สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* TISTR 428 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวโดยฟลาสก์เขย่า

นางสาวกฤติยาภรณ์ บำรุงแขวง รหัส 41053003
นางสาวนุชนารถ เรืองสมบูรณ์ รหัส 41053033
นางสาวเมตตา ถนอมเกิด รหัส 41053058

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43980
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

b.....
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of Cellulose Production By *Acetobacter xylinum* TISTR 428 in Submerged Culture by Shaking Flask

Miss Krittiyaporn	Bumroongkwang	41053003
Miss Nuchanart	Ruangsomboon	41053033
Miss Metta	Thanomkead	41053058

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment

For Degree Bachelor of Science, Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang

Academic year 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobacter xylinum* TISTR 428 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวโดยฟลาสก์เขย่า

โดย นางสาวกฤติยาภรณ์ บำรุงแขวง รหัส 41053003
นางสาวนุชนารถ เรืองสมบูรณ์ รหัส 41053033
นางสาวเมตตา ถนอมเกิด รหัส 41053058

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง) หัวหน้าภาควิชา
คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต) ประธานกรรมการ

(ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์) กรรมการ

(ผศ.วันชัย สุทธินุ่น) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสโดย *Acetobactor xylinum* TISTR 428 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวโดยฟลาสก์เขย่า		
โดย	นางสาวกฤติยาภรณ์	บำรุงแขวง	รหัส 41053003
	นางสาวนุชนารถ	เรืองสมบูรณ์	รหัส 41053033
	นางสาวเมตตา	ถนอมเกิด	รหัส 41053058
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์		
ปีการศึกษา	2544		

บทคัดย่อ

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 428 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวโดยฟลาสก์เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารชนิดต่าง ๆ พบว่าอาหารสูตร Corn Steep Liquor (CSL) เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสมากที่สุด และจากการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารสูตร CSL ที่มีฟรุกโตสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงสุดประมาณ 8.595 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ฟรุกโตส 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจสอบผลของกรดอะมิโนโดยศึกษาผลของน้ำหนักแห้ง แสดงให้เห็นว่าการเติมเมทไธโอนีน 0.001 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร CSL จะทำให้ปริมาณผลผลิตของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 12 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลของการเติมแลคเตท พบว่าการเติมแลคเตทที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ช่วยให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Optimization of Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* TISTR 428 in Submerged Culture by Shaking Flask		
Names of Students	Miss Krittiyaporn	Bumroongkwang	41053003
	Miss Nuchanart	Ruangsomboon	41053033
	Miss Metta	Thanomkead	41053058
Special Project Advisor	Assist. Prof. Aree Rittiboon		
Department	Applied Biology		
Academic Year	2001		

Abstract

Acetobacter xylinum TISTR 428 was cultivated in submerged culture by shaking flask at 28 $^{\circ}$C , 180 rpm , for 72 hour. Of the several media tested, corn steep liquour (CSL) was the most suitable medium for cellulose production , then the cells were cultured in CSL and fructose and glucose were used as carbon source , The result was that approximatly 8.595 g/l cellulose which was the highest yield was obtained when 3 % fructose was used as the carbon source. For effect of amino acid , it was found that CSL medium supplemented with L-methionine showed 12% higher cellulose than CSL without L-methionine. It was also found that the addition of lactate could increase 50 % of cellulose.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย การทำวิจัย การเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์และการให้คำปรึกษาทุก ๆ ปัญหาทุก ๆ อย่างตลอดการวิจัย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และผู้ช่วยศาสตราจารย์ วันชัย สุทธินุ่น คณะกรรมการโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยทำการตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่ได้ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือ รวมทั้งเป็นกำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

กฤติยาภรณ์ บำรุงแขวง
นุชนารถ เรืองสมบูรณ์
เมตตา ถนอมเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
หน้าอนุมัติ	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ข
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
- แบคทีเรียลเซลลูโลสและแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส	3
- กระบวนการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย *A. xylinum*	6
- การสังเคราะห์และสะสมแบคทีเรียลเซลลูโลสโดย *A. xylinum*	10
- ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรีย	15
- การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในถังหมัก	20
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และขั้นตอนการดำเนินงาน	24
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก ก	43
ภาคผนวก ข	45
ภาคผนวก ค	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างแบคทีเรียลเซลลูโลส 3
รูปที่ 2 ขนาดของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลสเปรียบเทียบกับเส้นใยจากแหล่งอื่น 4
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของเซลลูโลสบนผิวหน้าอาหารในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบบน อาหารเหลวโดยเชื้อ *A. xylinum* 9
รูปที่ 4 วิถีการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* 11
รูปที่ 5 โครงสร้างของ bis-(3'-5') cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) 11
รูปที่ 6 โครงสร้างการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* 12
รูปที่ 7 โครงสร้างยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูโลสซินเตส 12
รูปที่ 8 การสังเคราะห์อะซิแตนโดยเชื้อ *A. xylinum* 14
รูปที่ 9 แสดงลักษณะเชื้อ *A. xylinum* TISTR 428 ที่ขึ้นบนอาหาร YE glucose 27
รูปที่ 10 แสดงลักษณะของเซลลูโลสที่ผลิตในอาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน 28
รูปที่ 11 แสดงลักษณะของเซลลูโลสที่ผลิตในอาหาร BSH 29
รูปที่ 12 แสดงลักษณะของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะฟลาสก์เขย่า 30
รูปที่ 13 แสดงลักษณะภายในของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะ ฟลาสก์เขย่า 30
รูปที่ 14 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสในสูตรอาหารที่แตกต่างกันเมื่อทำการ เลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 33
รูปที่ 15 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่มีแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้น แตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 33
รูปที่ 16 แสดงผลของเมทไธโอนีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่มีผลต่อ การผลิตเซลลูโลสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 34
รูปที่ 17 แสดงผลของแลคเตทที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่มีผลต่อการผลิต เซลลูโลสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ผลิตสารโพลีแซคคาไรด์	7
ตารางที่ 2 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum*	16
ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสในการคัดเลือกสูตรอาหาร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	45
ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสในการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	47
ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสในการทดสอบผลของเมทไธโอนีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	49
ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสในการทดสอบผลของแลคเตทที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	51
ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการคัดเลือกสูตรอาหาร	53
ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	54
ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการใช้เมทไธโอนีนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	55
ตารางภาคผนวกที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการใช้แลคเตทที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

