลสที่สามารถผลิตเซลล์ลูโลสจากผลไม้ในเขตร้อน
- 2 ศึกษาและค้นคว้าสายพันธุ์ของแบคทีเรียเซลล์ลูโลสที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้
- 3 ศึกษาการนำแบคทีเรียเซลล์ลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษโดยวิธีการต่างๆ และศึกษาสมบัติของกระดาษที่ได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลล์ลูโลสได้จากผลไม้ในเขตร้อนและคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเซลล์ลูโลสได้สูง นำมาจัดจำแนกโดยดูลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของ

16 s rDNA จากนั้นนำแบคทีเรียเซลล์โลสที่ผลิตเซลล์โลสได้สูงมาใช้ผลิตกระดาษ และศึกษาสมบัติของกระดาษที่ได้

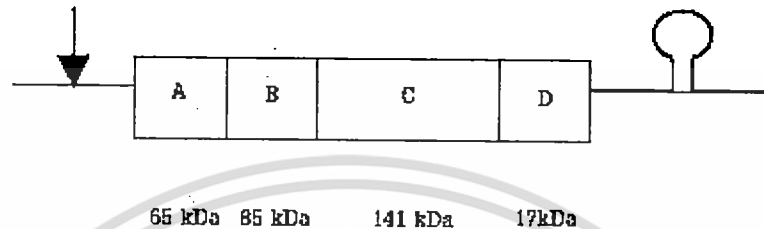
1.4 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

- 1.4.1 สามารถรู้เกี่ยวกับความหลากหลายของแบคทีเรียเซลล์โลสที่แยกได้จากผลไม้ในเขตร้อน และนำแบคทีเรียเซลล์โลสที่มีความสามารถในการผลิตเซลล์โลสได้สูงมาใช้ผลิตกระดาษโดยวิธีการต่างๆ ศึกษาสมบัติของกระดาษที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำกระดาษที่ได้ไปประยุกต์ใช้งานต่อไป
- 1.4.2 มหาวิทยาลัยและสถาบันที่ทำงานวิจัยต่างๆ รวมทั้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตกระดาษสามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะมีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเส้นใยนี้จะประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 4 ชนิด ซึ่งจะถูกรวบรวมโดย cellulose synthase operon (ภาพที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ cellulose synthase operon

ที่มา : <http://www.gpo.or.th>

โดยยีนส์ที่ควบคุมการสังเคราะห์เซลลูโลสคือ bcs A, bcs B, bcs C และ bcs D ได้มีการทดลองพบว่ายีนส์ bcs A, B และ C มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ส่วนยีนส์ bcs D นั้นจะมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียซึ่งผลของการทดลองพบว่าถ้าทำให้ยีนส์ bcs D ลดกิจกรรมการทำงานลง พบว่าจะทำให้การสังเคราะห์เซลลูโลสลดลงถึง 40 เปอร์เซ็นต์

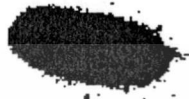
2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter* คือ การเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการให้อากาศและมีการเขย่าจะให้ผลดีที่สุด สำหรับการสร้างเซลลูโลสจะเกิดขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรียและเส้นใยเหล่านี้จะถูกขับออกมาทางรูของเซลล์เมมเบรน (ภาพที่ 2.3) โดยในการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* นี้ใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และจะให้เซลลูโลสสูงถึง 9 กรัมต่อลิตร

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส ของเชื้อ *Acetobacter* นั้นได้ทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง (static) และสภาวะที่มีการเขย่า (agitation) พบว่าการเลี้ยงแบบสภาวะนิ่งจะทำให้เส้นใยเจริญและจับตัวกันแน่น ทำให้สภาพอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงกว่าการเลี้ยงแบบเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มกรดคาร์บอนิกจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตดีขึ้นในช่วงของ lag phase และยังช่วยเพิ่มการผลิตเซลลูโลสด้วย การเพิ่มกรดแลคติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้เชื้อสังเคราะห์ ATP ได้ดีขึ้น โดยจะไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ lactate dehydrogenase และ

TCA cycle นอกจากนี้ปัจจัยอื่น ได้แก่ ชนิดของใบพัดในถังหมัก ความเร็วรอบในการกวน ปริมาณอากาศและ พีเอชก็มีผลต่อการเลี้ยง cellulose ด้วย

a



b



รูปที่ 2.3 การสร้างเซลลูโลสในเซลล์ของแบคทีเรีย

ที่มา : <http://www.gpo.or.th>

2.3 ผลไม้ ส่วนใหญ่เกิดจากรังไข่เจริญขึ้นหลังได้รับการปฏิสนธิแล้ว แต่ผลบางชนิดเกิดโดยไม่มี การปฏิสนธิ เช่น กัลยหอม แดงโม พวกนี้จะไม่มีการติด ผลไม้สามารถจำแนกได้หลายวิธีด้วยกัน

1. จำแนกตามประเภทของผล

1. ผลเดี่ยว คือ ผลที่เกิดจากรังไข่อันเดียวที่อยู่ภายในดอกเดี่ยวหรือดอกเดี่ยว ถ้าใน รังไข่มีออวุลเดี่ยวก็จะเจริญเติบโตเป็นผลเดี่ยวที่มีเมล็ดเดี่ยว เช่น มะม่วง พุทรา มะพร้าว มะยม มะปรางมะกอก ฯลฯ แต่ถ้าในรังไข่หนึ่งมีหลายออวุล ก็จะเจริญเป็นผลเดี่ยวที่มีหลายเมล็ด เช่น องุ่น แดงโม แดงกวา ละมุด ส้ม มะนาว ฯลฯ

2. ผลกลุ่ม คือ ผลที่เกิดจากกลุ่มของรังไข่ซึ่งอยู่ภายในดอกดอกเดี่ยว รังไข่แต่ละอัน มาจากเกสรตัวเมียอันหนึ่ง และจะเจริญเป็นผลในลักษณะเป็นกลุ่มหรือ กระจุก เช่น กระจังงา จำปี จำปา การะเวก นมแมว ลูกจาก แต่มีผลกลุ่มบางชนิดรวมเป็นผลผลเดี่ยว เช่น น้อยหน่า สตรอ เบอรี่ ฝักบัว เป็นต้น

3. ผลรวม คือ ผลที่เกิดจากรังไข่ของดอกช่อ โดยแต่ละดอกมีหนึ่งรังไข่ซึ่งจะเจริญ รวมกันเป็นผลเพียงผลเดี่ยวและจะมีบางส่วนของดอกเจริญไปเป็นส่วนของผลด้วย เช่น ขนุน สาเก ลูกขอ มะเดื่อและสับปะรด เป็นต้น

2. จำแนกตามสภาพดินฟ้าอากาศที่พืชเจริญได้ดี แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ผลไม้เขตร้อน เช่น กัลย มะม่วง มังคุด

2. ผลไม้เขตกึ่งร้อน เช่น ส้ม ลำไย ลิ้นจี่

3. ผลไม้เขตอบอุ่น เช่น แอปเปิ้ล สาลี่ ท้อ

3. รายละเอียดผลไม้

1. ตะขบ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Muntingia calabura* L.

ชื่อวงศ์ ELAEOCARPACEAE

ชื่อสามัญ Calabura, Jamaican Cherry, Manila Cherry

ลักษณะทั่วไป ไม้ต้นขนาดกลาง สูงไม่เกิน 20 เมตร ไม่ผลัดใบ เรือนยอดเป็น
ชั้นคล้ายฉัตรแตกกิ่งก้านขนานกับพื้นดิน แผ่กว้างเป็นชั้น ๆ

2. มะละกอ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Carica papaya* L.

ชื่อวงศ์ CARICACEAE

ชื่อสามัญ Papaya

ลักษณะทั่วไป: ไม้ล้มลุกอายุสั้น ระบบรากดีทั้งระบบรากแก้ว และราก
แขนง อวบน้ำ ลำต้นกลวง และไม่ค่อยแตกกิ่งก้านสาขาเหมือนไม้ชนิดอื่น ดอกเจริญออกมาตามซอก
ใบเหนือก้าน ผลมีรูปร่างแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์

2.4 การจัดจำแนกจุลินทรีย์

2.4.1 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมี

มีหลายวิธี ได้แก่ การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส การทดสอบ Oxidative-fermentative การ
ทดสอบเมทิลเรด การทดสอบ VP การทดสอบการสร้างอินโดล การทดสอบการสร้าง
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

2.4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.1.2 การติดสีแกรม

การย้อมสีวิธีนี้มีความสำคัญที่สุด และใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถใช้ศึกษารูปร่าง
ลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ และทำให้จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 ชนิด คือ แบคทีเรีย
แกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ โดยผลจากการย้อมสี จะพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วง
ของคริสตัลไวโอเลต และแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดงของซาฟรานิน

กลไกการติดสีแกรมของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและองค์ประกอบของผนัง
เอกสารนี้ให้เซลล์ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีสารพวกไขมันที่มากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก และยังมีชั้นของ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผนังเซลล์บางกว่าด้วย ในกระบวนการย้อมสี เมื่อล้างออกด้วยแอลกอฮอล์ จะไปละลายไขมัน ทำให้รูเปิดของผนังเซลล์กว้างขึ้น จึงยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ของสีคริสตัลไวโอเลต-ไอโอดีนคอมเพล็กซ์หลุดออกมา เมื่อย้อมสีซาฟรานินจึงติดสีแดงของซาฟรานิน

แต่ในแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าและมีความซับซ้อนขององค์ประกอบที่ผนังเซลล์น้อยกว่า เมื่อล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ เซลล์จะเหี่ยว เพราะเกิดการสูญเสียน้ำเยื่อหุ้มเซลล์มีรูขนาดเล็กลง สารประกอบโมเลกุลใหญ่ของสีละลายออกมาไม่ได้ เซลล์ยังคงติดสีม่วงเมื่อย้อมทับด้วยซาฟรานิน จึงย้อมไม่ติดสีแดง

บางครั้งการย้อมสีแกรม อาจมีปัญหาทำให้ผลการย้อมไม่เป็นไปตามทฤษฎีเช่นแบคทีเรียแกรมบวกในบางสภาพอาจให้ผลแตกต่างในการย้อมคือไม่ติดสีแกรมบวก หรืออายุของเชื้อถ้าเชื้อแก่ แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดอาจสูญเสียความสามารถในการติดสีคริสตัลไวโอเลตทำให้ติดสีแกรมลบแทน หรือขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแบคทีเรีย หรือขึ้นอยู่กับวิธีการเกลี่ยเชื้อ วิธีการย้อมสีและคุณภาพของสีที่ใช้ เป็นต้น

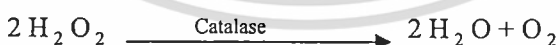
วิธีการย้อมสีแบบแกรม มีประโยชน์ในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็นแกรมบวกและแกรมลบ แต่สำหรับจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะติดสีย้อมชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น เช่น ยีสต์ ติดสีแกรมบวก (นงลักษณ์และปรีชา, 2547)

2.4.1.3 การทดสอบแคตาเลส (Catalase Test)

การทดสอบเอนไซม์แคตาเลสได้มีการใช้มานานในการแยกแบคทีเรีย staphylococci ออกจาก streptococci และใช้ในการแยกแบคทีเรียอื่นๆ ด้วย

McLeod และ Gordon ได้แบ่งแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างแคตาเลส ส่วนพวกที่ไม่สามารถสร้างแคตาเลสมักมีแนวโน้มว่าจะตาย ถ้าในอาหารไม่มีน้ำตาล หรือไม่ก็เพราะมันสร้าง H_2O_2 หรือเกิด H_2O_2 สะสมจากการที่เชื้อถูกแสงและอากาศ สาร H_2O_2 เป็นสารพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงมีข้อเสนอแนะว่าควรเก็บ stock culture ไว้ในที่อากาศจำกัดและมีด

กลไกการทำงานของแคตาเลส



ถ้ามีการสร้างฟองออกซิเจน (O_2) ถือว่าได้เป็นผลบวก ได้มีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $H_2 O_2$ ในการทดสอบแคตาเลส โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1.5-30 พบว่า ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 0.5-5.0 ให้ผลดีและ 1 หยดของ $H_2 O_2$ ร้อยละ 3 ให้ผลดีที่สุด และในการทดสอบต้องใช้เชื้ออายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพราะแคตาเลสจะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้น การอ่านผลลบผิดพลาด (false negative) สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าใช้เชื้ออายุมาก ข้อควรระวังอีกอย่างคือ ห้ามเอาเชื้อที่เลี้ยงบน blood containing medium เพราะในอาหารนี้จะมีแคตาเลสวัตถุประสงค์ของการทดสอบ คือ

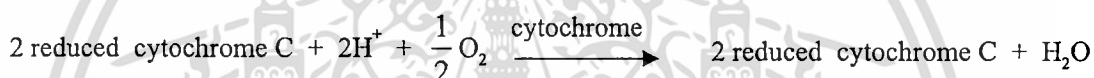
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการสลาย H_2O_2 โดยเอนไซม์แคตาเลส ถ้าได้จะทำให้เกิดฟองแก๊สขึ้น ซึ่งเป็นแก๊สออกซิเจน

2.4.1.4 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)

การทดสอบออกซิเดสใช้ในการจำแนกสกุลต่างๆของแบคทีเรีย การพบเอนไซม์ออกซิเดสเกิดจากการนิสสารละลายผสมของ α -naphthol และ p-phenylene diamine เข้าไปในสัตว์จะเกิดสีน้ำเงินขึ้น ซึ่งเป็นสีของ indophenol blue ปฏิกิริยานี้เรียกว่า nadi reaction ต่อมาการศึกษาในพืชด้วย พบว่าเป็น intracellular enzyme เรียกว่า indophenol oxidase หรือ respiratory enzyme (cytochrome oxidase = cytochrome C oxidase) ซึ่งไซโตโครมชนิดนี้ประกอบด้วย ไซโตโครม เอ และ เอ 3 พบใน aerobic respiratory bacteria รวมทั้งพวก enterobacteriaceae สำหรับพวก obligate anaerobic bacteria จะไม่มี cytochrome oxidase system จึงไม่สามารถเจริญในที่ที่มีออกซิเจน

ไซโตโครมจะประกอบด้วยฮีม (heme) ซึ่งมีธาตุเหล็ก ทำให้อยู่ในสภาพรีดักชัน ออกซิเดชัน ดังสมการ



วิธีการตรวจสอบออกซิเดส มี 2 วิธี

1. วิธีของ Kovacs การใช้ tetramethyl-p-phenylene diamine ซึ่งจะถูกรีดออกซิไดส์โดยไซโตโครม-ซี ได้สารสีม่วง
2. วิธีของ Gaby และ Hadley แล้วดัดแปลงโดย Ewing และ Johnson สารทดสอบใช้ dimethyl-p-phenylene diamine และ α -naphthol

ข้อควรระวัง สารทดสอบต้องใหม่ และจะถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนในอากาศ ต้องเก็บในขวดสีน้ำตาล สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีไซโตโครม ซี เล็กน้อย จะเกิดสีม่วงหรือน้ำเงินหลังจากเวลาตรวจสอบ เรียกว่าเป็น weak-positive หรืออาจเป็น auto oxidation ก็ได้ วัตถุประสงค์ของการทดสอบ คือ เพื่อให้ทราบวิธีการตรวจสอบออกซิเดสที่ใช้มากในการจำแนกสกุลของแบคทีเรีย

2.4.1.5 การทดสอบเมทิลเรด-เมทิลคาร์บินอล (Methyl Red-Voges Proskauer Test)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตกรดปริมาณมาก จากน้ำตาลกลูโคสและให้ผลผลิตที่เรียกว่า อะซิโตอิน(acetoin) หลักการทดสอบนี้ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae

แบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะสามารถผลิตกรดอินทรีย์มากมายหลายชนิด เช่น *Escherichia coli* จะผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองจะให้ butylenes glycol เช่น *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp. ผลิตกรดอินทรีย์บ้าง และผลิตให้ 2, 3 -butanediol เป็นผลผลิตหลัก

MR Test ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มที่ให้กรด เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อที่จะผลิตและรักษาความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อจากการใช้กลูโคสไว้ให้มีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.4 ซึ่งปริมาณกรดที่แบคทีเรียผลิตออกมา นี้อาจเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีแดง

VP Test เป็นการตรวจสอบการมีอยู่ของสารอะซิโตอิน (acetyl methyl carbinol หรือ acetoin) ซึ่งเป็นผลผลิตที่มีพีเอชเป็นกลาง และเป็นสารตัวกลางในการผลิต butylenes glycol

2.4.1.6 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole Test)

การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล ใช้แบคทีเรีย *Escherichia* ออกจาก *Klebsiella-Enterobacter* สิ่งมีชีวิตจะสร้างสารอินโดลจากกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophane) โดย tryptophanase ในอาหารทดสอบจะต้องมีทริปโตเฟน ซึ่งกรดอะมิโนชนิดนี้อาจจะไม่มีในอาหารเปปโตนทั่วไปก็ได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้เคซีนไดเจส (casein digest) หรือ ทริปโตเนกก็ได้ อาหารที่ใช้ควรมีส่วนผสมของเคซีนไดเจสหรือทริปโตเนกร้อยละ 1 และไม่จำเป็นต้องใส่อาหารอื่นๆลงไปอีก ถ้าแบคทีเรียที่ทดสอบเจริญได้ ถ้าไม่สามารถเจริญได้ก็จำเป็นต้องใส่อาหารที่ช่วยให้แบคทีเรียนั้นเจริญได้ แต่ข้อควรระวังคือ ในอาหารทดสอบจะต้องไม่มีน้ำตาลกลูโคสเพราะจะไปยับยั้งการสร้างอินโดล ออกซิเจนก็มีอิทธิพลต่อการสร้างอินโดล เช่น พวก facultative organism (*E. coli*) จะสร้างอินโดลมากขึ้นเมื่อมีการบ่มในที่ที่มีอากาศ

การทดสอบการสร้างอินโดลมีหลายวิธี เช่น วิธีของ Ehrlich-Boehme ใช้ p-dimethylaminobenzaldehyde-HCl ละลายในแอลกอฮอล์ และเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต จะเกิดสีแดงถ้ามีอินโดล ต่อมา Kovacs ได้ดัดแปลงวิธีของ Ehrlich-Boehme โดยใช้ เอมีลแอลกอฮอล์แทนเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งวิธีของ Kovacs ปัจจุบันยังคงนิยมใช้อยู่

ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในการทดสอบการสร้างอินโดล คือ สาร pyrrole (indole = benzopyrrole) ในสารละลายเอซิดแอลกอฮอล์อย่างอ่อนที่มี p-dimethylaminobenzaldehyde ใช้ความร้อนเป็นตัวเร่งจะเกิดสีม่วงแดง ถ้าไม่ใช้ความร้อนต้องใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2.4.2 การทดสอบด้าน Molecular