เซลลูโลสเป็นไบโอโพลีเมอร์ (biopolymer) ที่ถูกพบครั้งแรกโดย Anselme Payan (1975) นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส ซึ่งพบว่าเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักในฝ้ายมากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในไม้จะพบเซลลูโลสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากกระบวนการสกัดเซลลูโลสทั้งจากฝ้ายและจากไม้จะต้องใช้กรรมวิธีทางเคมีในการกำจัดสารลิกนินและการฟอกสีเซลลูโลส ซึ่งต้องใช้สารเคมีและพลังงานจำนวนมาก อันจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมประกอบกับในปัจจุบันจำนวนป่าไม้ได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วทำให้เกิดปัญหาในด้านการขาดแคลนวัตถุดิบในการผลิตเซลลูโลส ในกรณีของเซลลูโลสที่สกัดได้จากพืชนั้นได้นำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม แต่ก็พบปัญหาหลายประการ เช่นราคาวัตถุดิบที่ไม่แน่นอนขึ้นกับสภาวะของตลาด รวมถึงบางครั้งคุณภาพของวัตถุดิบก็ไม่เป็นไปตามความต้องการ จึงมีความพยายามที่จะหาเซลลูโลสจากแหล่งอื่นๆเพื่อใช้ทดแทนเซลลูโลสที่ได้จากไม้ เซลลูโลสสามารถผลิตได้จากแหล่งต่างๆ อาทิเช่น พืช สัตว์ และจากเชื้อแบคทีเรีย การผลิตเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรียเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาเรื่องแหล่งวัตถุดิบได้ดีเนื่องจากสามารถใช้ความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยในกระบวนการผลิตได้อย่างกว้างขวาง เช่นการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียให้มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสได้เพิ่มขึ้น หรือการนำวัตถุดิบที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตได้และมีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์

ปัจจุบันมีการนำเซลลูโลสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพิ่มขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารจากเซลลูโลสจะมีส่วนของเส้นใยและกากอาหารสูง ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าช่วยในการขับถ่ายของร่างกาย ในทางการแพทย์ได้นำเซลลูโลสมาใช้ทำแผ่นตกแต่งสมานแผลหนังเทียมหรือใช้ในทางเภสัชกรรม เป็นต้น ในอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ใช้ทำแผ่นไดอะแฟรมของลำโพง (Yohino และคณะ,1996) ทางวิทยาศาสตร์จะใช้เป็นเมมเบรนหุ้มไบโอเซนเซอร์ (cover-biosensor membrane) และอัลตราฟิลเตชั่น (ultrafiltration membrane) นอกจากนั้นยังสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษที่มีคุณภาพสูง เช่น กระดาษคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสได้ดีและได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางคือเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในปริมาณสูง ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์และเพื่อส่งเสริมการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 428 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวด้วยฟลาสก์เขย่า

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์เขย่า จากนั้นทำการทดสอบหาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลส เริ่มจากการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ผลของวิตามิน เมทไธโอนีนและแลคเตท

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ทำให้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการผลิตเซลลูโลสภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยฟลาสก์เขย่าจากเชื้อแบคทีเรียที่รักษาอยู่ในหน่วยงานในประเทศไทย

2. สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและการผลิตในเชิงพาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

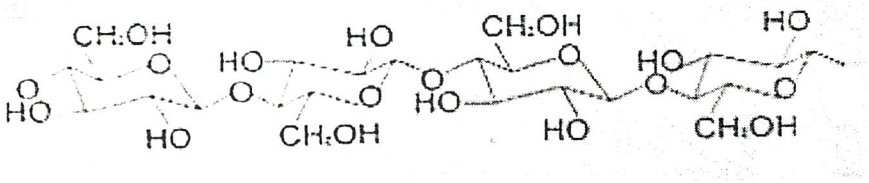
บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

การผลิตและการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส

1. แบคทีเรียลเซลลูโลสและแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส

1.1 แบคทีเรียลเซลลูโลส (bacterial cellulose)

แบคทีเรียลเซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโฮโมโพลีแซคคาไรด์เชิงเส้น ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคส (β-D-glucopyranose) สูตรโครงสร้าง ดังรูปที่ 1 มีค่า Degree of freedom (DP) อยู่ในช่วงประมาณ 2,000-12,700 เชื่อมต่อกันด้วยสายยาวของพันธะ β-1,4 glycosidic จากการศึกษาโดยใช้การหักเหรังสีเอกซ์ (X – ray diffraction) โมเลกุลของเซลลูโลสอยู่ในลักษณะเป็นเส้นยาวเรียงขนานกัน แต่ละเส้นจะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน รวมกันอยู่เป็นมัดมีลักษณะเป็นเส้นใยเล็กๆ เรียกว่าไฟบริล (fibril) (Haigler, 1985) แบคทีเรียลเซลลูโลสไม่ละลายในสารละลายด่างและกรดที่อุณหภูมิห้องแต่ละลายในสารละลายกรดที่มีความเข้มข้นสูงที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปจะพบเซลลูโลสลักษณะเป็นกลุ่มเรียงตัวขนานและเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุลหนึ่งกับออกซิเจนอะตอม ที่อยู่ในวงแหวนของโมเลกุลอื่นอย่างมีระเบียบในลักษณะที่เรียกว่าผลึกไมเซล (crystalline micelle) แต่ละไมเซลประกอบด้วยโมเลกุลของเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุลและมีรูปร่างลักษณะเป็นริบบินหนาในรูปไมโครไฟบริล (microfribril) มีลักษณะเป็นพาราเจล (paragel) หมุนไปทางซ้าย ซึ่งจะเกิดการเรียงตัวของไมเซลประมาณ 10-20 ไมเซล หรือม้วนทบกันเป็นเกลียวรอบแกนของเส้นใย โดยมีพันธะไฮโดรเจน 2 ตำแหน่งในแต่ละเส้นสายของเซลลูโลส คือพันธะระหว่างออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาลกลูโคสกับไฮดรอกซีตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลโมเลกุลใกล้ ๆกันและระหว่างไฮดรอกซีตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนในวงแหวนอื่น