2.4.2.1 Nucleic Acid Hybridization

คือเทคนิคที่อาศัยการจับกันระหว่างโมเลกุลของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอของ จุลินทรีย์เป้าหมายกับโพรบดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับของกรดนิวคลีอิกเข้าคู่กับดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมาย โดยทั่วไปโพรบดีเอ็นเอจะมีความยาวประมาณ 15 -30 นิวคลีโอไทด์ ความจำเพาะของวิธีการนี้ขึ้นอยู่กับลำดับของกรดนิวคลีอิกที่โพรบ ในขั้นแรกจะต้องทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกออก และทำให้กรดนิวคลีอิกบริสุทธิ์ เพื่อที่จะได้จับคู่กันกับโพรบ เพื่อเกิดการจับกันได้ไฮบริด (Hybrid) เทคนิคที่ใช้ตรวจหาไฮบริดนี้มีความคล้ายคลึงกันกับการตรวจหาสารประกอบของแอนติเจน-แอนติบอดี

แบบไฮบริไดเซชันโดยตรงจะใช้โพรบที่ติดฉลากจับกับกรดนิวคลีอิกในตัวอย่าง โพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีและสารเรืองแสงสามารถดูได้โดยตรง ถ้าเป็นแบบทางอ้อมสามารถใช้เอนไซม์ติดฉลากกับโพรบ

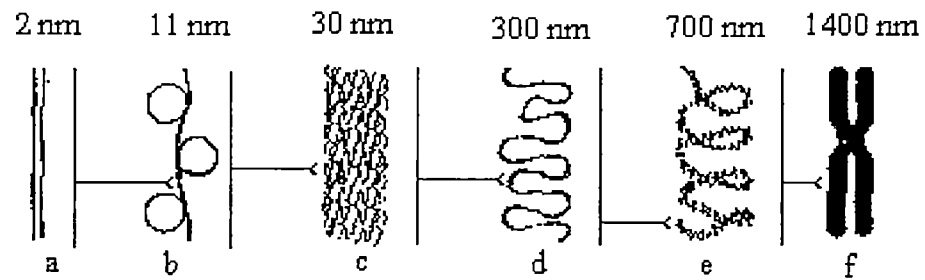
วัสดุที่นำมารองรับอาจจะเป็นแผ่นเมมเบรนไนลอนหรือไนโตรเซลลูโลส มีชุดทดสอบหลายชนิดที่ออกจำหน่ายเช่น Gene-Trek ซึ่งใช้โพรบที่จำเพาะกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร และจำเพาะกับ Ribosomal RNA ในแบคทีเรียและใช้การดูสี (Colorimetric) ในการตรวจหาไฮบริดที่จำเพาะ อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยังจำเป็นอยู่เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจ

2.4.2.2 วิธีการ Molecular subtyping

วิธีการนี้จะสามารถแยกสายพันธุ์ต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ที่เป็นสปิชีส์เดียวกัน ทำให้ได้ข้อมูลที่มีประโยชน์ในการทำอนุกรมวิธานหรือดูการระบาดของเชื้อ วิธีการใช้สารนิวคลีอิกจะมีข้อที่ดีกว่าวิธีการจำแนกชนิดแบบ Phenotype เนื่องจากเซลล์ของจุลินทรีย์จะไม่ได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม เพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจะไม่เปลี่ยนแปลงในขณะที่เชื้อเจริญ

2.4.2.3 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น



รูปที่ 2.4 สาย DNA เกลียวคู่พันกับโปรตีนและหดตัวเป็นสายโครมาตินจนเห็นเป็น

โครโมโซมในระยะเมตาเฟส

ที่มา : Freifelder(1985)

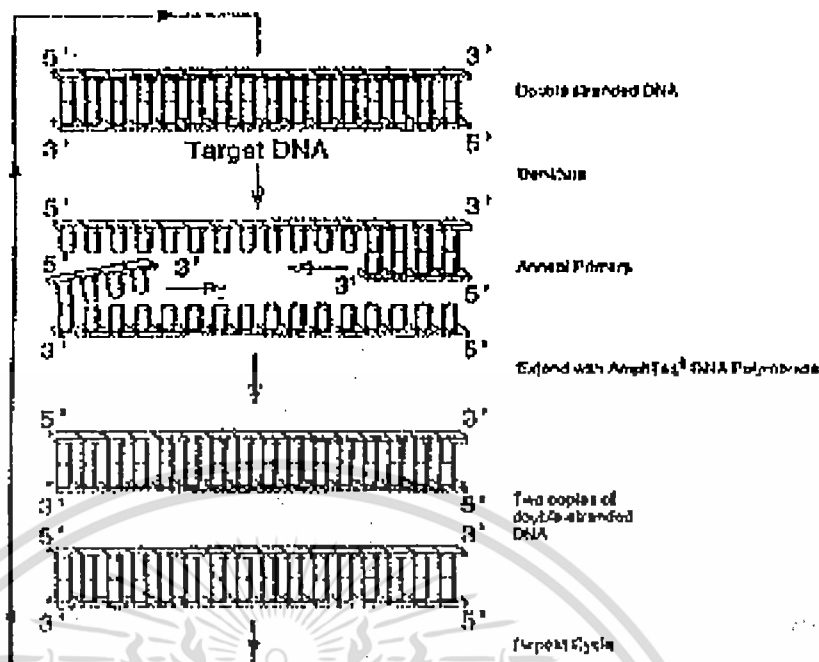
2.4.2.3.1 หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการโคลนนิ่งดีเอ็นเอและการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นที่ 1 เรียกว่า ดีเนเจอร์ริง(denaturing) เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° ซ

ขั้นที่ 2 เรียกว่า แอนเนลลิง(annealing) เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 13-14 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60° ซ

ขั้นที่ 3 เรียกว่า เอ็กเทนชัน(extension) เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา ตลอดทั้งสามขั้นตอน



รูปที่ 2.5 หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

ที่มา : PE applied Biosystems

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาจากไซ้จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า

2.4.2.3.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ
4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุพลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือชิ้นส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

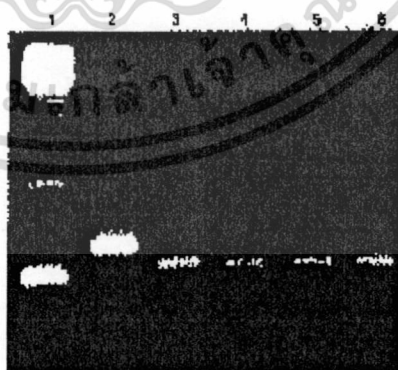
สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycle (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

2.4.2.3.3 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

2.4.2.3.4 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น (ภาพที่ 2.6)



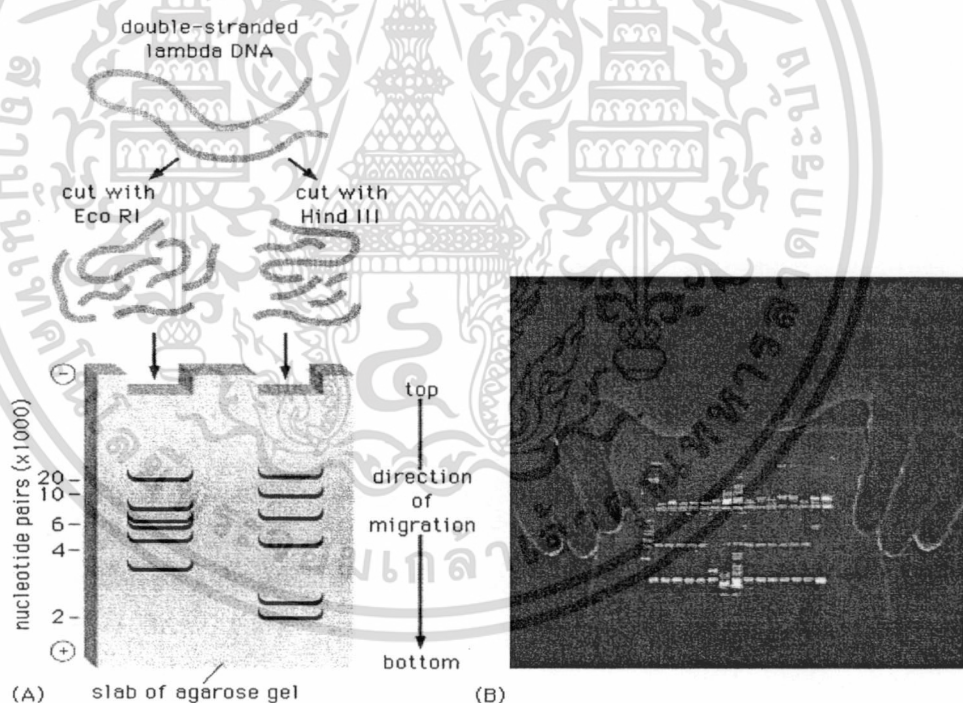
รูปที่ 2.6 แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธี agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยสี ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้แสง ultraviolet

ที่มา : <http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/genetics/pcr.htm>

การสร้างรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ(Recombinant DNA) และการตัดต่อพันธุกรรมนั้น จะสำเร็จได้ ต้องอาศัยหลักการพื้นฐานและเทคนิคหลาย ๆ อย่างมาประกอบกัน เทคนิคที่ได้รวบรวมไว้ในบทความนี้เป็นเพียงเทคนิคพื้นฐานเท่านั้น ในบางงานอาจต้องใช้เทคนิคเฉพาะที่ไม่ได้กล่าวถึงไว้ในที่นี้ ขอให้ผู้อ่านได้ค้นคว้าศึกษาเพิ่มเติมจากแหล่งอื่น

2.4.2.4 Agarose gel Electrophoresis

Agarose gel electrophoresis เป็นเทคนิคการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอมีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีมวลมากก็จะมีจำนวนประจุลบมากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาสัดส่วนของประจุต่อมวลดีเอ็นเอแล้วจะเป็นค่าคงที่ agarose gel electrophoresis แยกดีเอ็นเอออกจากกันได้โดยอาศัยแรงเสียดทานการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แรงเสียดทานนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอ โดยที่ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างอัดแน่นอย่าง supercoiled DNA จะมีแรงเสียดทานน้อย จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า circular DNA และดีเอ็นเอรูปร่างเป็นแท่ง ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเหมือนกัน อย่างชิ้นดีเอ็นเอรูปแท่งนั้น ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีแรงเสียดทานการเคลื่อนที่มากกว่า



รูปที่ 2.7 agarose gel electrophoresis นำไปส่องในแสงอัลตราไวโอเลต ethidium bromide ที่ย้อมติดดีเอ็นเออยู่จะเรืองแสงสีส้ม

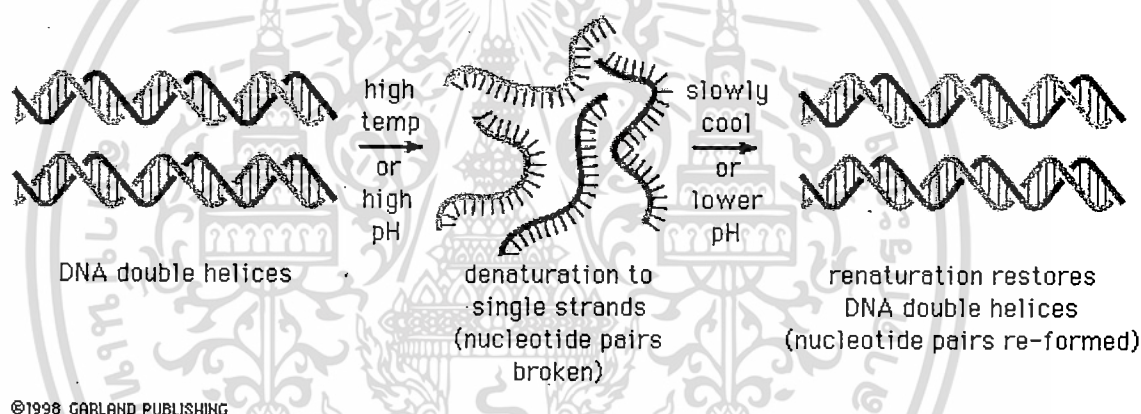
ที่มา : [http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA technology.htm](http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA%20technology.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นเมื่อตัดดีเอ็นเอเป็นชิ้น ๆ ด้วย restriction endonuclease เราจึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้ด้วย agarose gel electrophoresis กระทำโดยเตรียม agarose gel ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม หยดสารละลายดีเอ็นเอลงในช่องบน agarose gel แล้วเปิดสนามไฟฟ้าดีเอ็นเอ จะวิ่งจากขั้วลบเข้าหาขั้วบวก เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมปิดสนามไฟฟ้า แล้วย้อมดีเอ็นเอใน agarose gel ด้วยสี acridine เช่น ethidium bromide แล้วนำไปส่องในแสงอัลตราไวโอเลต ethidium bromide ที่ย้อมติดดีเอ็นเออยู่จะเรืองแสงสีส้ม เป็นแถบดีเอ็นเอซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

2.4.2.5 Hybridization

Hybridization เป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติเรื่องการจับคู่เบสอย่างจำเพาะของดีเอ็นเอ (G:C, A:T) พันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่างคู่เบสถูกทำลายได้ง่าย ๆ ด้วยความร้อน หรือการเพิ่ม pH ของสารละลาย



รูปที่ 2.8 Hybridization

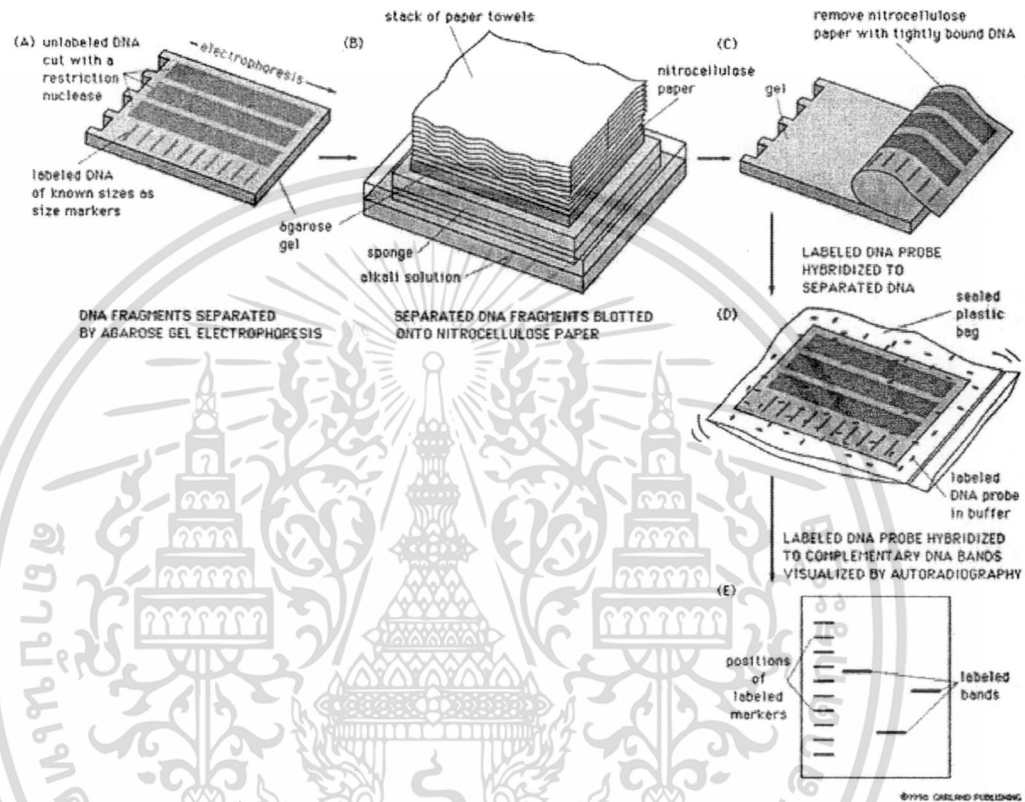
ที่มา : <http://www.csu.edu.au/faculty/health/biomed/subjects/molbol/DNA technology.htm>

เมื่อพันธะไฮโดรเจนถูกทำลายดีเอ็นเอจะคลายเกลียว เปลี่ยนสภาพโมเลกุลจากดีเอ็นเอ รูปร่างเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว เรียกว่าเกิด denaturation ของดีเอ็นเอ เมื่อลดอุณหภูมิ หรือลด pH ของสารละลายดีเอ็นเอลงสู่สภาพเดิม สายดีเอ็นเอจะกลับมาเข้าคู่กันใหม่ โดยอาศัยการจับคู่เบสอย่างจำเพาะ DNA probe คือ ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ซึ่งติดฉลากกับมันตรังสีไว้ DNA probe มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ความสามารถจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจได้อย่างจำเพาะ ทำให้เราสามารถติดตามชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจนั้นได้โดยอาศัยกัมมันตภาพรังสีที่ติดอยู่กับ DNA probe

2.4.2.6 Southern Blot Hybridization

เมื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันออกจากกันด้วย agarose gel electrophoresis แล้ว หากต้องการทำ hybridization เพื่อตรวจหาว่าดีเอ็นเอชิ้นที่มียีนที่ต้องการศึกษาอยู่ในตำแหน่งใดของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่หลงเหลืออยู่หลังจากการทดลองหรือไม่ เราต้องอ่านเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

electrogram เราจำเป็นที่จะต้องย้ายดีเอ็นเอที่แยกแ่้วนั้นออกจาก agarose gel ไปสู่แผ่น nitrocellulose ซึ่งมีความคงทนมากกว่า ทั้งนี้เพราะว่าระหว่างการ hybridization จะต้องมีการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอแยกสายก่อนที่จะจับคู่เบสใหม่กับ DNA probe ความร้อนที่ใช้นี้สามารถทำลาย agarose gel ให้หลอมละลายหายไปได้



รูปที่ 2.9 การเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่แผ่น nitrocellulose

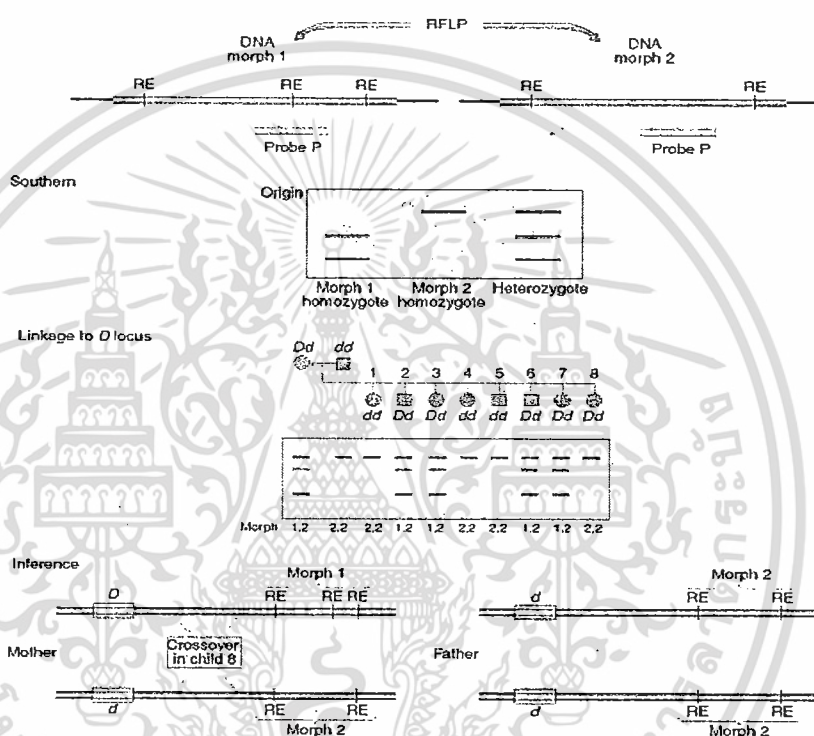
ที่มา : <http://www.thirawat.com/ge/DNAevid.html>

การเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่แผ่น nitrocellulose ทำโดยการวางแผ่น nitrocellulose ไว้บน agarose gel ที่แช่สารละลายบัฟเฟอร์อยู่ แล้ววางกระดาษซับหลาย ๆ ชั้นบนแผ่น nitrocellulose อีกทีหนึ่ง แผ่นกระดาษซับที่แห้งจะดูดซับสารละลายบัฟเฟอร์ที่อยู่ข้างล่างให้เคลื่อนที่ขึ้น ชะผ่าน agarose gel และแผ่น nitrocellulose สู่กระดาษซับ ในขณะที่เคลื่อนที่ สารละลายบัฟเฟอร์จะชะเอาชิ้นดีเอ็นเอให้หลุดออกจาก agarose gel ไปเกาะติดกับแผ่น nitrocellulose ไปด้วย โดยวิธีนี้เราจึงสามารถย้ายชิ้นดีเอ็นเอจาก agarose gel ไปสู่ nitrocellulose ได้ วิธีการนี้เรียกว่า southern blot และถ้า นำ DNA probe มาจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่ย้ายมาอยู่บน nitrocellulose อย่างจำเพาะ ต่ออีกทีหนึ่ง วิธีการทั้งหมดที่ประกอบด้วย agarose gel electrophoresis, southern blot และ hybridization จะเรียกว่า southern blot hybridization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.7 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อจำแนกความแตกต่างเพื่อระบุบุคคล โดยมีหลักการที่ว่า ในระหว่าง restriction endonuclease site ของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมาจากสายพันธุ์ที่ต่างกัน อาจมี mutation หรือลำดับดีเอ็นเอซ้ำ ๆ ที่ทำให้ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย restriction endonuclease เดียวกันมีขนาดแตกต่างกัน เมื่อแยกดีเอ็นเอแล้วตรวจด้วย DNA probe ที่จำเพาะ จะทำให้ได้ลักษณะของ restriction fragment ที่แตกต่างกัน



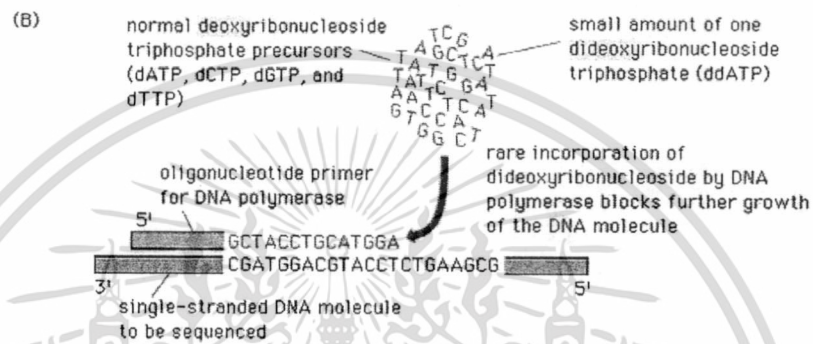
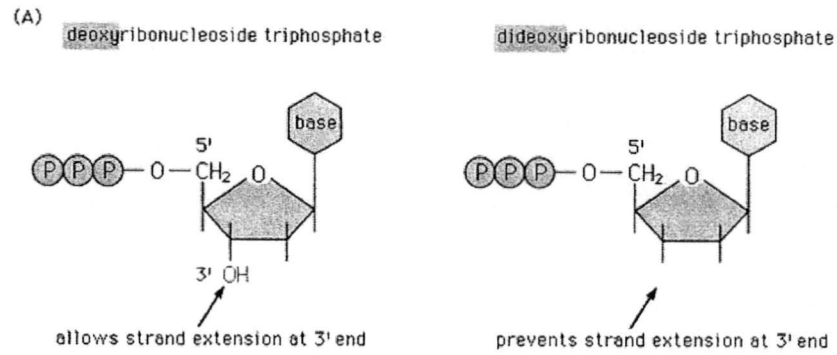
รูปที่ 2.10 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (1)

ที่มา : http://www.student.chula.ac.th/~49371019/restriction_fragment_length_p.htm

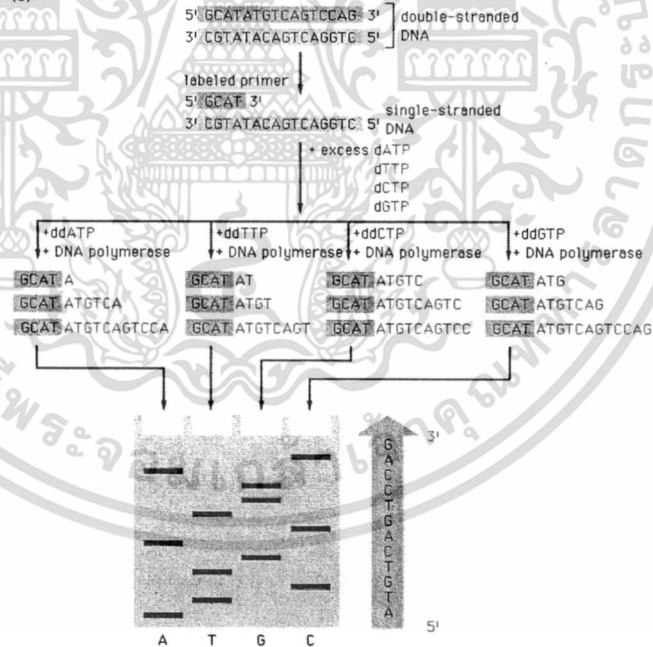
ด้วยการศึกษา Restriction fragment length polymorphism ทำให้ทราบได้ว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มี genotype เป็นแบบใด

2.4.2.8 DNA sequencing

การศึกษาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเออาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ว่า การทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการ DNA template, 3'-OH primer และ deoxyribonucleoside triphosphate ทั้ง 4 ชนิด



(C)



รูปที่ 2.11 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (2)

ที่มา : http://www.student.chula.ac.th/~49371019/restriction_fragment_length_p.htm

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอกระทำโดยใช้ dideoxynucleosidetriphosphate ๔ ชนิด แต่ละชนิดใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 4 ปฏิกิริยา แต่ละปฏิกิริยาจะหยุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อเอนไซม์ DNA polymerase ไม่สามารถเติมเบสต่อไปได้อีก เพราะขาดหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' ของเบสก่อนหน้า ทำให้ได้ DNA fragments ที่มีขนาดต่างกัน ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เอนไซม์ DNA polymerase หยุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อเอนไซม์ DNA polymerase หยุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง ก็จะเกิด DNA fragments ที่มีขนาดต่างกันขึ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาถึงจุดที่ต้องใช้ dideoxynucleoside triphosphate แต่ละชนิด ดังนั้นแต่ละปฏิกิริยาจึงได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันตามตำแหน่งของเบสที่หยุดปฏิกิริยาไว้ เมื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากกันด้วย gel electrophoresis ก็จะสามารถอ่านลำดับเบสของดีเอ็นเอได้โดยดูตำแหน่งที่เบสหยุดในแต่ละปฏิกิริยา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์

3.1.1 *Acetobacter xylinum* TISTR 976

3.2 สารเคมี

3.2.1 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 กรดอะซิติก

3.2.3 ไซคลอเฮกซาไมด์

3.2.4 กลูโคส

3.2.5 เปปโตน

3.2.6 กรดซิตริก

3.2.7 วุ้น

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารสูตร Hestrin and Schram (HS medium)

3.3.2 อาหารสูตร GEY Agar

3.3.3 อาหารสูตรน้ำมะพร้าว

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

3.4.1 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง

3.4.2 เครื่องชั่งตำแหน่งละเอียด

3.4.3 ตู้ถ่ายเชื้อ

3.4.4 ตู้บ่มร้อน

3.4.5 ตู้บ่มไมโครเวฟ

3.4.6 ตู้บ่มเชื้อ

3.4.7 ตู้เย็น

3.4.8 หม้อนึ่งความดันไ

3.4.9 ขวดรูปชมพู่

3.4.10 จานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 2 วัน ให้ได้โคโลนีเดี่ยว นำโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร HS medium ปริมาณ 90 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยสภาวะนิ่งทำโดยนำพลาสติกวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) สำหรับสภาวะเขย่านำไปวางในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ใช้ความเร็วในการเขย่า 100 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ulos เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ulosที่ผลิตได้และคัดเลือกไอโซเลทของเชื้อ 2-3 ไอโซเลทต่อ 1 ชนิดของผลไม้ที่ให้ผลผลิตเซลล์ulosสูง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.4.2 วิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์ulosที่ผลิตได้

นำเซลล์ulosที่เชื้อผลิตได้นำออกจากพลาสติก มาล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง จากนั้นเติม สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกหลายๆครั้ง จนหมดความเป็นด่างนำเซลล์ulosที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน(ประมาณ 12 ชั่วโมง) ด้วยตู้อบลมร้อน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง(น้ำหนักที่ได้/ปริมาตรอาหารที่ใช้) เพื่อหาปริมาณของเซลล์ulosที่ผลิตได้ (krusong และคณะ 1995)

ปริมาณของเซลล์ulosที่ผลิตได้ = น้ำหนักแห้งของเซลล์ulos + น้ำหนักของกระดาษกรอง - น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัมต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร)

3.5.5 การจัดจำแนกเชื้อที่แยกได้

3.5.5.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมี

นำสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่หมักเซลล์ulosได้สูงมาใช้ในการจัดจำแนก โดยดูลักษณะรูปร่าง การติดสีย้อม ลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ

3.5.5.1.1 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม

1. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่มีหยดน้ำให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป
2. ตรึงเชื้อให้ติดแน่นกับสไลด์ โดยการนำสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง
3. หยดสียคริสตัลไวโอเลต ให้ทั่วรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาด
4. หยดสารละลายไอโอดีนบนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสารละลายไอโอดีนทิ้งด้วยน้ำสะอาด
5. ล้างสไลด์ด้วยแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด
6. หยดสีซาฟานินบนรอยเกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำ และซับน้ำให้แห้ง
7. ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

• ถ้าเซลล์ติดสีม่วงแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ถ้าเซลล์ติดสีแดงแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ

3.5.5.1.2 การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Catalase test) (ดวงใจ.2535)

เช็ยเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ และลงบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อที่ตะไว้ สังเกตผลการเกิดฟองถ้ามีการเกิดฟองแสดงว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีการสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้

- เกิดฟอง บันทึกลงเป็นบวก
- ไม่เกิดฟอง บันทึกลงเป็นลบ

3.5.5.1.3 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล (ดวงใจ.2535)

1. เช็ยเชื้อบนอาหารอาหารทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล โดย streak ที่ผิวหน้าของอาหาร

2. นำหลอดเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
3. ตรวจสอบ ผลบวกจะแสดงโดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

3.5.5.1.4 การทดสอบ Oxidative fermentative (O/F test) (รำพึง.2545)

1. ใช้เข็มเช็ยเชื้อและเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ซึ่งมีอายุ 24-28 ชั่วโมง ปักเชื้อแบบปักตรง (Stab inoculation) ตลอดความลึกของอาหารทดสอบ oxidative-fermentative เชื้อละ 2 หลอด
2. สำหรับหลอดที่ 2 รีบเทพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อปิดทับผิวหน้าของอาหารเหลวให้หนาประมาณ 1 นิ้ว เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพไร้อากาศ ส่วนหลอดที่ 1 ไม่ต้องเทพาราฟินปิดทับเพื่อให้เชื้อนี้อยู่ในสภาพมีอากาศ
3. นำหลอดเชื้อทั้ง 2 ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เชื้อที่เป็น fermentative จะสร้างกรดในอาหารทั้ง 2 หลอด หรือเฉพาะหลอดที่มีพาราฟินปิดทับ ส่วนเชื้อที่เป็น oxidative จะสร้างกรดเฉพาะหลอดที่ไม่ปิดทับด้วยพาราฟิน ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ คือ บรอมไธมอลบลู จากสีเขียวเป็นสีเหลืองดังการเปลี่ยนแปลงต่อไปนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบ Oxidative fermentative

การเปลี่ยนสีของบรอมไธมอลบลู		ชนิดของปฏิกิริยา	การบันทึกผล
หลอดไม่ปิดพาราฟิน	หลอดที่ปิดพาราฟิน		
เหลือง	เขียว	oxidative	+/-
เหลือง	เหลือง	fermentative	+/+
ฟ้าหรือเขียว	เหลือง	fermentative	-/+
ฟ้าหรือเขียว	เขียว	No action on glucose	-/-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.1.5 การทดสอบเมทิลเรด (Methylred test) (ร่าฟิง.2545)

1. ปักเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร MR-VP broth จำนวน 2 หลอด
2. บ่มเชื้อแบคทีเรียที่ปักลงใน MR-VP broth ที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

3. ตรวจสอบเมื่อครบ 2 วัน โดยแบ่งอาหารมาประมาณ 2-3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็ก จากนั้นหยดสารละลายเมทิลเรดประมาณ 1-2 หยด แล้วสังเกตผล

- เปลี่ยนเป็นสีแดง ให้ผลเป็นบวก
- เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ให้ผลเป็นลบ
- ถ้าเป็นสีส้ม ให้บ่มต่ออีก 2 วัน แล้วนำเชื้อมาทดสอบใหม่

3.5.5.1.6 การทดสอบ VP (Voges-Proskauer (VP) test) (ร่าฟิง.2545)

1. ปักเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร MR-VP broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) จำนวน 2 หลอด
2. บ่มเชื้อแบคทีเรียที่ปักลงใน MR-VP broth ที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

3. ตรวจสอบเมื่อครบ 2 วัน โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อมาจำนวน 1-2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาดเล็ก หยดสารละลายแอลฟาเนฟтолความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.6 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยดสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ตามลงไป เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วอ่านผล

- ถ้าเกิดสีแดงชมพู บันทึกผลเป็นบวก
- ถ้าเกิดสีเหลืองหรือสีอื่นๆ ให้ตั้งทิ้งไว้ 4 ชม. และถ้าเกิดสีแดงชมพู บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงชมพู บันทึกผลเป็นลบ

3.5.5.1.7 การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole) (ร่าฟิง.2545)

1. ปักเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ลงในอาหาร tryptone broth ในหลอดทดสอบ จำนวน 2 หลอด

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. เมื่อครบเวลานำมาทดสอบอินโดล โดยหยดสารละลาย Kovac 's reagent ประมาณ 0.5-1.0 มิลลิลิตร (2-3 หยด) ลงในหลอดอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ เขย่าเบาๆ ให้สารละลายผสมกัน สังเกตผล

- ถ้าเกิดสีแดงหรือสีชมพู บันทึกผลเป็นบวก แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ Tryptophanase ย่อยสลายทริปโตเฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อินโดล
- ถ้าไม่เกิดสีแดง บันทึกผลเป็นลบ

3.5.5.1.8 การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide Production test) (ร่าฟิง.2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ปูกลูกเชื้อลงในอาหาร triple sugar iron agar slant (TSI) โดย streak ที่ผิวหน้าของอาหาร และแทงตรงๆ ลงไปที่ส่วนก้นหลอด
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส และตรวจผลภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงควรเก็บหลอดไว้ตรวจผลจนครบ 5 วัน
3. สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารและการเกิดก๊าซ

ตารางที่ 3.2 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น	การแปรผล
ตะกอนสีดำ	เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)
อาหารที่ผิวหน้าไม่เปลี่ยนสีและอาหารที่ก้นหลอดสีเหลือง	เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส
อาหารที่ผิวหน้าและก้นหลอดมีสีเหลือง	เกิดการหมักน้ำตาลแล็กโทสและ/หรือน้ำตาลซูโครส
อาหารเกิดมีรอยแตกหรือฟองอากาศ	เกิดแก๊ส
อาหารไม่เปลี่ยนสี	ไม่เกิดการหมักน้ำตาล

3.5.5.1.9 การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate Fermentation test) (ร่าฟิง.2545)

ปูกลูกเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงในอาหารที่ใช้ทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด (คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ เช่น กลูโคส ฟรุคโตส แลคโตส กาแลคโตส ซูโครส เป็นต้น) ในการทดลองนี้ได้ทดสอบเฉพาะน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลการสร้างกรดและก๊าซทุกวันจนครบ 7 วัน ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักคาร์โบไฮเดรต และสร้างกรดขึ้นจะทำให้อาหารมีพีเอชต่ำลงและสีของอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนไป ถ้าใช้ บรอมครีซอลเพอร์เฟลเป็นอินดิเคเตอร์ จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและสามารถสร้างก๊าซได้

ตารางที่ 3.3 แสดงตัวอย่างการแปรผลและบันทึกผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

ลักษณะการเปลี่ยนแปลง		การแปรผล	บันทึกผล
สีอาหารในหลอดทดลอง	สีอาหารและก๊าซในหลอด ดักก๊าซ		
เหลือง	เหลือง/ไม่เกิดก๊าซ	เชื้อสร้างกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ	A
เหลือง	เหลือง/เกิดก๊าซ	เชื้อสร้างกรดและสร้างก๊าซ	AG
เขียวอมเหลือง	ไม่เกิดก๊าซ	เชื้อสร้างสารประเภทด่าง	K

A = Acid

AG = Acid, Gas

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน K = Alkaline ขงงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.1.10 การทดสอบความสามารถในการสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล

1. เลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบการสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล โดย streak ที่ผิวหน้าของอาหาร เชื้อละ 2 หลอด
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลา ทำการทดสอบโดยการหยดสารละลายเฟลลิง (Fehling) ลงบนเชื้อ ผลบวกแสดงโดยเกิดวงสีแดงอิฐรอบๆ โคลนของเชื้อ

3.5.5.2 การจัดจำแนกทางชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค 16s rDNA

3.5.5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียจะเจริญในอาหาร GYC เป็นเวลา 2-5 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Moonmangmee(2000) เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการเซนตริฟิวส์ที่ 12000 xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้นำมาใส่ในอิตีทีเอบัฟเฟอร์(EDTA buffer) (โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.15 โมลาร์ และอิตีทีเอ(EDTA) 1 โมลาร์ ที่พีเอช 8.0) ทำให้เซลล์แตกโดยการเติมสารละลายไลโซไซม์(lysozyme) 10 มก./มล. หลังจากนั้นเติม RNase 10 มก./มล. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมเอนไซม์โปรตีนเค (Protinase K) 20 มก./มล. แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นเติมโซเดียมโดเดซิล(sodium dodecyl sulphate(sps))25% 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใส่สารละลายโซเดียมอะซิเตต(sodium acitete)5 โมลาร์ 180 ไมโครลิตร และขจัดโปรตีนแซคคาร์ไรด์ของเซลล์ออกโดยเติมสารละลายซิทัวไครเมทวแอมโมเนียมโบรไมด์(cetyltrimethylammonium bromide) 2% 100 ไมโครลิตรและเซนตริฟิวส์ ที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที โครโมโซมดีเอ็นเอ ที่เป็นสายคู่จะทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มต่อไอโซไมลิกแอลกอฮอล์ 25 : 1 (Chloroform/isomylic alcohol 25:1 v/v) 2 ครั้ง เติมน้ำให้ถึงหลอดใหม่และเพิ่มปริมาณด้วยเอทานอล 2 ครั้ง นำโครโมโซมดีเอ็นเอที่ได้มาใส่น้ำที่มีความบริสุทธิ์ ขนาดของดีเอ็นเอ สามารถตรวจสอบได้โดยใช้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสอะกาโรสเจล(agarose gel electrophoresis) 1% ในทีบีอีบัฟเฟอร์(TBE buffer) 1X (ทริสโบเรต(Tris-borate) 89 มิลลิโมล, กรดบอริก(boric acid) 89 มิลลิโมล, อิตีทีเอ(EDTA) 2 มิลลิโมล ; พีเอช 8.0) ด้วยขนาดสัญลักษณ์ a 1-Kb DNA ladder. นำแผ่นเจลที่ย้อมสีเอทิดีอัมโบรไมด์(ethidium bromide) มาส่องไฟแสงอัลตราไวโอเลต

3.5.5.2.1 PCR ในการวิเคราะห์ 16s-23s-5s rDNA

พรีมิเออร์(PCR)เตรียมให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร โดยใส่ทาการเอ็กแทค (TaKara Ex Taq) 0.50 ไมโครลิตร, 10 เท่าของเอ็กแทคบัฟเฟอร์(10X Ex Taq Buffer) 10 ไมโครลิตร, สารผสมดีเอ็นทีพี(dNTP mixture) 8.0 ไมโครลิตร, 16S forward primer 0.50 ไมโครลิตร(100 pmol μl^{-1}), 5S reverse primer 0.50 ไมโครลิตร (100 pmol μl^{-1}), ดีเอ็นเอ(DNA) 2.0 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่น เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 35 รอบ denaturation (1 รอบ 94 องศาเซลเซียส/4 วินาที);

annealing (35 รอบ: 94 องศาเซลเซียส/30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส/30วินาที, 72 องศาเซลเซียส/3 นาที); final extension: (72องศาเซลเซียส/10 นาที) ดูขนาด DNA โดยนำแผ่นเจลที่ย้อมสีเอทิดียมโบรไมด์(ethidium bromide) มาส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.6 ศึกษาการเจริญและการผลิตเซลล์ของเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมอาหาร GEY 500 มิลลิลิตร แบ่งใส่พลาสติก ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาเทใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้อาหารเย็น นำเชื้อมา cross streak บนจานอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน จะได้โคโลนีเดี่ยวเกิดขึ้น

เตรียมอาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ประกอบด้วยน้ำมะพร้าวแก่ น้ำตาลทรายร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 กรดอะซิติกร้อยละ 1 ของปริมาตรน้ำมะพร้าว) แบ่งใส่ พลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำโคโลนีเดี่ยวของ *G. nataicola* และ *A. xylinum* ที่ได้จากการ cross streak 2 โคโลนีต่อพลาสติก ลงในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อ (starter) เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.6.2 การหมักเซลล์

เตรียมอาหารสูตรเดียวกับอาหารที่ใช้เตรียมหัวเชื้อ (อาหารสูตรน้ำมะพร้าว) แบ่งใส่ พลาสติก ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งให้เย็น เติมหหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 ร้อยละ10 ของปริมาณอาหาร (20 มิลลิลิตร/พลาสติก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 12 วัน จะได้เซลล์จากแบคทีเรียหรือวัณมะพร้าว เก็บตัวอย่างในวันที่ 3 5 7 9 และ 12 ของการหมัก นำแผ่นเซลล์มาสกัดความหนาโดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์และผลิตเซลล์โดยการหาน้ำหนักแห้ง รวมทั้งวัดค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมัก

3.6.3 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์เซลล์ที่ได้

นำแผ่นเซลล์ที่ผลิตได้ล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้สะเด็ดน้ำ นำมาวัดความหนาโดยวัดที่จุดต่างๆกัน 10 จุดใน 1 แผ่นเซลล์ หาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำแผ่นเซลล์มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกจากแผ่นเซลล์ ล้างด้วยน้ำหลายๆครั้งจนสะอาด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน จนแห้งสนิท นำมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งให้เย็น จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแผ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชลลูโลสที่ได้ ซึ่งจะเป็นค่าของผลผลิตเชลลูโลส รายงานผลเป็นน้ำหนักแผ่นเชลลูโลสที่ได้ (กรัม) ต่อ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (มิลลิลิตร)

$$\text{ผลผลิตเชลลูโลส} = \frac{\text{น้ำหนักแผ่นเชลลูโลสที่ได้ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรอาหารที่ใช้ (มิลลิลิตร)}} \quad (\text{กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร})$$

จากการทดลองในข้อ 1 จะทำให้รู้ว่าเชื้อ *G. nataicola* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากมะละกอ และ *A. xylinum* TISTR 976 มีการเจริญและผลิตเชลลูโลสสูงสุดในวันใดในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเชลลูโลสจากเชื้อ *G. nataicola*

3.7.1 แหล่งคาร์บอน

โดยใช้แหล่งคาร์บอนดังนี้ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลแมนนิทอล โดยนำน้ำมะพร้าวแก่กรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ โดยเติมร้อยละ 5 และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 อุ่นให้ละลาย เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 นำไปใส่ใน ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นถ่ายเชื้อ *G. nataicola* ลงไปร้อยละ 10 เขย่าให้เข้ากัน บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเชลลูโลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเชลลูโลสที่ได้ และวัดค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมัก

3.7.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน

โดยใช้แหล่งไนโตรเจนดังนี้ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) โดยนำน้ำมะพร้าวแก่กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 และเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ร้อยละ 0.1 อุ่นให้ละลาย เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 แบ่งใส่ ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นถ่ายเชื้อ *G. nataicola* ลงไปร้อยละ 10 เขย่าให้เข้ากัน บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเชลลูโลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเชลลูโลสที่ได้ และวัดค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมัก

3.7.3 ศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

โดยแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อดังนี้ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยนำน้ำมะพร้าวแก่กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 อุ่นให้ละลาย เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 นำไปใส่ ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นถ่ายเชื้อ *G. nataicola* ลงไปร้อยละ 10 เขย่าให้เข้ากัน บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบ

กำหนดเก็บตัวอย่างเซลล์โลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลล์ที่ได้ และวัดค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมัก

3.7.4 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยแปรผันความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 โดยนำน้ำมะพร้าวแก่กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 เติมน้ำแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 อุ่นให้ละลาย เติมกรดอะซิติกในปริมาณต่างๆ เพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 จากนั้นนำไปใส่ ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็น ถ่ายเชื้อ *G. nataicola* ลงไปร้อยละ 10 เขย่าให้เข้ากัน บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลล์โลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลล์ที่ได้ และวัดค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมัก

3.7.5 การเติมเอทานอล

โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลดังนี้ ร้อยละ 1 3 5 7 และ 9 ของปริมาตรอาหารโดยนำน้ำมะพร้าวแก่กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 เติมน้ำแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 อุ่นให้ละลาย เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 และเติมเอทานอลในความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำไปใส่ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นถ่ายเชื้อ *G. nataicola* ลงไปร้อยละ 10 เขย่าให้เข้ากัน บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลล์โลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลล์ที่ได้ และวัดค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมัก

3.8 ศึกษาผลผลิตของเซลล์โลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของสภาวะต่างๆ จากการทดลองในข้างต้น เลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวเป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับผลผลิตของเซลล์โลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum*

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์โลส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของต้นแกน โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.9 การผลิตกระดาษเซลล์โลสที่ได้จากเชื้อ *G. nataicola*

เลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลล์โลสที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด แช่แผ่นเซลล์โลสในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปิดฝาภาชนะทิ้งไว้ 1 คืน เป็นการปรับแผ่นเซลล์โลสให้เป็นกลาง นำแผ่นเซลล์โลสต้มในน้ำเดือด 30 นาที เพื่อไล่แอมโมเนียมออก นำเข้าเครื่องอัดรีดน้ำ อบให้แห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำแผ่นเซลล์โลสที่แห้งแล้วมาตัดเป็นชิ้นๆ แล้วนำไปใช้

65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฟอกสีโดยต้มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 นาน 30 นาที ล้างน้ำให้สะอาด นำเข้าเครื่องอัดรีดน้ำ จึงตั้งด้วยกรอบยัด อบใน ตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จะได้กระดาษจากเซลลูโลส หรือ กระดาษวุ้นมะพร้าว

3.10 การนำกระดาษจากเซลลูโลสมาประยุกต์

3.10.1 แผ่นกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำกระดาษจากเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *G. nataicola* ตัดให้ได้เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำกระดาษที่ได้มาใส่กรองอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB) แบ่งชุดการทดลอง เป็น 4 ชุด คือ

- | | |
|-------------|--|
| ชุดที่หนึ่ง | อาหารที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลส |
| ชุดที่สอง | อาหารที่ไม่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลส และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ |
| ชุดที่สาม | อาหารที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Millipore paper ที่มีขนาด pore size 0.45 ไมครอน |
| ชุดที่สี่ | อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที |

จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสี่ชุดการทดลอง วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลทุกวัน โดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.10.2 แผ่นกรองน้ำมันหอมระเหย

นำกระดาษกรองที่ได้มากรองน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากลาเวนเดอร์ ตัดกระดาษกรองให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร นำมาวางบนกรวยแก้วและใช้กรองน้ำมันหอมระเหย วัดปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่ผ่านการกรอง

บทที่ 4

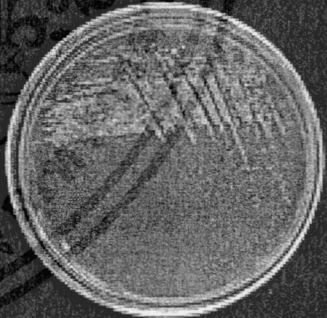
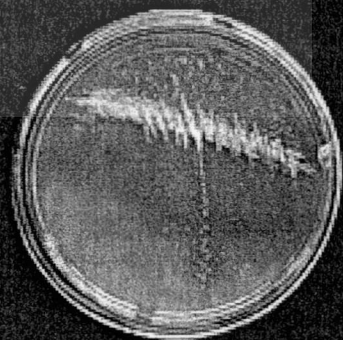
ผลการดำเนินงานและการทดลอง

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย

จากการคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย ได้แก่ ตะขบ มะละกอ มะดัน ชมพู มะม่วง ทองกอง แอปเปิ้ล และแตงโม โดยนำผลไม้เน่าเสียเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหาร HS medium ที่มีการเติมสารยับยั้งการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น (สารดังกล่าวได้แก่ กรดอะซิติก 0.2 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ และไซโคเฮกซาไมด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) และสารเหล่านี้ยังใช้สำหรับการสร้างเส้นใยเซลลูโลสของแบคทีเรียเซลลูโลสอีกด้วย (Toyosaki และคณะ 1995) การเจริญที่สภาวะนี้ของอุณหภูมิตั้งแต่ 7 วัน เชื้อแบคทีเรียจะสร้างเส้นใยและประสานกันเป็นแผ่นวุ้นลอยอยู่บริเวณผิวน้ำอาหารเหลว ซึ่งผลไม้ที่นำมาทำการแยกเชื้อพบเฉพาะตะขบ และมะละกอ เท่านั้นที่สามารถสร้างเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ HS medium ได้ สำหรับผลไม้ชนิดอื่นไม่พบการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสบนผิวน้ำอาหารเหลว อาจเนื่องมาจากผลไม้ที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อมีการเจริญของเชื้อยีสต์มากกว่า ทำให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตได้ดีและแย่งอาหารจากเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำขวดอาหารที่มีการสร้างแผ่นวุ้นเซลลูโลสบนผิวน้ำอาหารมาเจือจางที่ 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7} นำสารละลายเชื้อเหล่านี้มา spread ลงบนอาหารแข็ง GEY Agar ซึ่งมีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นเลือกเก็บ โคโลนีที่มีลักษณะกลมมน สีขาวขุ่น แข็งและเหนียว เมื่อใช้จลวดเขี่ยเชื้อจะติดมาทั้ง โคโลนี แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นโคโลนีจะขรุขระ หรือสร้างโคโลนีซ้อนกัน โดยลักษณะดังกล่าวจะสอดคล้องกับรายงานของ Diaguilla (1967) และ Toyosaki และคณะ (1995) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของเชื้อ *Acetobacter* ที่สามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสได้ เลือกเก็บผลไม้ละ 50 ไอโซเลท นำโคโลนีเหล่านี้ใส่ในหลอดอาหาร HS medium ปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร โดยเลือกเก็บ 1 โคโลนีต่อ 1 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเลือกเฉพาะหลอดที่มีการสร้างแผ่นเซลลูโลสที่ผิวน้ำอาหาร จากไอโซเลททั้งหมด 100 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 87 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างเซลลูโลสบนผิวน้ำอาหารเหลว นำไอโซเลทที่สามารถสร้างเซลลูโลสมา cross streak อีกครั้งในอาหาร GEY Agar เก็บ โคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารเหลว HS medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เลือกเก็บเฉพาะหลอดที่มีการสร้างแผ่นเซลลูโลสที่ผิวน้ำอาหาร พบ 75 ไอโซเลทที่สร้างแผ่นเซลลูโลส โดยแบ่งเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากมะละกอ 32 ไอโซเลท และจากตะขบ 43 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่สร้างเซลลูโลสได้สูงๆ จากมะละกอและตะขบอย่างละ 20 ไอโซเลท มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar และย้อมแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่างของไอโซเลทเหล่านี้ ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำไอโซเลทเหล่านี้มาเลี้ยงบนเอกสารนี้ในอาหาร GEY Agar เป็นเวลา 3 วัน ส่วนใหญ่ลักษณะโคโลนีกลมมน ขนาดเล็ก สีครีม ผิวเรียบ แสดงดังไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

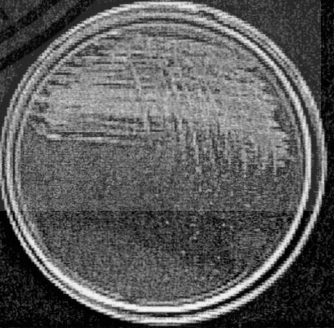
ตารางที่ 4.1 และเมื่อนำไอโซเลทเหล่านี้มาข้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างและการติดสีแกรม พบว่าทุกไอโซเลทติดสีแดงของซาฟรานีน มีรูปร่างเป็นท่อนตรงรี แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตะขบและมะละกอที่เน่าเสีย

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
ตะขบ -T 01	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 02	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 03	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 04	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	

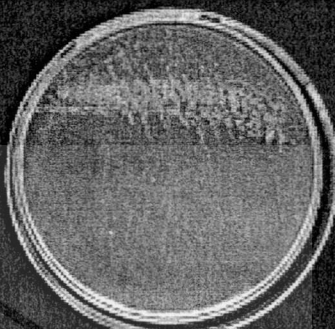
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-T 05	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 06	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 07	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 08	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

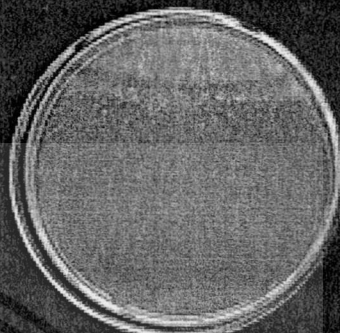
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-T 09	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 10	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 11	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 12	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

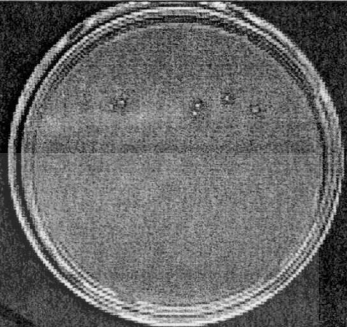
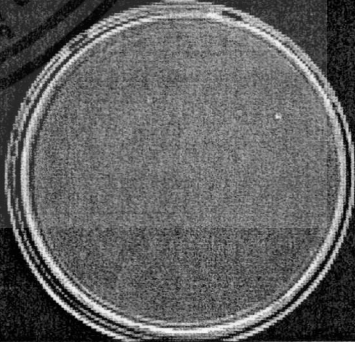
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-T 13	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 14	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 15	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 16	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	

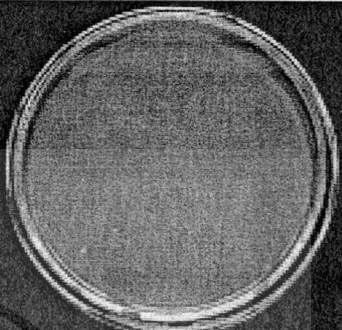
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-T 17	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 18	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 19	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-T 20	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	

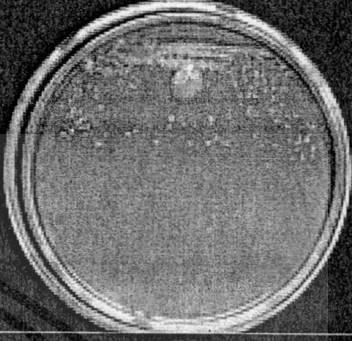
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
มะละกอ -P 01	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 02	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 03	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 04	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

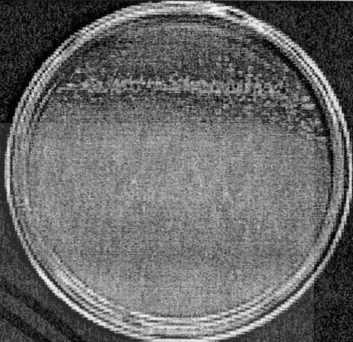
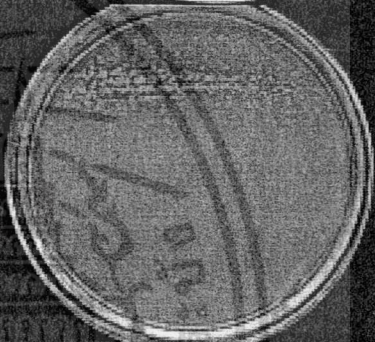
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-P 05	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 06	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 07	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 08	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	

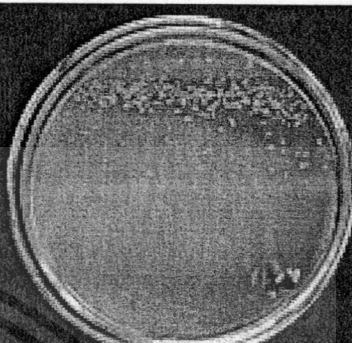
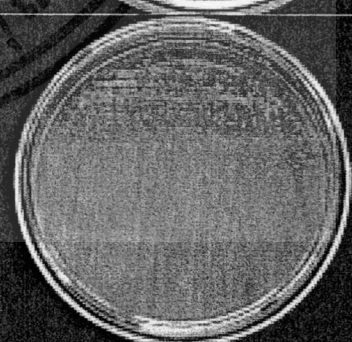
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-P 09	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 10	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 11	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 12	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