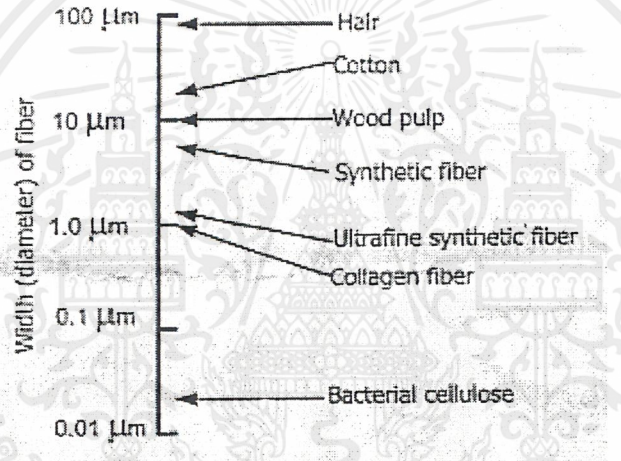


<u>รูปที่ 1</u> สูตรโครงสร้างของแบคทีเรียลเซลลูโลส

ที่มา : Kennedy (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างของเซลลูโลสมี 2 รูป คือ รูปแบบอัลฟา (cellulose $I\alpha$) และในรูปแบบเบต้า (cellulose $I\beta$) แบคทีเรียลเซลลูโลสมีรูปแบบอัลฟาเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างพืชชั้นสูงที่โครงสร้างแบบเบต้าเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งโครงสร้างจะแข็งแกร่งกว่าแบบอัลฟา โครงสร้างทั้ง 2 แบบนี้จะพันกันเป็นเกลียว (ribbon) รวมตัวกันเป็นสายไมโครไฟบริลที่มีขนาดแตกต่างกัน (Cousins และ Brown, 1995) ขนาดของเส้นใยไมโครไฟบริลของแบคทีเรียลเซลลูโลส มีขนาดเล็ก ความกว้าง 100 นาโนเมตรและหนา 3 - 8 นาโนเมตร มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืชชั้นสูงและเส้นใยสังเคราะห์ (synthetic fiber) ประมาณ 10 -1,000 และ100 เท่า ตามลำดับ ดังรูปที่ 2 (Yoshinaga และคณะ , 1997)



<u>รูปที่ 2</u> ขนาดของเส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลสเปรียบเทียบกับเส้นใยจากแหล่งอื่น ๆ
ที่มา : Yoshinaga และคณะ, 1997

Yoshinaga และคณะ (1997) รายงานว่าแบคทีเรียที่สังเคราะห์เซลลูโลสได้ค่า DP สูงกว่าพืชชั้นสูงสังเคราะห์เซลลูโลส เส้นใยจึงมีขนาดเล็กและละเอียดทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรง นอกจากนี้ยังมีความบริสุทธิ์มากกว่าเซลลูโลสที่ได้จากพืชชั้นสูง เนื่องจากในพืชชั้นสูงจะมีการสังเคราะห์สารลิกนินหรือเฮมิเซลลูโลส (วราวุฒิ และคณะ, 2533) เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อพืชด้วย เส้นใยของแบคทีเรียลเซลลูโลสมีค่ายังมอดูลัส (Young 's modulus) สูงกว่าเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ (วราวุฒิ และคณะ, 2535)

สภาวะการหมักแบคทีเรียจะมีผลต่อโครงสร้างของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้น การหมักบนเครื่องเขย่าและมีการกวน แบคทีเรียลเซลลูโลสจากกระบวนการหมักมีลักษณะเป็นเม็ด (cellulous granule) หรือเส้นใยขนาดสั้น ๆ (fibrous) (Ross และคณะ, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการหมักแบบอยู่กับที่ (static culture) นั้นแบคทีเรียลเซลลูโลสที่จะได้เป็นแผ่น (pelicle) นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักในระบบมีการกวนในถังหมักโครงสร้างของแบคทีเรียลเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ โดยพบโครงสร้างแบบอัลฟาน้อยกว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากการหมักแบบอยู่กับที่ (Kojima และคณะ, 1997) ปัจจัยอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อโครงสร้างของแบคทีเรียลเซลลูโลส อาทิ เช่น การให้อากาศ ชนิดของสารอาหาร ตลอดจนสายพันธุ์แบคทีเรีย (Toyosaki และคณะ , 1995a)

โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบทางเคมีของแบคทีเรียลเซลลูโลสประกอบด้วย ไขมัน น้ำ สารเยื่อใย โปรตีน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 0.06 94.6 1.15 0.84 0.10 และ 3.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Guzman และคณะ, 1982) นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุต่าง ๆ ประกอบด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และไนอาซีน ปริมาณ 0.520, 0.570 และ 0.022 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (สมคิด, 2530) ความสามารถในการละลายแบคทีเรียลเซลลูโลสจะละลายในกรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยกรดจะไปย่อยพันธะไฮโดรเจนของแบคทีเรียลเซลลูโลส แต่จะไม่ละลายในน้ำเดือด ในสารละลายด่าง แอลกอฮอล์ และอะซิโตน

1.2 แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส

Kang และ Cortel (1979) พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยแบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ โฮโมโพลีโพลีแซคคาไรด์และเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ สายพันธุ์แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่สามารถผลิตสารโพลีแซคคาไรด์อาทิเช่น *Cornebacterium* sp., *Arthrobaacter viscosus* NRRL B-1797, *Alcaligenes faecalis var. myxogenes* 10C3, *Pseudomonas solanacearum, Erwinia stewartii coli, Erwinia amylovora, Acinetobacter vinelandii strain* D-0.5, *Acinetobacter* sp. *Strain* 12, *Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, Xanthomons campestris* และสายพันธุ์ *Acetobacter* sp.