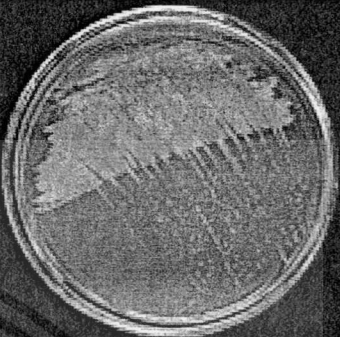
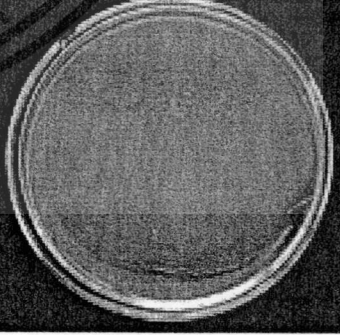
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เชดดูโลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-P 13	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 14	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 15	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 16	กลมมน สีครีม ผิวเรียบ	

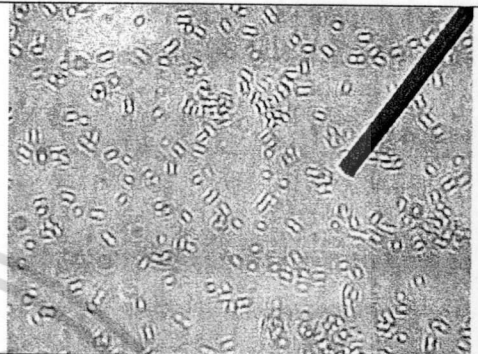
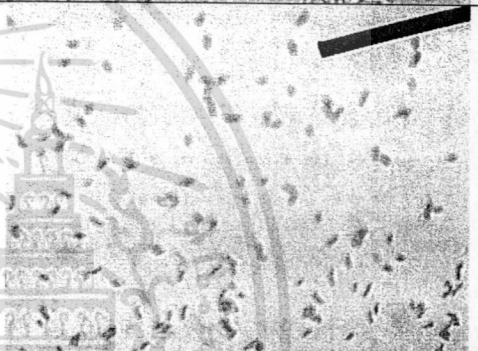
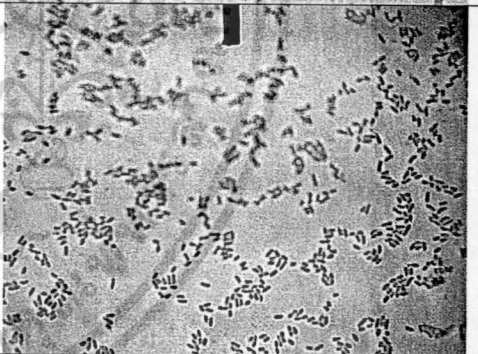
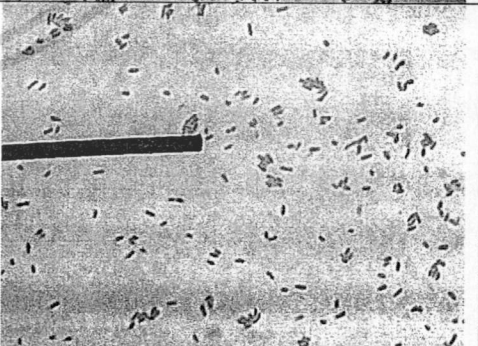
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร GEY Agar ที่มีอายุ 3 วัน	รูปถ่ายลักษณะโคโลนีของเชื้อ
-P 17	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 18	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 19	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	
-P 20	กลมนูน สีครีม ผิวเรียบ	

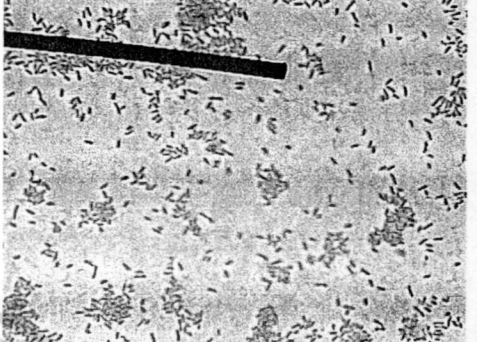
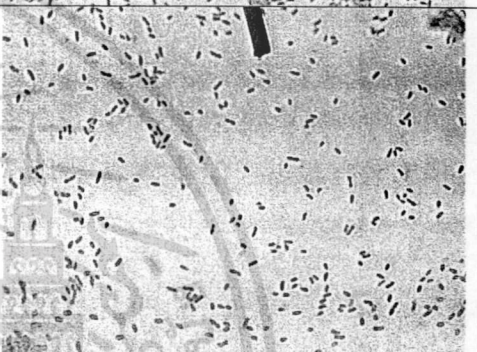
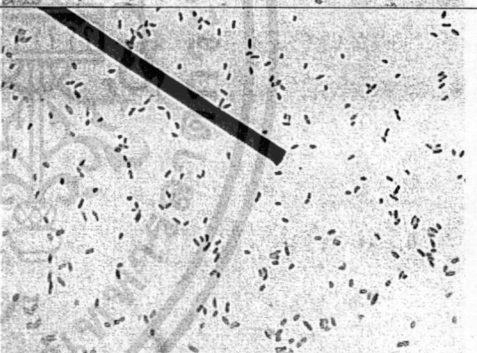
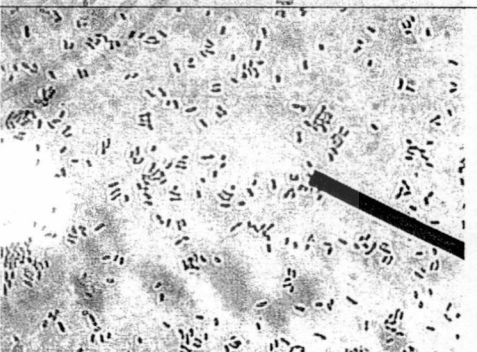
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียเซลลูโลสที่แยกได้จากตะขบและมะละกอ

รหัสของแบคทีเรีย เซลลูโลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
ตะขบ -T 01	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 02	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 03	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 04	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

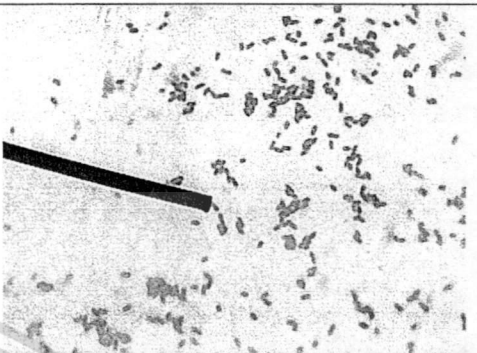
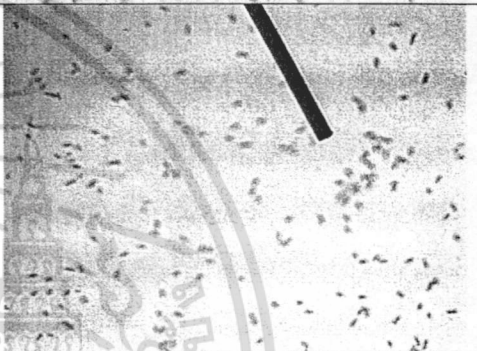
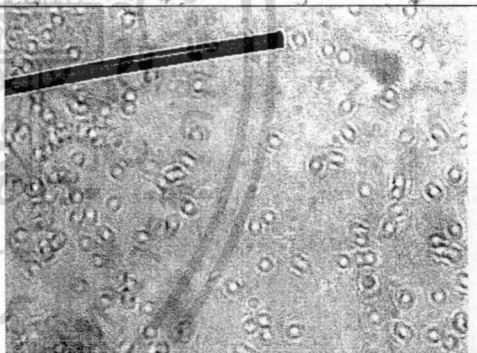
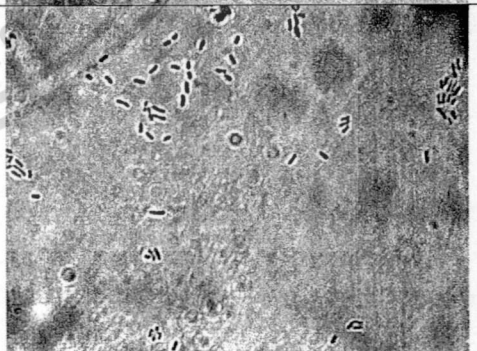
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรีย เซลล์โลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-T 05	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 06	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 07	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 08	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

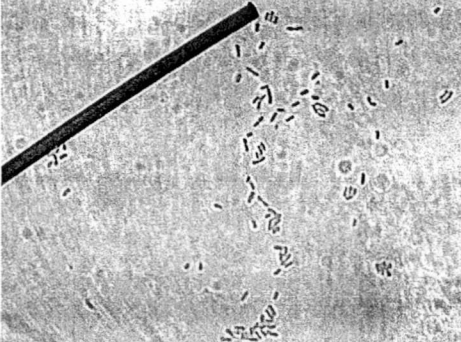
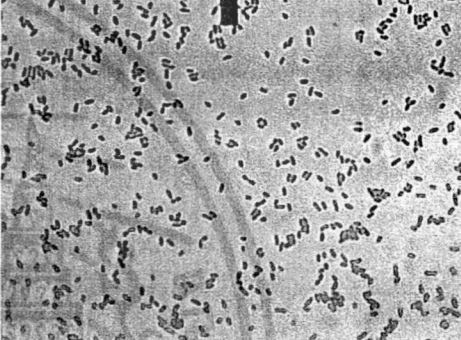
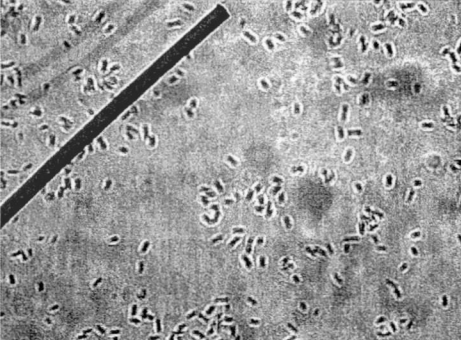
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรีย เซลล์โลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-T 09	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 10	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 11	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 12	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

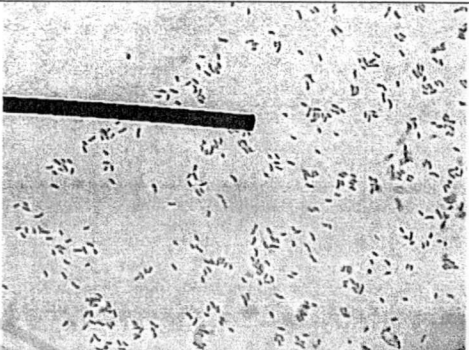
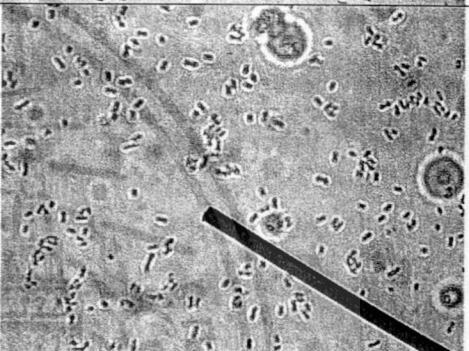
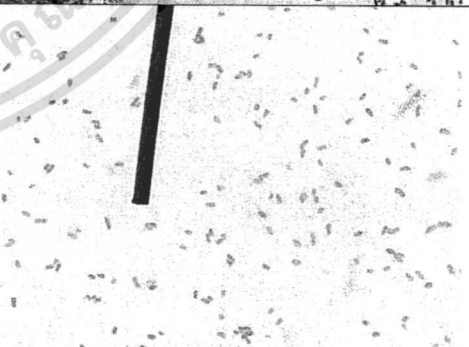
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรีย เซลล์โลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-T 13	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 14	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 15	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 16	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

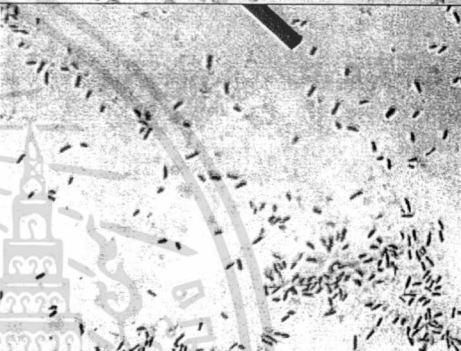
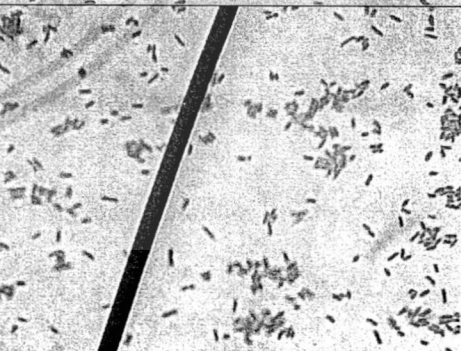
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรีย เซลล์	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-T 17	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 18	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 19	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	
-T 20	ท่อนสั้น ตรง ติดสีแดง เป็นแบคทีเรียแกรมลบ	

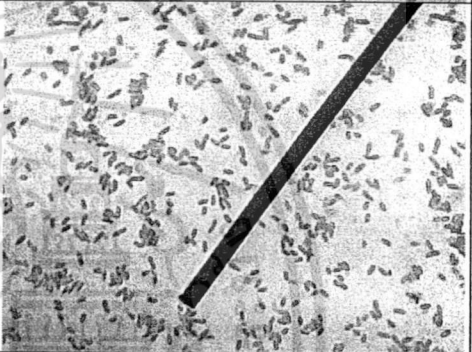
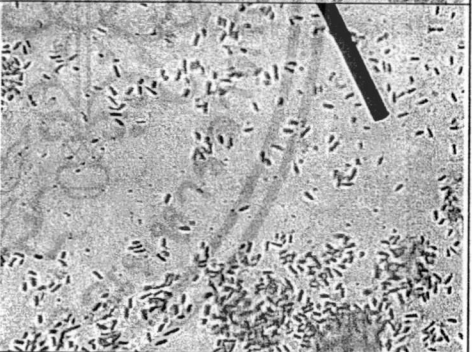
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของแบคทีเรีย เซลล์โลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
มะละกอ -P 01	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 02	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 03	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 04	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	

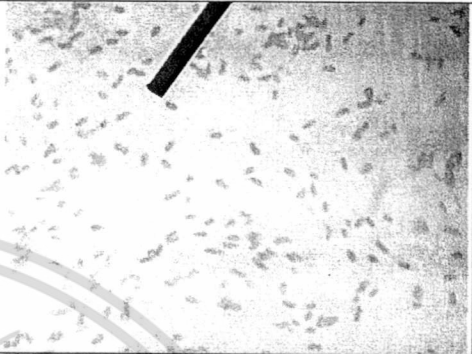
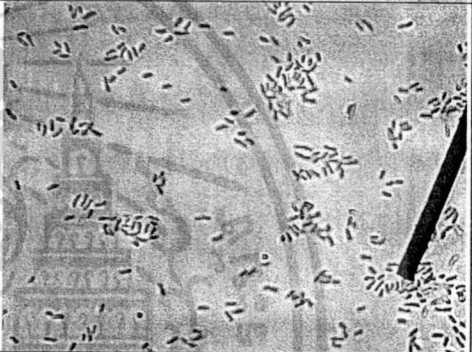
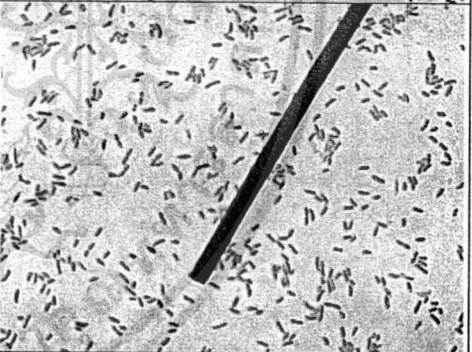
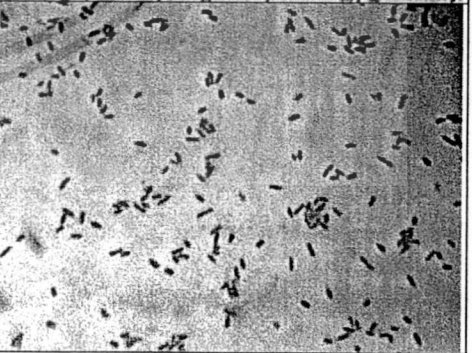
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-P 05	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 06	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 07	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 08	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	

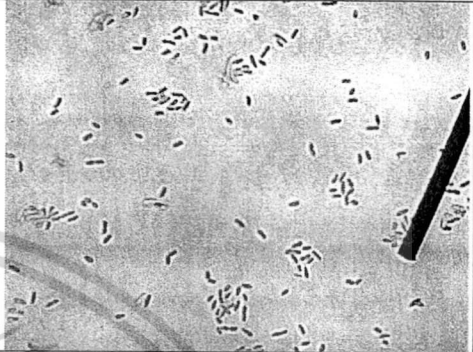
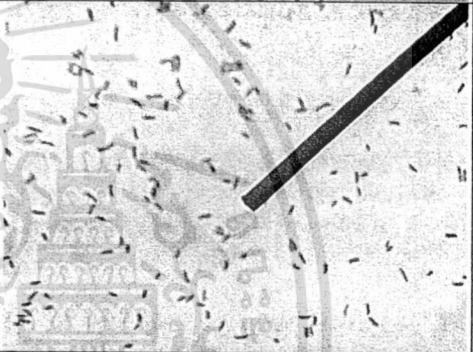
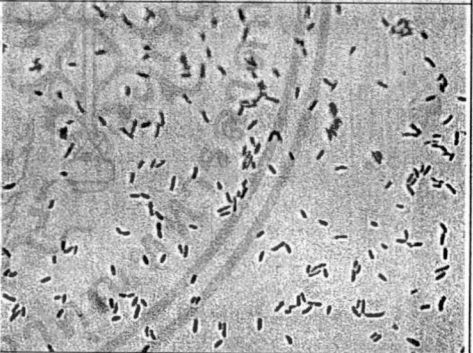
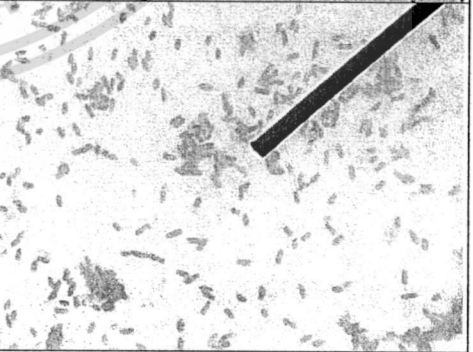
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-P 09	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 10	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 11	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 12	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	

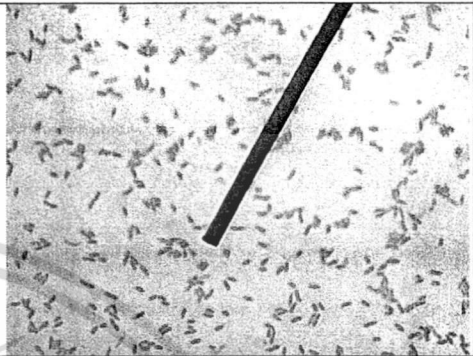
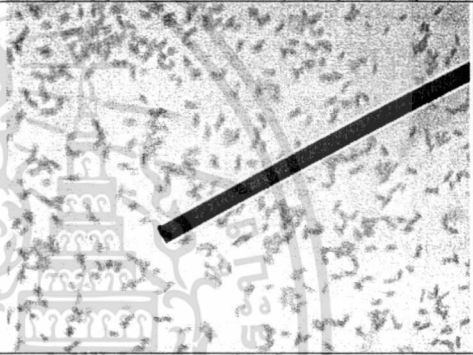
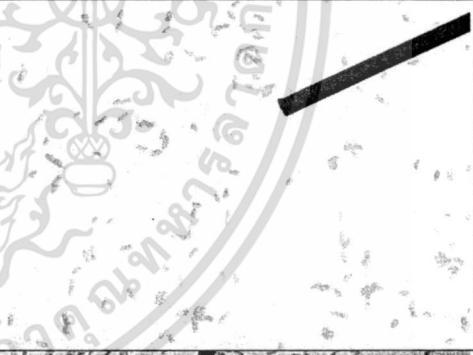
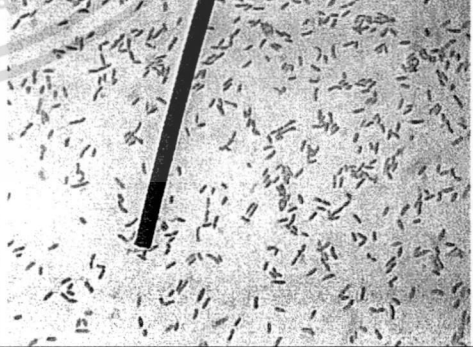
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-P 13	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 14	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 15	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 16	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัสของ แบคทีเรีย เซลล์โลส	รูปร่างและการติดสีแกรมของ แบคทีเรีย	ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า
-P 17	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 18	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 19	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	
-P 20	ท่อนรี ติดสีแดงเป็นแบคทีเรียแกรม ลบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาความสามารถในการสร้างเซลล์โลสของเชื้อที่แยกได้ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

จากการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตเซลล์โลสได้สูงจากตะขบ 20 ไอโซเลท (T1-T20) และจากมะละกอ 20 ไอโซเลท (P1-P20) นำไอโซเลททั้ง 40 ไอโซเลท มาหมักในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดย cross streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว บนอาหาร GEY Agar นำโคโลนีเดี่ยวที่มีอายุ 2 วันเลี้ยงในอาหาร HS medium ซึ่งบรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร 1 โคโลนีต่อ 1 พลาสติก นำไปบ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน และสภาวะเขย่านำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันเช่นกัน เมื่อครบกำหนดเก็บเกี่ยวเซลล์โลสที่ได้ คำนวณปริมาณเซลล์โลสที่ได้ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่าเปรียบเทียบกับกัน ผลการทดลองพบว่าจากการแยกเชื้อจากตะขบมี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลล์โลสสูงในสภาวะนิ่งคือ ไอโซเลท T01 T07 และ T11 โดยให้ปริมาณเซลล์โลส 0.3620 ± 0.0154 0.3508 ± 0.0176 และ 0.4416 ± 0.0376 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการหมักในสภาวะเขย่าของเชื้อเหล่านี้ให้ปริมาณเซลล์โลสค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในสภาวะนิ่ง โดยจะให้ปริมาณเซลล์โลสอยู่ในช่วง $0.0556 \pm 0.0083 - 0.2544 \pm 0.0356$ กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 4.3 จากการแยกเชื้อในมะละกอมิ 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลล์โลสสูงในสภาวะนิ่ง คือ ไอโซเลท P06 P09 และ P10 โดยให้ปริมาณเซลล์โลส 0.5485 ± 0.0625 0.4749 ± 0.0139 และ 0.4786 ± 0.0543 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการหมักในสภาวะเขย่าของเชื้อเหล่านี้ให้ปริมาณเซลล์โลสค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในสภาวะนิ่ง โดยจะให้ปริมาณเซลล์โลสอยู่ในช่วง $0.0891 \pm 0.0099 - 0.5059 \pm 0.0482$ กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ยกเว้นไอโซเลท P 08 ซึ่งให้ปริมาณเซลล์โลสในสภาวะเขย่าสูงถึง 0.5059 ± 0.0482 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 4.4

จากการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเซลล์โลสของเชื้อที่แยกได้จากตะขบและมะละกอทั้งในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า พบว่าไอโซเลทที่แยกได้ส่วนใหญ่ให้ปริมาณเซลล์โลสในสภาวะนิ่งสูงกว่าสภาวะเขย่า ยกเว้น ไอโซเลท P 08 ซึ่งแยกได้จากมะละกอ ซึ่งในสภาวะนิ่งมีปริมาณเซลล์โลส 0.4523 ± 0.0668 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ขณะที่สภาวะเขย่ามีปริมาณเซลล์โลส 0.5059 ± 0.0482 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ไอโซเลทที่ผลิตเซลล์โลสได้สูงในสภาวะนิ่งส่วนใหญ่มักได้จากมะละกอน่าเสีย แสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเซลล์โลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะขบในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่า

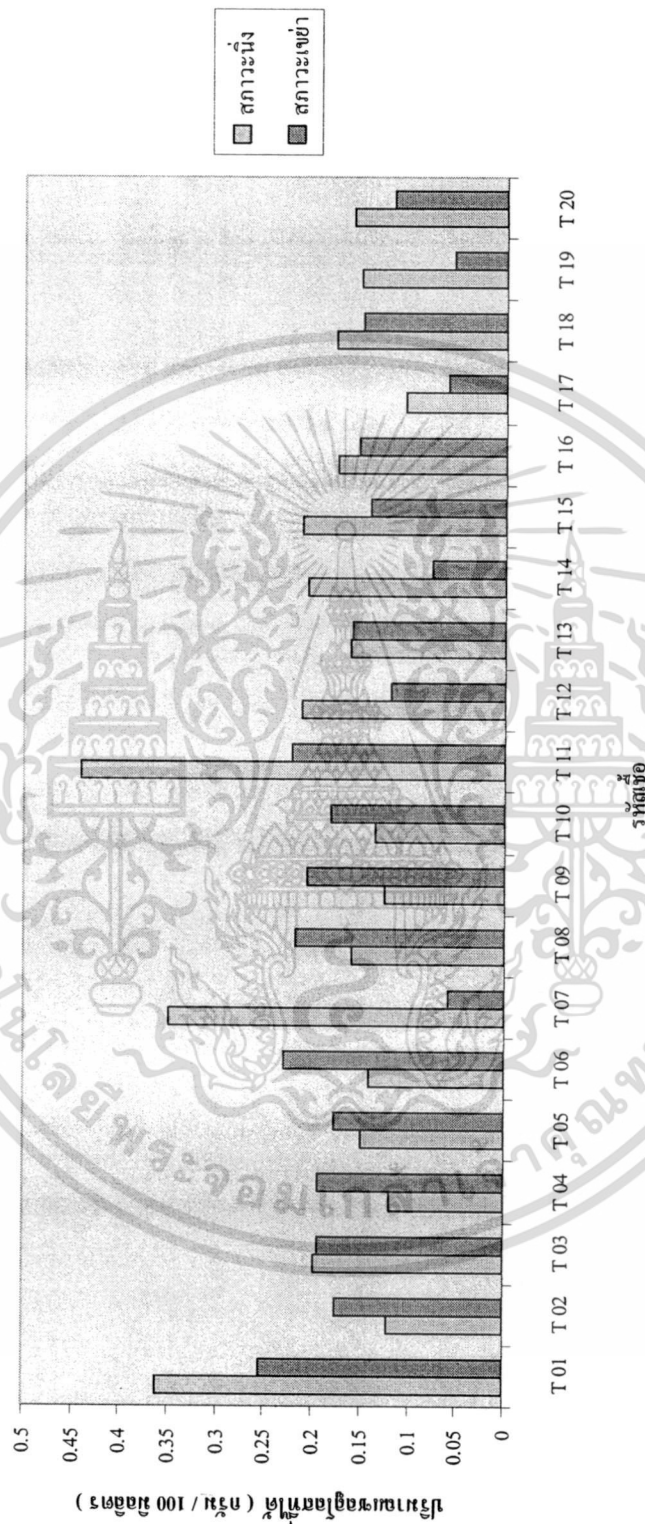
ไอโซเลท	ปริมาณเซลล์โลสที่ผลิตได้ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
T 01	0.3620 ± 0.0154	0.2544 ± 0.0356
T 02	0.1756 ± 0.0222	0.1216 ± 0.01730
T 03	0.1992 ± 0.1192	0.1940 ± 0.0256
T 04	0.1934 ± 0.0086	0.1192 ± 0.0052
T 05	0.1773 ± 0.0424	0.1501 ± 0.0372
T 06	0.2302 ± 0.0234	0.1423 ± 0.0190
T 07	0.3508 ± 0.0176	0.0584 ± 0.0196
T 08	0.1595 ± 0.0417	0.2186 ± 0.0364
T 09	0.1256 ± 0.0067	0.2062 ± 0.0053
T 10	0.1360 ± 0.0151	0.1829 ± 0.0388
T 11	0.4416 ± 0.0376	0.2235 ± 0.0306
T 12	0.2123 ± 0.0050	0.1197 ± 0.0193
T 13	0.1617 ± 0.0244	0.1600 ± 0.0196
T 14	0.2070 ± 0.0040	0.0765 ± 0.0167
T 15	0.2132 ± 0.0250	0.1420 ± 0.0539
T 16	0.1755 ± 0.0345	0.1533 ± 0.4110
T 17	0.1059 ± 0.0333	0.0600 ± 0.2007
T 18	0.1777 ± 0.0515	0.1508 ± 0.625
T 19	0.1513 ± 0.0457	0.0556 ± 0.0083
T 20	0.1590 ± 0.0154	0.1184 ± 0.0468

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเซลล์โลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากมะละกอในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

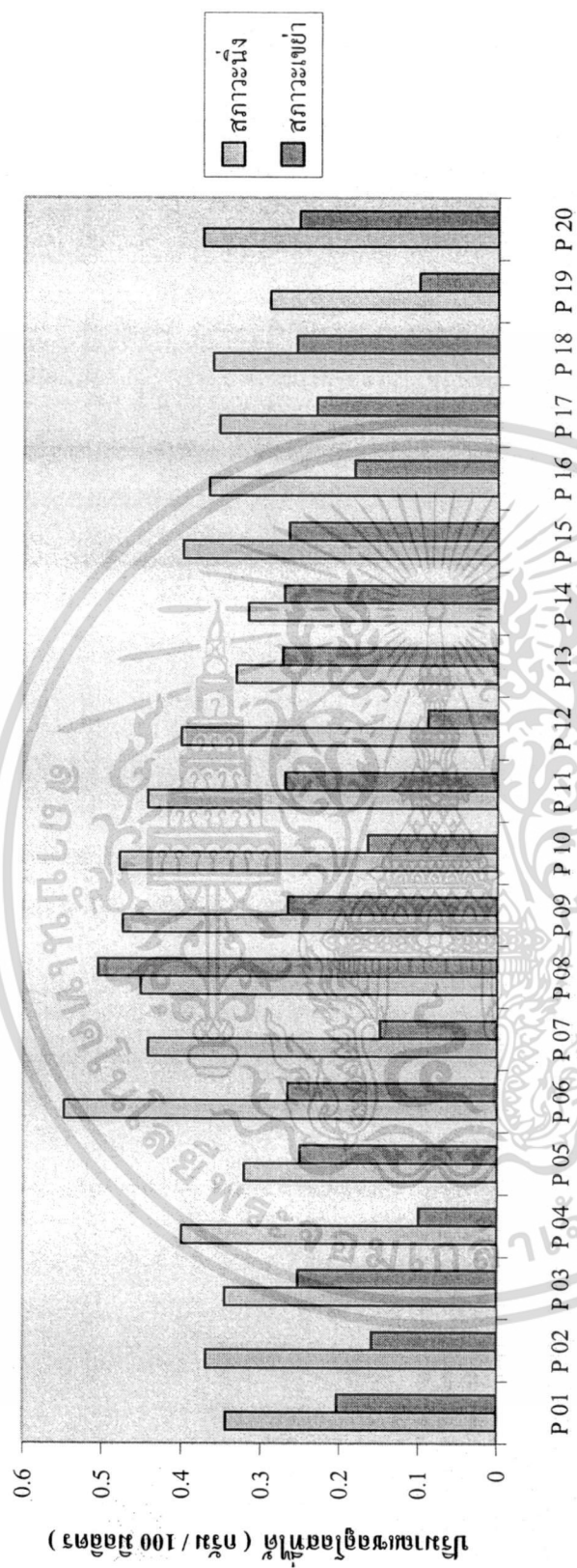
ไอโซเลท	ปริมาณเซลล์โลสที่ผลิตได้ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	
	สภาวะนิ่ง	สภาวะเขย่า
P 01	0.3444 ± 0.0394	0.2034 ± 0.0053
P 02	0.3698 ± 0.0223	0.1593 ± 0.0156
P 03	0.3459 ± 0.0434	0.2533 ± 0.0189
P 04	0.4005 ± 0.0532	0.0999 ± 0.0101
P 05	0.3214 ± 0.2004	0.2510 ± 0.0352
P 06	0.5485 ± 0.0625	0.2665 ± 0.0298
P 07	0.4429 ± 0.0462	0.1495 ± 0.0094
P 08	0.4523 ± 0.0668	0.5059 ± 0.0482
P 09	0.4749 ± 0.0139	0.2666 ± 0.0237
P 10	0.4786 ± 0.0543	0.1657 ± 0.0174
P 11	0.4436 ± 0.0359	0.2704 ± 0.0482
P 12	0.4016 ± 0.0226	0.0891 ± 0.0099
P 13	0.3328 ± 0.0248	0.2739 ± 0.0387
P 14	0.3174 ± 0.0195	0.2719 ± 0.0478
P 15	0.3997 ± 0.0459	0.2659 ± 0.0391
P 16	0.3664 ± 0.0369	0.1823 ± 0.0337
P 17	0.3540 ± 0.0556	0.2308 ± 0.0308
P 18	0.3619 ± 0.0387	0.2558 ± 0.0530
P 19	0.2898 ± 0.0281	0.1002 ± 0.0120
P 20	0.3746 ± 0.0458	0.2525 ± 0.0221

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะกอนในอาหาร HS medium ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ปริมาณเชลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้จากตะกอนในอาหาร HS medium ในสภาวะนี้้งและสภาวะเย่่า

จากการศึกษาการผลิตเซลล์โลสในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเซลล์โลสที่เกิดขึ้นในสภาวะทั้งสองนั้นจะแตกต่างกัน จากการสังเกตลักษณะการสร้างเซลล์โลสที่สภาวะนิ่งจะสร้างเซลล์โลสในลักษณะเป็นเส้นใยและรวมตัวกันเป็นแผ่นวุ้นหนาลอยอยู่เหนือผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อรับออกซิเจน ส่วนในสภาวะเขย่าการสร้างเซลล์โลสจะมีลักษณะเป็นเม็ดๆ หรือเกาะกันเป็นก้อน ซึ่งขนาดขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ และความเร็วรอบในการเขย่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Toyosaki และคณะ (1995) และ Sanchez และคณะ (1999)

จากการทดลองได้คัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเซลล์โลสได้สูงในสภาวะนิ่ง ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 นำไปจัดจำแนกโดยดูลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม รวมทั้งการทดสอบชีวเคมีต่างๆ เพื่อจัดจำแนกชนิดของไอโซเลทเหล่านี้ต่อไป

4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียเซลล์โลส

จากการคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเซลล์โลสได้สูงในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 นำมาทำการจัดจำแนกโดยดูลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมรวมทั้งทดสอบชีวเคมีต่างๆ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบทางชีวเคมีในการจัดจำแนกแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวที่ได้จากตะกอนและมวลละกอน

การทดสอบ รหัสชื่อ	Catalase Test	Oxidation of Ethanol	Oxidative/ Fermentative Test	Methyl red Test	Voques- Proskauer Test	Indole Production Test	Hydrogen sulfide Production test	Carbohydrate Fermentation test (Glucose)	Production of Hydroxyacetone from glycerol
T01	+	-	+/-	+	-	-	-	A	+
T07	+	+	+/-	+	-	-	-	A	+
T11	+	-	+/-	+	-	-	-	A	+
T12	+	+	+/+	+	-	-	-	A	+
P06	+	-	-/-	+	-	-	-	A	+
P08	+	-	-/-	+	-	-	-	A	+
P09	+	-	+/-	+	-	-	-	A	+
P10	+	-	+/-	+	-	-	-	A	+

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส พบว่า เมื่อนำไอโซเลทของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสได้สูง ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 เลี้ยงในอาหาร GY Agar ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง และนำโคโลนีของเชื้อแต่ละไอโซเลทมาทดสอบโดยการหยดสาร สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบเกิดฟองอากาศซึ่งให้ผลเป็นบวก

จากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอทานอล โดย streak ที่ผิวหน้าของอาหาร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาตรวจผลพบว่าไอโซเลทที่ T07 และ T12 เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลืองซึ่งให้ผลเป็นบวก และ T01 T11 P06 P08 P09 และ P10 ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารซึ่งให้ผลเป็นลบ

จากการทดสอบ oxidative-fermentative โดยปลูกเชื้อแบบปักตรง (Stab inoculation) ตลอดความลึกของอาหารทดสอบ oxidative-fermentative เชื้อละ 2 หลอด หลอดที่สอง เทพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อปิดทับผิวหน้าของอาหาร ส่วนหลอดที่หนึ่ง ไม่ต้องเทพาราฟินปิดทับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารของทั้งสองหลอด ผลบวกให้ผลโดยการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง และผลลบแสดงโดยการไม่เปลี่ยนสีของอาหาร พบว่าไอโซเลทที่ T01 T07 T11 P09 และ P10 เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองเฉพาะหลอดที่ไม่เทพาราฟินปิดทับ และไอโซเลทที่ T12 เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารทั้งสองหลอด ไอโซเลทที่ P06 และ P08 ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารทั้งในหลอดที่ทะเลและไม่เทพาราฟินปิดทับ

จากการทดสอบเมทิลเรด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 5 วัน ทำการตรวจผลครั้งแรกเมื่อบ่มเชื้อครบ 2 วัน โดยการหยดสารละลายเมทิลเรดลงในหลอดอาหารแต่ละไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร จึงทำการบ่มต่ออีกจนครบ 5 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบผลอีกครั้ง พบว่าทุกไอโซเลทเกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร จากสีเหลืองเป็นสีส้มจึงให้ผลเป็นบวก

จากการทดสอบ VP โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการตรวจผลโดยการหยดสารละลายแอลฟาเนฟทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และหยดสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ พบว่าทุกไอโซเลทไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร จึงให้ผลเป็นลบ

จากการทดสอบการสร้างอินโดล โดยการปลูกเชื้อลงในอาหาร tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจผลโดยหยดสารละลาย Kovac 's reagent ลงในแต่ละไอโซเลท เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ พบว่าทุกไอโซเลทเกิดสีส้มซึ่งให้ผลเป็นลบ

จากการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยนำเชื้อ streak ที่ผิวหน้าของอาหาร triple sugar iron agar slant (TSI) และแทงตรงลงไปที่ส่วนก้นหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการตรวจผลพบว่าทุกไอโซเลท ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารทั้งที่ผิวหน้าอาหารและที่ก้นหลอด รวมทั้งไม่มีตะกอนสีดำ แสดงว่าไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

จากการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต(น้ำตาลกลูโคส) โดยปลูกเชื้อลงในอาหารที่ใช้ทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการตรวจผลการสร้างกรดและก๊าซทุกวันจนครบ 7 วัน พบว่าทุกไอโซเลทเกิดการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แต่ในหลอดดักก๊าซไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารและไม่เกิดก๊าซ ซึ่งแสดงผลเป็นบวก

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบการสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องหรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบผลโดยการหยดสารละลายเฟลลิง (Fehling) ลงบนเชื้อ พบว่าไอโซเลทที่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 เกิดวงสีแดงอิฐรอบๆ โคโลนิของเชื้อซึ่งให้ผลเป็นบวก

จากการดูลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การย้อมแกรมเพื่อรูปร่างและการติดสีของไอโซเลทที่แยกได้ รวมทั้งการทดสอบทางชีวเคมีบางประการยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นแบคทีเรียเชลลูโลสจีนัสใด ซึ่งจะต้องทดสอบมากกว่านี้ถึงสามารถจะบอกได้ว่าเชื้อที่แยกได้อยู่ในจีนัสหรือ สปีชีส์ใด ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดจำแนกแบคทีเรียเชลลูโลส ขณะเดียวกันได้ส่งไอโซเลทที่ผลิตเชลลูโลสได้สูง คือ T11 และ P09 ไปจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค 16s rDNA ที่ ส.ว.ท.ช. พบว่าไอโซเลททั้งสองเป็น *Gluconacetobacter nataicola*

4.4 ศึกษาการเจริญและการผลิตเชลลูโลสของเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976

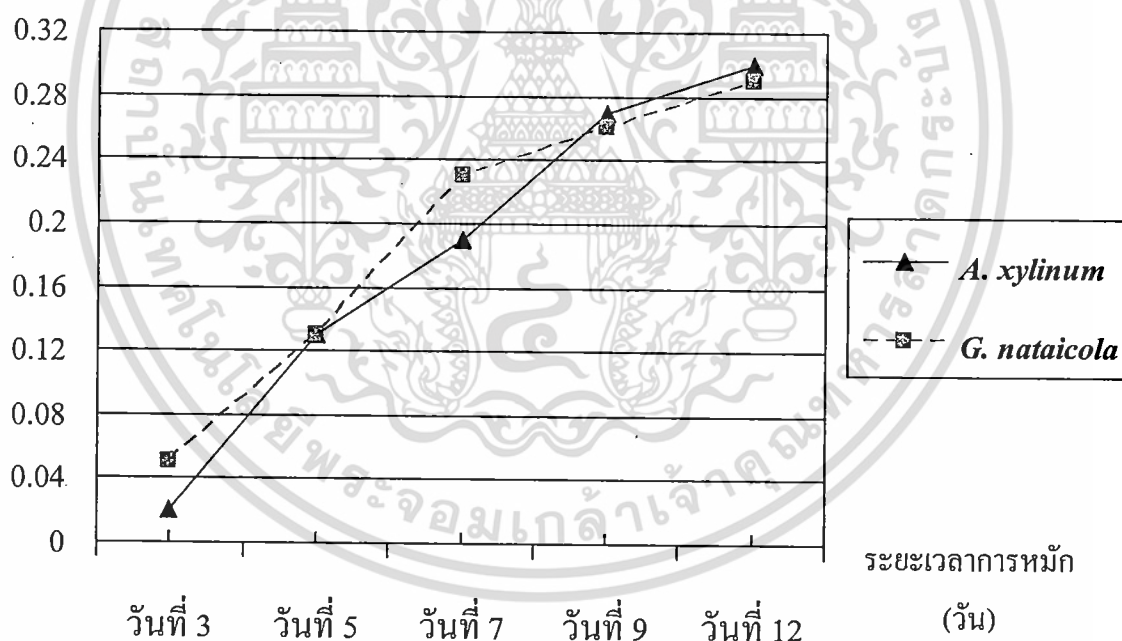
จากการเลี้ยงเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 12 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างเชลลูโลสจากแบคทีเรียหรือวุ้นมะพร้าวในวันที่ 3 5 7 9 และ 12 ของการหมัก โดยทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก วัดความหนาของแผ่นเชลลูโลส และผลผลิตเชลลูโลส โดยคำนวณจากน้ำหนักแห้งต่ออาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่าระยะเวลาการเจริญที่มีอัตราการสร้างเชลลูโลสสูงสุดของเชื้อ *G. nataicola* อยู่ในช่วง 5-7 วันของการหมัก โดยให้ผลผลิตเชลลูโลสอยู่ในช่วง 0.13-0.23 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หลังวันที่ 7 ของการหมักอัตราการสร้างเชลลูโลสดำลง สำหรับเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 มีอัตราการสร้างเชลลูโลสสูงสุดในช่วง 7-9 วัน โดยได้ผลผลิตเชลลูโลสอยู่ในช่วง 0.19-0.27 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มผลผลิตเชลลูโลสลดลง แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.3 ลักษณะเชลลูโลสที่ได้จากเชื้อทั้งสองแตกต่างกัน โดยพบว่าเชลลูโลสที่ได้จากการหมักของเชื้อ *G. nataicola* จะมีลักษณะบวมน้ำ ผิวเรียบไม่สม่ำเสมอ

เอกสารสำหรับเชลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ผิวเรียบสม่ำเสมอ ไม่บวมน้ำ ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงผลผลิตเซลลูโลส ความหนา และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 และเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* ในการหมักที่สภาวะนิ่งอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน

วันที่	เชื้อ <i>Acetobacter xylinum</i> TISTR 976			เชื้อ <i>Gluconacetobacter nataicola</i>		
	ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH อาหาร เลี้ยงเชื้อ	ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH อาหาร เลี้ยงเชื้อ
3	0.02	0.32	3.08	0.05	0.40	3.18
5	0.13	0.50	2.86	0.13	0.65	3.13
7	0.19	0.62	2.82	0.23	0.87	3.11
9	0.27	0.71	2.75	0.26	0.91	2.83
12	0.30	0.75	2.67	0.29	0.97	2.76

ผลผลิตเซลลูโลส
(กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)



รูปที่ 4.3 แสดงผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 และเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* ในการหมักที่สภาวะนิ่งอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *G. nataicola*

4.5.1 แหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว โดยใช้แหล่งคาร์บอน 4 ชนิดเปรียบเทียบกับคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลแมนนิทอล โดยเติมความเข้มข้นร้อยละ 5 บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำเก็บตัวอย่างแผ่นเซลลูโลสโดยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก วัดความหนาของแผ่นเซลลูโลส หาน้ำหนักแห้งและนำมาคำนวณหาผลผลิตเซลลูโลสต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร พบว่าในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดโดยแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีความหนาเท่ากับ 0.91 เซนติเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.09 และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.31 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร รองลงมาเป็นน้ำตาลกลูโคส แสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.4 จากการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด อาจเนื่องมาจาก *G. nataicola* ที่นำมาใช้ในการทดลองสามารถออกซิไดซ์น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และแมนนิทอล ขณะที่เชื้อ *A. xylinum* ที่นำมาใช้ผลิตเซลลูโลส ส่วนใหญ่จะออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสและได้กลูโคน (gluconate) (De Lay *et al.*, 1984) มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงมาก การเจริญของเชื้อและผลผลิตเซลลูโลสจะลดลงตามไปด้วย จากการทดลองของ Akira และคณะ (1997) พบว่า จากการใช้เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสที่แยกได้จากแหล่งต่างๆและให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนสองชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส พบว่า เชื้อต่างๆที่แยกได้สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส โดยจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าและค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงน้อยกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ได้

ตารางที่ 4.7 ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส

ความหนาของแผ่นเซลลูโลส และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการหมัก 7 วัน

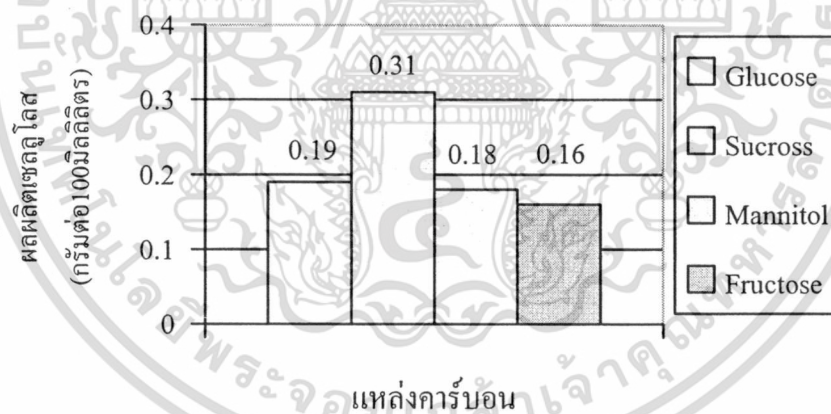
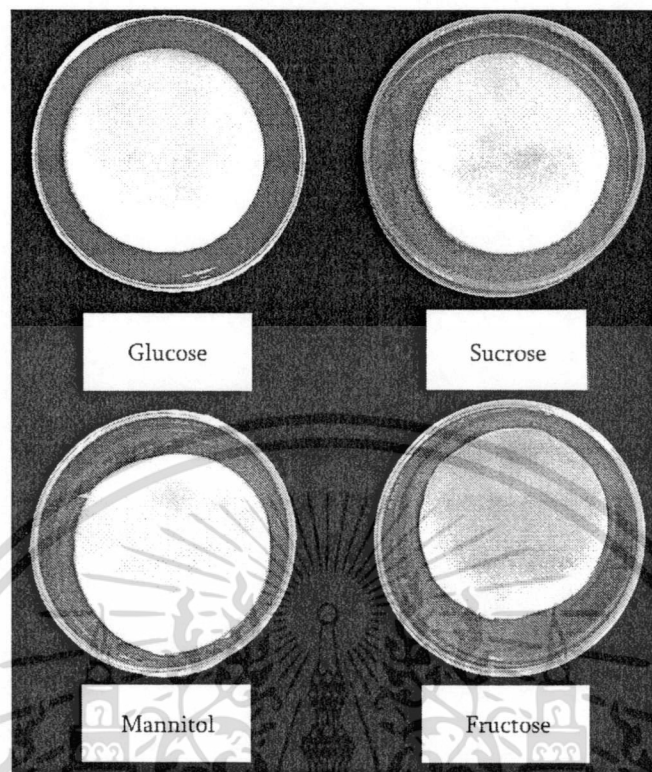
แหล่งคาร์บอน	เชื้อ <i>Gluconacetobacter nataicola</i>		
	ผลผลิตเซลลูโลส ⁽¹⁾ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ
- Glucose	0.19 ^{b(2)}	0.71	2.97
- Sucrose	0.31 ^a	0.91	3.09
- Mannitol	0.18 ^b	0.65	3.37
- Fructose	0.16 ^b	0.82	3.37

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในศตมภ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลฟรุคโตสไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 แหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวโดยใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดเปรียบเทียบกับคือ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) โดยเติมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำเก็บตัวอย่างแผ่นเชลลูโลสโดยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก วัดความหนาของแผ่นเชลลูโลส และคำนวณหาผลผลิตเชลลูโลสต่ออาหาร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่าในการใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตเชลลูโลสสูงสุด โดยแผ่นเชลลูโลสที่ได้มีความหนาเท่ากับ 0.63 เซนติเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.47 และมีผลผลิตเชลลูโลสเท่ากับ 0.39 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร รองลงมาเป็น เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟตและยีสต์สกัด ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.5

จากการใช้น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor, CSL) เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าให้ผลผลิตเชลลูโลสสูงสุด ซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับการทดลองของ Matsuoka *et al.*, (1993) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในน้ำแช่ข้าวโพดมีแลคเตท (lactate) เป็นส่วนประกอบ จึงมีผลทำให้การเจริญและการผลิตเชลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* เพิ่มขึ้น

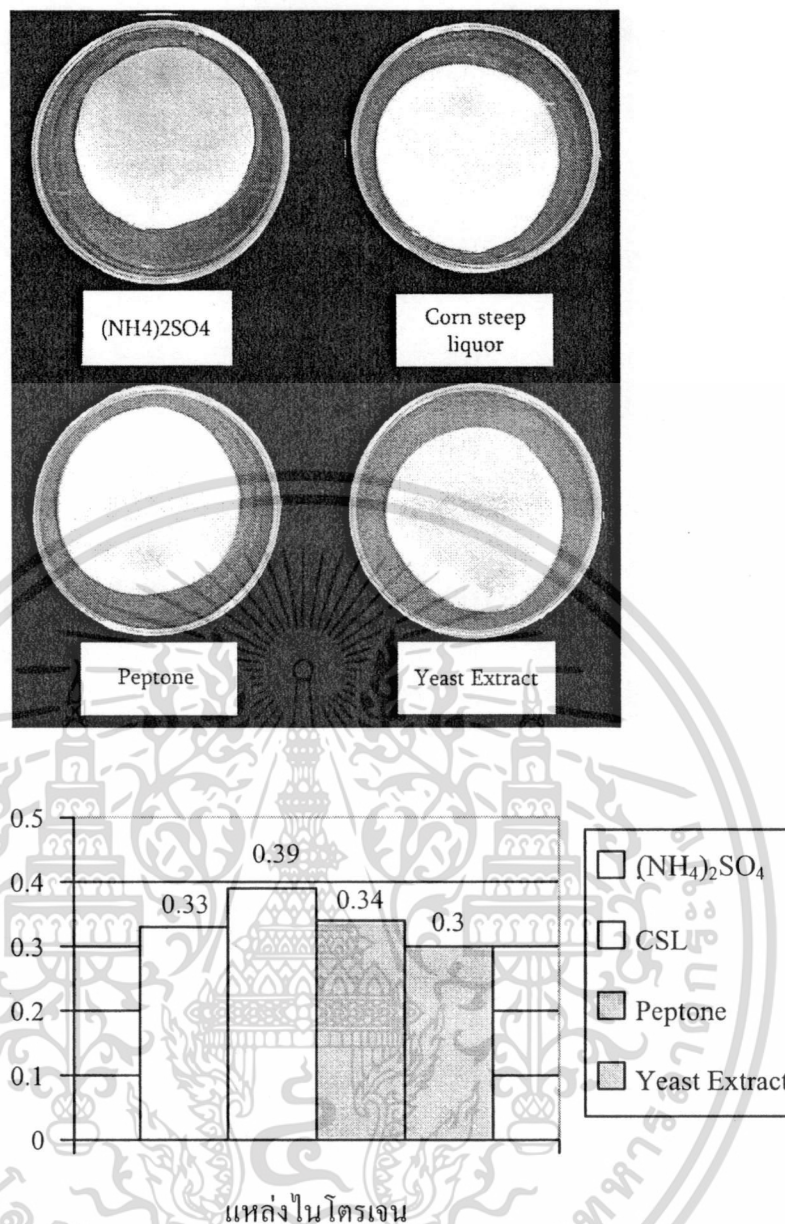
ตารางที่ 4.8 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเชลลูโลส ความหนาของแผ่นเชลลูโลส และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการหมัก 7 วัน

แหล่งไนโตรเจน	เชื้อ <i>Gluconacetobacter nataicola</i>		
	ผลผลิตเชลลูโลส ⁽¹⁾ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ
- (NH ₄) ₂ SO ₄	0.33 ^{b(2)}	0.65	3.10
- Corn steep liquor	0.39 ^a	0.63	3.47
- Peptone	0.34 ^b	0.62	3.19
- Yeast Extract	0.30 ^c	0.57	3.18

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสคริปต์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P \leq 0.05$)



รูปที่ 4.5 แสดงภาพการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. natica* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลลูโลสจากแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นน้ำแช่ข้าวโพดให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และมีความแตกต่างทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน และยีสต์สกัด แสดงดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 ศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวโดยแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อดังนี้ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลล์โลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลล์โลสที่ได้ วัดความหนาและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตเซลล์โลสสูงสุด โดยแผ่นเซลล์โลสมีความหนาเท่ากับ 0.94 เซนติเมตรค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.08 และมีผลผลิตเซลล์โลสเท่ากับ 0.22 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร รองลงมาเป็นที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.6

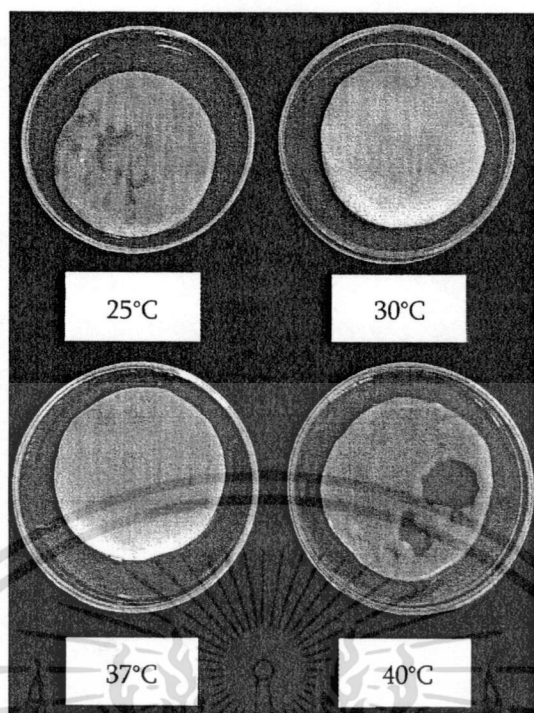
Jonas และ Farah (1998) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์โลสอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ขณะที่นักวิจัยบางท่านพบว่าอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส (Keshk *et al.*, 2006)

ตารางที่ 4.9 ผลของการใช้อุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลล์โลส ความหนาของแผ่นเซลล์โลส และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการหมัก 7 วัน

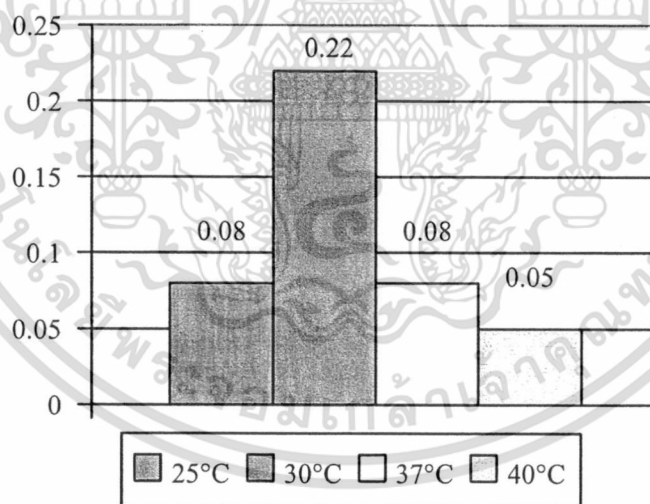
อุณหภูมิ	เชื้อ <i>Gluconacetobacter nataicola</i>		
	ผลผลิตเซลล์โลส ⁽¹⁾ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ
- 25°C	0.08 ^{b(2)}	0.43	3.28
- 30°C	0.22 ^a	0.94	3.08
- 37°C	0.08 ^b	0.57	3.11
- 40°C	0.05 ^c	0.33	3.38