เชื้อแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรมได้แก่เชื้อ *Acetobacter* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ หรือ Gram variabia จัดอยู่ในแฟมิลี *Acetobacteraceae* สายพันธุ์ที่สำคัญและใช้ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสกันอย่างกว้างขวางคือ *A. xylinum, A. pasteurianus, A. hansenii, A. sucrofermantans* และ *A. acetigenum* สำหรับ *Acetobacter aceti subsp. xylinum* เซลล์มีลักษณะรูปร่างรีจนถึงเป็นท่อน อาจเป็นท่อนตรงหรือโค้ง เซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย ขนาดเซลล์กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-4.0 ไมครอน และอาจพบในลักษณะกลม ยืดยาว (elogation) บวม (swollen) รูปกระบอง (clop shape) หรือเป็นเส้นสาย (filamentous) เคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลารอบเซลล์หรือแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์หรือไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) โคโลนีของเชื้อ *Acetobacter* sp. มีสีชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากมีการสังเคราะห์สารพอร์ไฟรินส์ (porpyrin) ต้องการอากาศ (aerobic) มีเมตาโบลิซึมจากการหายใจด้วยออกซิเจน โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) ในกระบวนการเปลี่ยนสารอาหารให้เป็นพลังงาน (Gossele และ Swings, 1985) เป็นพวกเคโมออร์กาโนโทรฟิค (chemoorganotrophic) สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase positive) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือที่พีเอชประมาณ 5.4-6.3 และอุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส (Kring และ Holt. 1984) ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) สามารถออกซิไดซ์เอธานอลเป็นกรดอะซิติก และออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ประเภทอะซิเตท (acetate) และแลคแตท (lactate) เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นสารประเภทเอธานอล กลีเซอรอล แลคเตท กลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส แลคโตส และอะราบิโนส (Holt และคณะ, 1994) สามารถสร้างกรดจากเอธานอล และยังสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอธานอลและโพรพานอล อุณหภูมิที่สามารถยับยั้งเชื้อ (inactivated temperature) ได้คือ 65-70 องศาเซลเซียส

Whitfield (1988) และ Atkinson และ Mavituna (1991) ได้รวบรวมชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 1

2. กระบวนการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum*

ลักษณะการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* เป็นแบบ Growth associated (Ishikawa และคณะ, 1995) มีลักษณะสำคัญคือการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเกิดพร้อมกัน โดยในระหว่างช่วงการเจริญเติบโต (trophophase) แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสออกมาน้อย ในช่วงผลิตภัณฑ์คือแบคทีเรียลเซลลูโลส (idiophase) จะมีการเจริญของเซลล์เพียงเล็กน้อยแต่มีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงสุด สำหรับกระบวนการผลิตต่าง ๆ ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสแบ่งออกได้ดังนี้

2.1 กระบวนการหมักบนอาหารเหลว

การหมักวิธีนี้โดยทั่วไปใช้น้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นวัตถุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและภาชนะที่ใช้หมักเป็นถาดอลูมิเนียมหรือพลาสติกผิวเรียบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ และค่าพีเอชเริ่มต้นปรับด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นให้อยู่ในช่วงค่าพีเอช 4.0-5.0 ธาตุอื่น ๆ ที่เติม อาทิเช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (วราวุฒิและคณะ, 2535) หรือไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) (Lapus และคณะ, 1967) สำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจน (N- source) การฆ่าเชื้อใช้วิธีการต้มให้เดือด เมื่ออาหารเย็นลงเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในถาดอลูมิเนียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ผลิตสารโพลีแซคคาไรด์

ชนิดจุลินทรีย์	สายพันธุ์	สารโพลีแซคคาไรด์
Yeast	*Rhodotorula* sp.	Poly-β-hydroxyalkanoic acid
	Pachysolen tannophilus	Dextran
	Lipomyces sp.	Levan
	Hansenula capsulata	Phosphomannan
	Hansenula holstii	Phosphomannan
	Cryptococcus sp.	Levan
	Torulopsis molischiana	Trehalose
	Torulopsis pinus	Trehalose
	Aurebasidium pullulans	Pullulan
Other fungi	*Penicillium* sp.	Dextran
	Tremella mesentaria	Trehalose
Gram-positive bacteria	*Bacillus* sp.	Levan
	Leuconostoc sp.	Levan, Dextran
	Streptococcus mutans	Dextran
	Streptococcus sp.	Dextran
Gram-negative bacteria	*Azotobacter* sp.	Alginate
	Rhizobium sp.	Phosphomannan
	Escherichia coli	Dextran
	Klebsiella aerogenes	Pullulan
	Acetobacter xylinum	Cellulose
	Arthrobacter viscosus	Dextran
	Pseudomonas aeruginosa	Levan, Alginate
	Xanthomonas sp.	Xanthan gum
	Achromobacter sp.	Levan
	Alcaligenes faecalis	Poly-β-hydroxybutyric acid
	Agrobacterium sp.	Curdlan
	Sphaerotilus natans	Poly-β-hydroxybutyric acid