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

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



ผลผลิตเซลล์โตส
(กรัมต่อ100มิลลิตร)



อุณหภูมิ
ในการเลี้ยงเชื้อ

รูปที่ 4.6 แสดงผลของการใช้อุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลล์โตส ภายหลังการหมัก 7 วัน

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลล์โตสที่อุณหภูมิต่างๆ มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ในการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตเซลล์โตสสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 37 และ 40 องศาเซลเซียส เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.4 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH)

ในการศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ทำการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดจึงทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ูโลสมาวเคราะห์ผลผลิตเซลล์ูโลสที่ได้ วัดความหนาและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.5 และ 6.0 ให้ผลผลิตเซลล์ูโลสสูงใกล้เคียงกัน โดยให้แผ่นเซลล์ูโลสที่มีความหนาเท่ากับ 0.80 0.52 และ 0.52 เซนติเมตรตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมักเท่ากับ 3.21 3.54 และ 3.73 ตามลำดับ และมีผลผลิตเซลล์ูโลสเท่ากับ 0.26 0.24 และ 0.25 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตรตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.7 โดยทั่วไปค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ูโลสอยู่ในช่วง 4-7 ส่วนใหญ่จะใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5-6 (Pouramezan *et al.*, 2009)

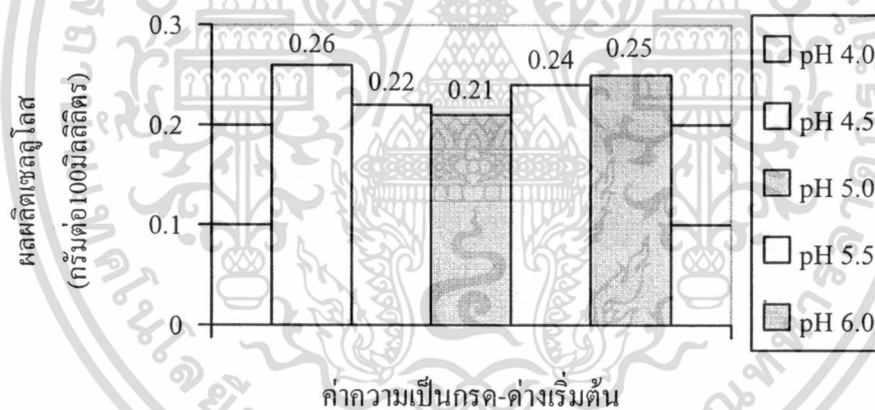
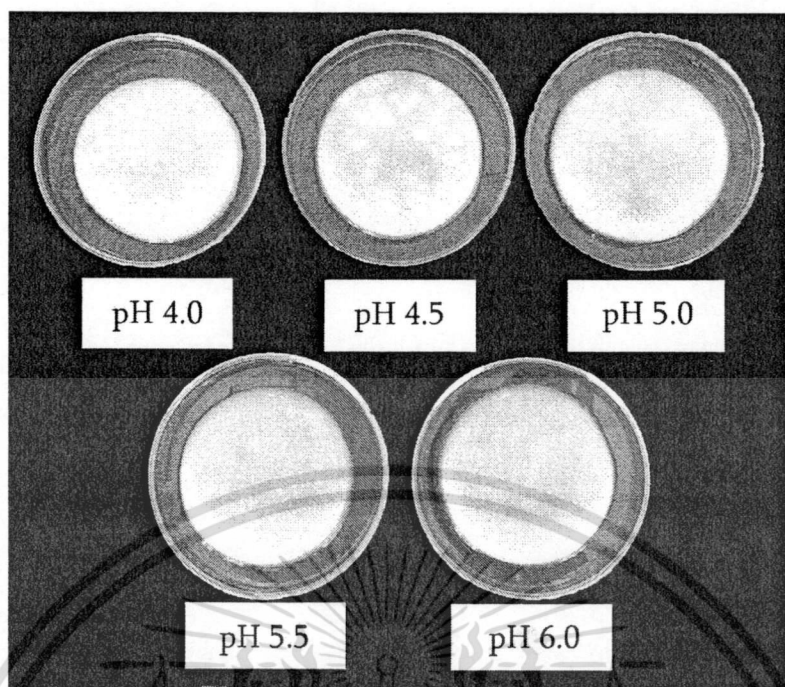
ตารางที่ 4.10 ผลของการใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลล์ูโลส ความหนาของแผ่นเซลล์ูโลส และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการหมัก 7 วัน

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	เชื้อ <i>Gluconacetobacter nataicola</i>		
	ผลผลิตเซลล์ูโลส ⁽¹⁾ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ
- pH 4.0	0.26 ^{a(2)}	0.80	3.21
- pH 4.5	0.22 ^b	0.56	3.27
- pH 5.0	0.21 ^b	0.49	3.53
- pH 5.5	0.24 ^{ab}	0.52	3.54
- pH 6.0	0.25 ^{ab}	0.52	3.73

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในสัณคณ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P \leq 0.05$)



รูปที่ 4.7 แสดงผลของการใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. natica* ต่อผลผลิตเซลล์โลส ภายหลังจากการหมัก 7 วัน

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลล์โลสในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ในการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 ซึ่งให้ผลผลิตเซลล์โลสสูงสุด ไม่มีความแตกต่างกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 และ 6.0 แสดงดังตารางที่ 4.10 ในการทดลองนี้จึงเลือกการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเป็น 5.5 เนื่องจากให้ผลผลิตเซลล์โลสใกล้เคียงกับการใช้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เนื่องจากอาหารสูตรน้ำมะพร้าวมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5

4.5.5 ศึกษาการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดลองเติมเอทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอล ดังนี้ ร้อยละ 1 3 5 7 และ 9 ของปริมาตรอาหาร บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลล์ูโลสวิเคราะห์ผลผลิตเซลล์ูโลสที่ได้ วัดความหนาและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเอทานอลร้อยละ 1 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลผลิตเซลล์ูโลสสูงสุด โดยให้แผ่นเซลล์ูโลสที่มีความหนาเท่ากับ 0.75 เซนติเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมักเท่ากับ 3.08 และมีผลผลิตเซลล์ูโลสเท่ากับ 0.15 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร รองลงมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเอทานอลร้อยละ 3 และร้อยละ 5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.8 ซึ่งการเติมกรดอินทรีย์บางชนิดรวมทั้งเอทานอลจะส่งเสริมการผลิตเซลล์ูโลสให้สูงขึ้น (Soo – Yeon Kim *et al.*, 2006) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Son *et al.*, (2001) ซึ่งพบว่าการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักของเชื้อ *Acetobacter* sp.A9 ทำให้ผลผลิตของเซลล์ูโลสเพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 4.11 ผลของการใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ

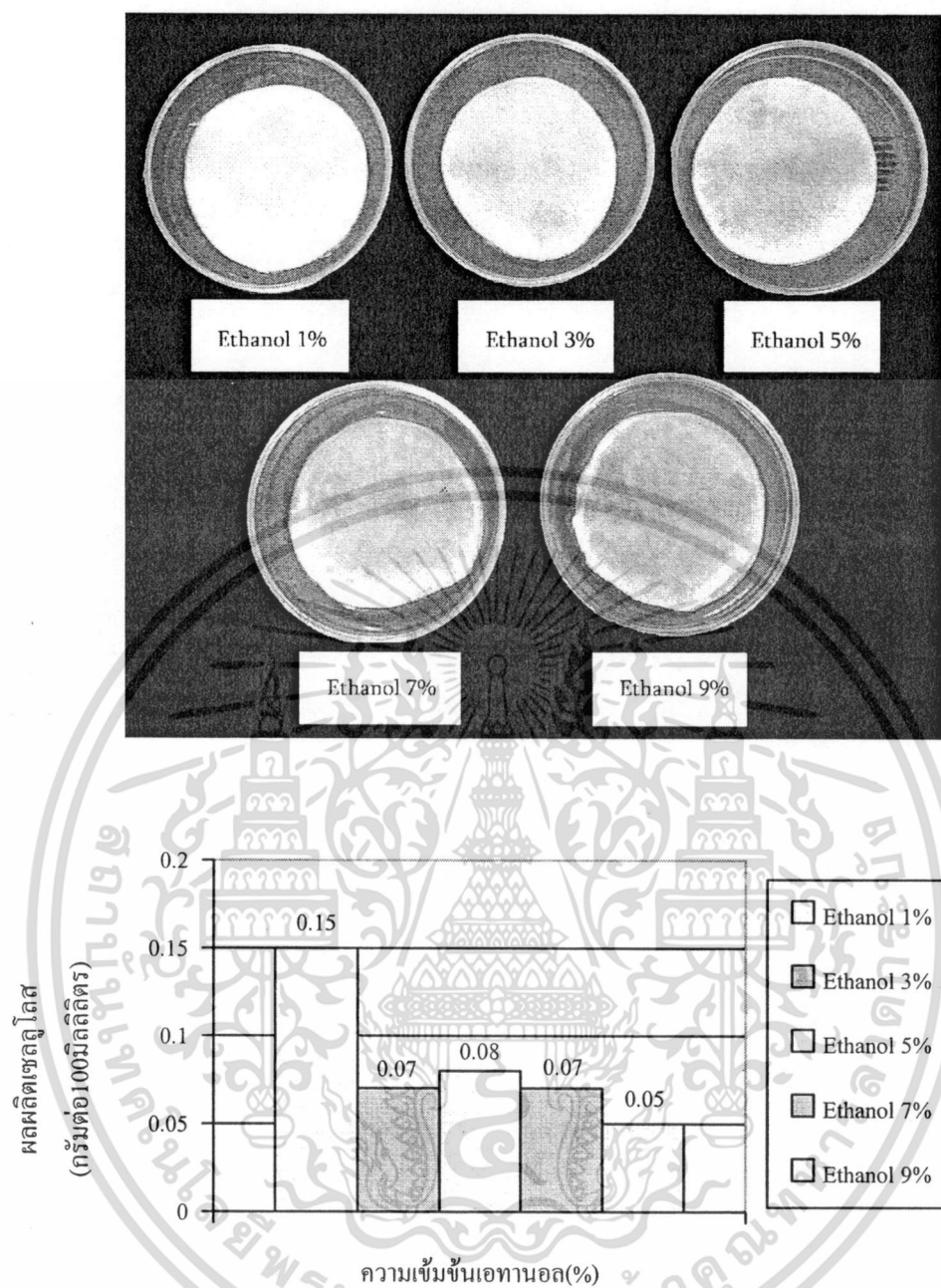
G. nataicola ต่อผลผลิตเซลล์ูโลส ความหนาของแผ่นเซลล์ูโลส และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังจากการหมัก 7 วัน

Ethanol	เชื้อ <i>Gluconacetobacter nataicola</i>		
	ผลผลิตเซลล์ูโลส ⁽¹⁾ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ
- Ethanol 1%	0.15 ^{a(2)}	0.75	3.08
- Ethanol 3%	0.07 ^b	0.44	3.20
- Ethanol 5%	0.08 ^b	0.43	3.17
- Ethanol 7%	0.07 ^{bc}	0.37	3.24
- Ethanol 9%	0.05 ^c	0.38	3.32

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

(2) ค่าที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในศตมภ์เดียวกัน แสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P \leq 0.05$)



รูปที่ 4.8 แสดงผลของการใช้ความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. natica* ต่อผลผลิตเชลลูโลส ภายหลังจากการหมัก 7 วัน

เมื่อนำผลของผลผลิตเชลลูโลสในอาหารที่มีการเติมเอทานอลในความเข้มข้นที่ต่างกันมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเอทานอลร้อยละ 1 ให้ผลผลิตเชลลูโลสสูงสุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการเติมเอทานอลในความเข้มข้นอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4.11

นำแผ่นเซลลูโลสมาผลิตกระดาษตามวิธีของ Ochaikul *et al.* , (2008) จากการทดลองพบว่า เมื่อนำเชื้อ *G. nataicola* มาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น คือ ใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 ใช้น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.5 เติมหีสานอล ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 7 วัน เซลลูโลสที่ได้จากการหมักโดยเชื้อ *G. nataicola* มีความหนา คือ 0.87 เซนติเมตร(แผ่นเปียก) เมื่อนำมาผลิตกระดาษ ทำให้กระดาษที่ได้มีความหนา 0.02 เซนติเมตร (แผ่นแห้ง)

4.5 ผลจากการนำกระดาษเซลลูโลสที่ได้มาประยุกต์ใช้

4.5.1 แผ่นกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่าไม่สามารถกรองอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากเซลลูโลสที่ได้จากการหมักมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ pore size 200-300 นาโนเมตร (<http://www.prd.go.th/Article/kaset.php>) เมื่อนำมาทำกระดาษกรอง อาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่สามารถผ่านกระดาษกรองได้

4.5.2 แผ่นกรองน้ำมันหอมระเหย

พบว่าไม่สามารถกรองน้ำมันหอมระเหยได้เช่นเดียวกัน

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงาน

การคัดเลือกแบคทีเรียเซลลูโลสจากผลไม้เน่าเสีย ได้แก่ ตะขบ มะละกอ มะดัน ชมพู มะม่วง ลองกอง แอปเปิ้ล และแตงโม โดยนำผลไม้เน่าเสียเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหาร HS medium ซึ่งผลไม้ที่นำมาทำการแยกเชื้อพบเฉพาะตะขบ และมะละกอ เท่านั้นที่มีการสร้างเซลลูโลส เลือกเก็บผลไม้ละ 50 ไอโซเลท จากไอโซเลททั้งหมด 100 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่สร้างเซลลูโลสได้สูงๆจากมะละกอและตะขบอย่างละ 20 ไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการหมักเซลลูโลสในสถานะนิ่งและสถานะเขย่า จากการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงจากตะขบ 20 ไอโซเลท (T1-T20) และจากมะละกอ 20 ไอโซเลท (P1-P20) พบว่าจากการแยกเชื้อจากตะขบมี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงในสถานะนิ่งคือ ไอโซเลท T01 T07 และ T11 โดยให้ปริมาณเซลลูโลส 0.3620 ± 0.0154 0.3508 ± 0.0176 และ 0.4416 ± 0.0376 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการหมักในสถานะเขย่าของเชื้อเหล่านี้ให้ปริมาณเซลลูโลสค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกรหมักในสถานะนิ่ง จากการแยกเชื้อในมะละกามี 3 ไอโซเลทที่ให้ปริมาณเซลลูโลสสูงในสถานะนิ่ง คือ ไอโซเลท P06 P09 และ P10 โดยให้ปริมาณเซลลูโลส 0.5485 ± 0.0635 0.4749 ± 0.0139 และ 0.4786 ± 0.0543 กรัมต่อปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงในสถานะนิ่ง ได้แก่ T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 นำไปจัดจำแนกโดยคุณลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม การทดสอบชีวเคมีต่างๆ โดยลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร GEY Agar ของเชื้อส่วนใหญ่ มีลักษณะกลมมน สีครีม ผิวเรียบ แล้วเมื่อนำเชื้อมาทำการย้อมแกรมแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อทั้งหมดติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน

จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของไอโซเลท T01 T07 T11 T12 P06 P08 P09 และ P10 พบว่าไอโซเลทเหล่านี้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ยกเว้นไอโซเลท T07 และ T12 ที่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นออกซิเดทีฟ (oxidative) มากกว่าเฟอร์เมนเตทีฟ (fermentative) ทดสอบเมทิลเรดเป็นบวกคือสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ ทดสอบ VP เป็นลบคือไม่สามารถสร้างสาร acetoin จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถสร้างสารอินโดลจากทริปโตเฟนได้ ไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และสามารถสร้างไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอลได้

ซึ่งจากการทดสอบทางชีวเคมีเหล่านี้ ยังไม่สามารถจะบอกได้ว่าไอโซเลทที่นำมาทดสอบเหล่านี้จัดอยู่ในจีนัสและสปีชีส์ใด ซึ่งจะต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมมากกว่านี้ และจากการนำไอ

โซเลท T11 และ P09 ไปจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค 16s rDNA พบว่าไอโซเลททั้งสองเป็น *Gluconacetobacter nataicola*

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวหมักเป็นเวลา 12 วัน พบว่าเชื้อ *G. nataicola* สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงในช่วง 5-7 วันของการหมัก โดยจะให้ผลผลิตเซลลูโลส 0.23 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ขณะที่ *A. xylinum* TISTR 976 ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงในช่วงวันที่ 7-9 ของการหมัก โดยจะให้ผลผลิตเซลลูโลส 0.27 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

เมื่อนำ *G. nataicola* เลี้ยงในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเซลลูโลสของเชื้อชนิดนี้ในสภาวะนิ่ง พบว่า การใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5.0 ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.5 และเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.0 จะทำให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด จากการเลี้ยง *G. nataicola* ในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ 0.42 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการหมักของเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ 0.65 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการหมักของเชื้อ *G. nataicola* น้อยกว่าการใช้เชื้อ *A. xylinum* หมัก

จากการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวและเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้น หมักในถาดพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีลักษณะบวมน้ำ ผิวเรียบไม่สม่ำเสมอ เมื่อนำมาทำเป็นกระดาษ กระดาษที่ได้ค่อนข้างบาง และจากการนำมารองอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำมันหอมระเหยจากพืช พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำมันหอมระเหยไม่สามารถผ่านกระดาษเซลลูโลสได้

บรรณานุกรม

รำพึง พุ่มจันทร์. 2545. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเซลลูโลส *Acetobacter* sp. จากตัวอย่างผลไม้ในเขตร้อนและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พัฒนพงษ์ วันจันทิก. 2543 การผลิตเซลลูโลสจากน้ำคั้นจากเปลือกสับปะรดโดยเชื้อ *Acetobacter* sp. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chenzhu-Ma and ZhenRong-Gu.2000. Screening,Identification and products testing of high – yield cellulose-producing strains of *Acetobacter xylinum*. Acta-Agriculture-Shanghai,16:3,78-82

De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. 1984 Family VI. Acetobacteraceae. In : Krieg,N.R., Holt,J. G (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I. Williams and Wikins,Baltimore, pp.267-278

Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A and Guillamon, J.M. 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria

Gonzalez, A., Guillamon, J. M., Mas, A and Poblet, M. 2006. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. International Journal of food Microbiology, 108; 141 – 146

Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potachoen, W., Navarrol, R.R., Yamada, Y., Uchimura, T and Komagata, K. 2003. Diversity of Acetic acid Bacteria Isolated from South – East Asian Sources. The 1st International Symposium and Workshop on “Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety” August 13-15, 2003 at Kasetsart University, Bangkok, Thailand

Toyosaki, H., Naritomi, T., Seto, A., Matsuoka, M and Tsuchida, T. 1995. Screening of Bacterial Cellulose – Producing *Acetobacter* strains suitable of agitated culture. Biosci. Biotech. Biochem, 59(8), 1498 - 1502

ธีรวรรณ ชันทอง. 2550. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
http://www.student.chula.ac.th/~49371019/restriction__fragment__length__p.htm
<http://www.fostat.org/article/testfood.pdf>
<http://research.rmu.ac.th/botanical/botany/botany18.htm>
<http://www.sci.tsu.ac.th>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้