ที่มา : Whitefield (1988) และ Atikinson และ Mavituna (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือพลาสติกผิวเรียบ ให้มีระดับความลึก 10-15 เซนติเมตร คลุมภาชนะด้วยผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้ว ห้องบ่มรมควันฆ่าเชื้อด้วยไซยาไนด์ก่อนการหมัก 2-3 วัน ห้องมีการระบายอากาศ จากนั้นใส่กล้าเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ประมาณ 10-40 เปอร์เซ็นต์ (วราวุฒิ และคณะ, 2536) หลังจากการหมักเป็นเวลา 7-14 วัน แบคทีเรียจะผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะสีขาวครีม มีเนื้อสัมผัสที่เหนียวและแน่นและที่สำคัญ คือมีปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสสูง มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น วุ้นสวรรค์ วุ้นมะพร้าว และเห็ดรัสเซีย

การหมักวิธีนี้อัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในช่วง 10 วันแรกของการหมักจะมีอัตราการผลิตสูง ดังนั้นในการควบคุมการหมักจำเป็นต้องคำนึงถึงแหล่งอาหารให้มีทั้งชนิดและปริมาณที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ที่ได้ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว หลังจาก 10 วันแรกของการหมัก พบว่าอัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสลดต่ำลง เนื่องจากธาตุอาหารเหลือน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนามากขึ้น ทำให้อากาศซึมผ่านลงไปได้ยากขึ้น จึงมีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ในระหว่างการหมักควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28-35 องศาเซลเซียสและปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 3.5-4.0 โดยการเติมกรดอะซิติก

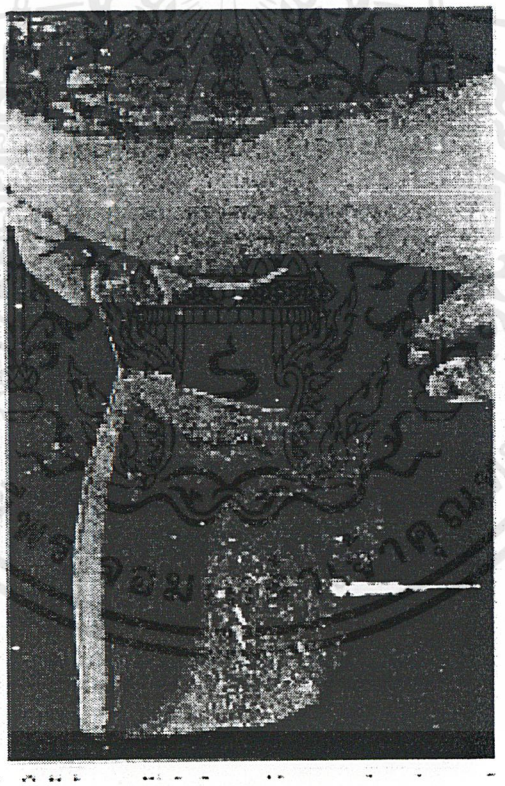
นอกจากน้ำมะพร้าวและน้ำสับปะรด สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้จากหางนมหรือเวย์ (whey) (วราวุฒิ และคณะ, 2536) ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้ส่วนใหญ่จากการผลิตเนยแข็งหรือการแยกเคซีน (casein) ซึ่งหางนมมีส่วนประกอบโดยประมาณดังนี้ น้ำตาลแลคโตส 4.8 โปรตีน 0.85 ไขมัน 0.35 แร่ธาตุ 0.60 และน้ำ 93.40 เปอร์เซ็นต์ (Delhi, 1980) หางนมสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* แบบอยู่กับที่ในถาด อัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสมีความสัมพันธ์กับอัตราการใช้สารอาหาร การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจะมีอัตราลดลงเมื่อสารอาหารมีความเข้มข้นสูง เนื่องจากมีการผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลกลูโคสบางส่วน และเกิด cataboiite repression มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำหมักมีผลทำให้ปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง (Tahara และคณะ, 1997a)

2.2 กระบวนการหมักในอาหารเหลว (submerged culture)

Toyosaki และคณะ (1995a) ได้รายงานผลการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยใช้เชื้อ *A. xylinum* BPR 2001 ในถังหมัก และใช้อาหารเหลว CSL-fructose medium พบว่าการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสมีประสิทธิภาพสูง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยน้ำแช่ข้าวโพด (CSL) และน้ำตาลฟรุกโตส อาหารเลี้ยงเชื้อฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นลงจะใส่กล้าเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ประมาณ 5-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ ให้เชื้อเจริญในสภาพที่มีอัตราการกวนและให้อากาศ ควบคุมค่าพีเอชในระหว่างหมักให้คงที่ประมาณ 5.0 ด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) และก๊าซแอมโมเนีย ควบคุมอุณหภูมิของหมักที่ 28-32 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อนาที ระยะเวลาในการหมัก 3-5 วัน ซึ่งแบคทีเรียเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการหมักจะมีลักษณะเป็นเม็ด การหมักในอาหารเหลวมีหลายรูปแบบ อาทิ เช่น การหมักแบบกะ (batch culture) (Toyosaki และคณะ, 1995a) ทั้งการหมักในถังหมักเดี่ยวและหลายถังหมัก (single และ multi-stage) แบบกึ่งกะ (fed batch culture) (Hwang และคณะ, 1999 ; Yang และคณะ, 1998) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) โดยทั่วไปการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสก็ยังใช้กรรมวิธีการหมักแบบกะ เนื่องจากประสิทธิภาพสูง



<u>รูปที่ 3</u> แสดงลักษณะของเซลลูโลสบนผิวหน้าอาหารในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบบนอาหารเหลว โดยเชื้อ *A. xylinum*

ที่มา : Tahara และคณะ (1997a)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักแบบกะในอาหารเหลวมีข้อดีคือ ใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้ทุกชนิด ผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงกว่าการหมักแบบบนอาหารเหลว 40 เปอร์เซ็นต์ ปรับปรุงวิธีและควบคุมกระบวนการหมักได้ง่าย ใช้พื้นที่และแรงงานคนน้อยและสามารถควบคุมสภาพปลอดเชื้อได้ง่าย

3. การสังเคราะห์และสะสมแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum*

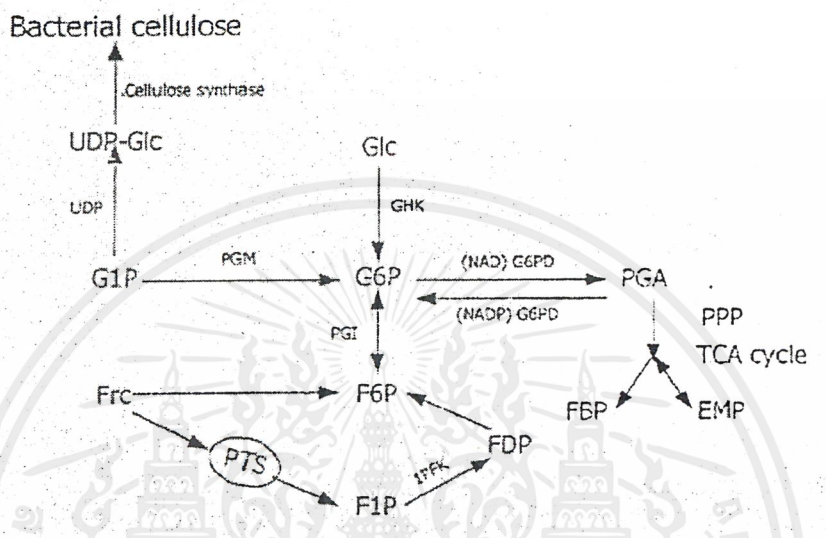
แบคทีเรียลเซลลูโลสจัดเป็น primary metabolic product กลไกการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* มีความคล้ายคลึงกับเซลลูโลสของพืชชั้นสูง ในระหว่างการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส แบคทีเรียต้องการอากาศและแหล่งคาร์บอนเพื่อประสานโครงสร้างของแบคทีเรียลเซลลูโลสในปฏิกริยาโพลีเมอไรเซชั่น (polymerization) มี UDP-glucose (Uridine diphosphoglucose) เป็นสารตั้งต้น (precursor substance) (Benziman และ Mazover,1973) ดังสมการ

Uridine diphosphoglucose + (glucose)$_n$ ⟶ Uridine diphosphoglucose + (glucose)$_{n+1}$

วิถีการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อแบคทีเรีย ดังสรุปในรูปที่ 4 (Yoshinaga และคณะ, 1997) การสังเคราะห์เริ่มจากน้ำตาลกลูโคสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ในรูป Glucose-6-phosephate โดยเอนไซม์กลูโคไคเนสในกระบวนการฟอสโฟริเลชั่น แล้ว Glucose-6-phosphate ถูกไอโซเมอร์ไรซ์เป็น Glucose-1-phosphate โดยเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส Glucose-1- phosephate ถูกเปลี่ยนเป็น Uridine 5'-diphosephate glucose (UDPG) โดยเอนไซม์ UDPG pyrophosphorylase ในขั้นสุดท้าย UDP-glucose ถูกสังเคราะห์เป็นแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูโลส ซินเตส (cellulose synthase) มี cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) เป็นตัวกระตุ้น (activator) ดังรูปที่ 5 เอนไซม์เซลลูโลสซินเตส หรือ 1,4-β-D-glucan 4-β-D-glucosyltrantsferase ; EC 2.4.1.12 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส โดยกระบวนการโพลีเมอไรเซชั่น สำหรับเอนไซม์เซลลูโลสซินเตสที่สังเคราะห์ขึ้นโดยเชื้อ *A. xylinum* มีลักษณะเป็น Membrane-bound มีความจำเพาะต่อ UDP-glucose ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ β-glucan chain และ UDP (Uridine diphosphate) โดยมี c-di-GMP เป็นตัวกระตุ้นในการทำงานของเอนไซม์ซึ่งสังเคราะห์จาก GTP (guanosine triphosphate) โดยมีเอนไซม์ diguanylate cyclase เป็นตัวเร่งหรือสังเคราะห์โดยการย่อยสลาย GTP (gaunosine triphosphate) โดยมีเอนไซม์ phosphodiesterase A และ B เป็นตัวเร่ง (Ross และคณะ, 1991) ดังรูปที่ 6 โอเปอรอนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูโลสซินเตส ประกอบด้วยยีน *bcs* (bacterial cellulose synthase) 4 ชนิดคือ *bcsA bcsB bcsC* และ *bcsD* (Mayer และคณะ,1991; Toyosaki และคณะ, 1995b) มีมวลโมเลกุล 84 85 141

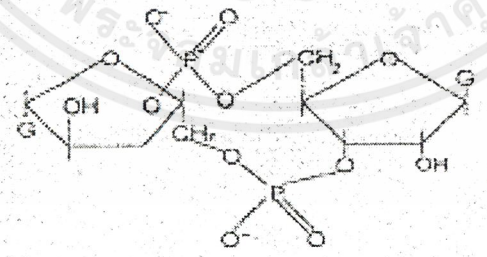
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bcsC และ *bcsD* (Mayer และคณะ,1991; Toyosaki และคณะ, 1995b) มีมวลโมเลกุล 84, 85, 141 และ 17 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเรียงตัวกัน ดังแสดงในรูปที่ 7



<u>รูปที่ 4</u> วิถีการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum*

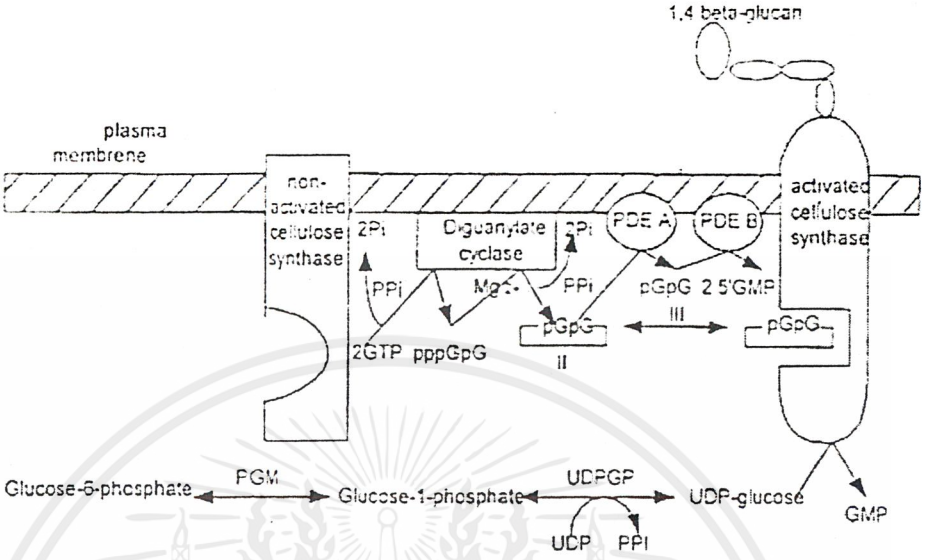
ที่มา : Yoshinaga และคณะ (1997)



<u>รูปที่ 5</u> โครงสร้างของ bis- (3' – 5') cyclic diguanylic acid (c-di-GMP)

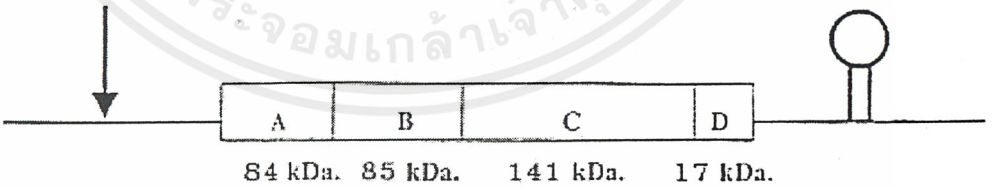
ที่มา : Ross และคณะ (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>รูปที่ 6</u> โมเดลของการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum*

ที่มา : Ross และคณะ (1991)



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

<u>รูปที่ 7</u> โครงสร้างของยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูโลส ซินเตส

ที่มา : Yoshinaga และคณะ (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *A. xylinum* นอกจากผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสแล้วยังสามารถผลิตอะซิแตนควบคู่ไปด้วย อะซิแตนมีลักษณะเป็น water soluble-polysaccharide จัดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) โครงสร้างหลักของอะซิแตนประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก การสังเคราะห์อะซิแตนดังสรุปใน (Iannino และคณะ, 1988) รูปที่ 8 เริ่มจากอะซิแตนถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกนอกเซลล์โดยเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบทางเคมีของอะซิแตน ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ D-glucose L-mannose และ O-acetyl ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 ตามลำดับ (Shramm และคณะ, 1957) ในการสังเคราะห์อะซิแตนจะใช้ UDP-glucose เป็นสารตั้งต้นเช่นเดียวกับแบคทีเรียลเซลลูโลส การสังเคราะห์อะซิแตนเพิ่มขึ้นทำให้การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง (Hwang และคณะ, 1999) ในกระบวนการหมักเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้นปริมาณการสังเคราะห์อะซิแตนจะสูงด้วย การลดปริมาณอะซิแตนโดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถลดปริมาณการสังเคราะห์อะซิแตนได้ มีผลให้การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น

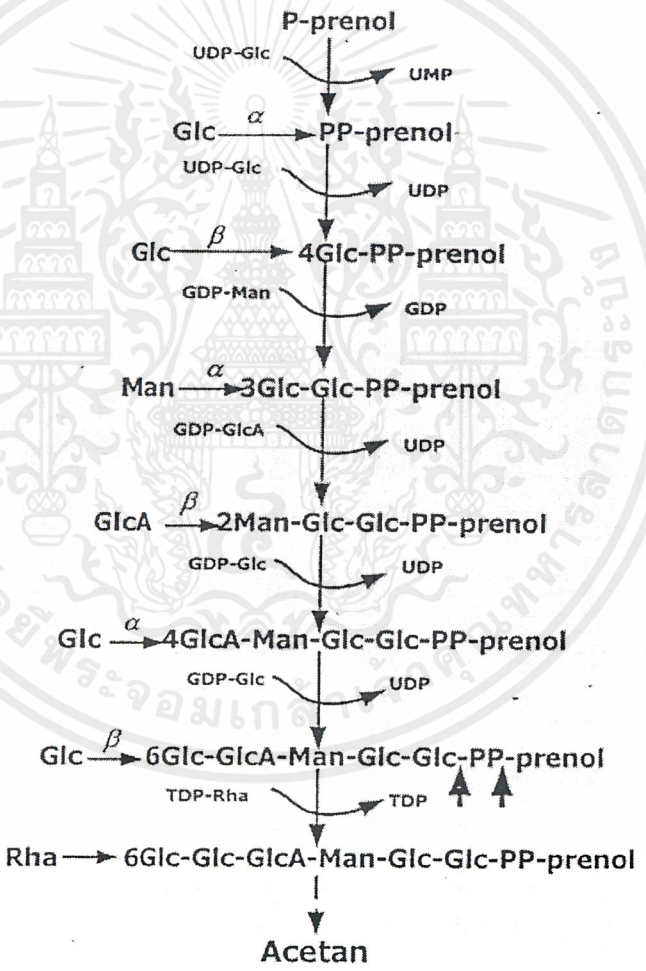
Tahara และคณะ (1997b) ได้รายงานการสังเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *A. xylinum* ในกระบวนการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส และพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีผลต่อค่า DP และปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลส กิจกรรมเอนไซม์ที่พบมี 2 ชนิดคือ Carboxy Methyl Cellulase (CMCase) และ Cellotriase (G3Case) กิจกรรมของเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ทำให้ค่า DP และปริมาณเซลลูโลสลดลง สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase คือพีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Oikawa และคณะ,1997) Marx Figini และ Pion (1982) รายงานไว้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสไม่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสและค่า DP ซึ่งการสังเคราะห์เอนไซม์จะสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่การหมักแบบอยู่กับที่ในถาดผิวเรียบ Oikawa และคณะ (1997) พบว่าปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น มีผลทำให้ค่า DP และปริมาณของแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลงเช่นกัน

แบคทีเรียลเซลลูโลสที่สังเคราะห์จะเกิดการสะสมภายนอกเซลล์อย่างรวดเร็ว สารโพลีกลูแคนสายสั้นๆ (polyglucan) ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียจะถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ผ่านทาง Pore like site ที่เรียงขนานกันตามความยาวของเปลือกเซลล์ (envelope) ของเชื้อ *A. xylinum* (Cousins และคณะ,1995) เปลือกเซลล์ประกอบด้วยสารประกอบไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งทำหน้าที่ขับสารตั้งต้นของเซลลูโลส (precellulosic polymer) ซึ่งเป็นโพลีกลูแคนออกจากเซลล์ โพลีเมอไรเซชั่นเป็นแบคทีเรียเซลลูโลสเกิดด้วยพันธะ β-1,4 glococidic (Yamada, 1983) จะเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยมีเอนไซม์เซลลูโลสซินเตส ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์เป็นตัวเร่ง อัตราความหนาของเส้นใยที่เกิดขึ้นประมาณ 2 นาโนเมตรต่อนาที เส้นใยแบคทีเรียลเซลลูโลสเหล่านี้จะทำหน้าที่ล้อมรอบและหุ้มเซลล์ไว้ภายใน เพื่อป้องกันแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยตรง

ความสามารถในการผลิตสารโพลีแซคคาไรด์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ปริมาณสารโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์จะเพิ่มถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ สำหรับสารโพลีแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ออกมาภายนอกเซลล์จะเพิ่มขึ้นหลายเท่าของน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Wilkinson, 1958)



<u>รูปที่ 8</u> การสังเคราะห์อะซิแตนโดยเชื้อ *A. xylinum*

ที่มา : Iannino และคณะ (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดจนการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* มีดังต่อไปนี้

4.1 แหล่งคาร์บอน (C-source)

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ (Stabury และ Whitaker, 1948) ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยเชื้อแบคทีเรียนี้ต้องการแหล่งคาร์บอนที่จำเพาะเจาะจงและแน่นอนสำหรับใช้ในการสร้างแบคทีเรียลเซลลูโลส ในกรณีนี้ซึ่งพบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสซึ่งเป็นสารประเภทโฮโมโพลีแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์โดยเอนไซม์ชนิดเดียว แต่เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการแหล่งคาร์บอนที่ไม่จำเพาะเจาะจง จะสามารถสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสได้จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด (Crueger และ Crueger, 1982)

Hestrin และคณะ (1947) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* อาทิเช่น น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส อาทิเช่น แอมโมเนียมฟอสเฟตและแอมโมเนียมซัลเฟต

Alaban (1962) ได้ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobater* sp. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซูโครส กาแลคโตส แมนนิทอล มอลโทส แลคโตส และอะราบิโนส พบว่าการหมักเซลลูโลสในซับสเตรทที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและกลีเซอรอล เป็นองค์ประกอบ สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2

Lapus และคณะ (1967) พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสจะอยู่ในช่วง 5-7 เปอร์เซ็นต์ Francis และคณะ (1954) ได้นำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้หลายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 4.0-6.0 ที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ประกอบด้วยเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม อาทิเช่น น้ำตาลซูโครส กลูโคส และแลคโตส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum*

จำพวกของสารอาหารคาร์บอน	ชนิด	ผลผลิตของเซลลูโลส (%)
Monosaccharide	D-fructose	92
	D-galactose	15
	D-glucose	100
	D-mannose	3
	D-xylose	11
	L-arabinose	14
	L-sorbose	11
Disaccharide	Lactose	16
	Maltose	7
	Sucrose	33
	Starch	18
	Ethanol	4
	Ethylene glycol	1
	Diethylene glycol	1
	Propylene glycol	8
	Glycerol	93
	Myo-inositol	17
Organic acids	Citric acid	20
	L-malic acid	15
	Succinic acid	12
Other	D-glucono lactone	62
	No carbon source	2

ที่มา : Satoshi และคณะ (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Mosaoka และคณะ (1993) พบว่าผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสจะมีความสัมพันธ์กับการใช้สารอาหารน้ำตาลกลูโคส ผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิก และ กรดคีโตกลูโคนิก

แหล่งคาร์บอนจะมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. โดยเป็นแหล่งให้พลังงานแก่เซลล์และเป็นองค์ประกอบหลักของแบคทีเรียลเซลลูโลส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่งรวมทั้งน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส กาแลคโตส ซูโครส มอลโทส และแมนโนส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตเซลลูโลสบางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้สารในกลุ่มแอลกอฮอล์ อาทิเช่น กลีเซอรอล ไกลคอล เอทานอล และโพรพานอล เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นแหล่งให้พลังงาน (Yoshinaga และคณะ, 1997) แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันจะมีผลต่อกิจกรรมของ phosphocose isomerase และในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลฟรุกโตส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ UDPG pyrophosphorylase สูงขึ้น ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส

4.2 แหล่งไนโตรเจนและสารอาหารอื่น ๆ

เซลล์แบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไป แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) แต่บางสายพันธุ์ต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่สำคัญเป็นสารประเภทก๊าซแอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟต ปกติเมื่อแอมโมเนียม (NH_4^+) ถูกใช้ไปจะทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นกรด เพราะจะเกิดการสะสมอนุมูลซัลเฟต (SO_4^{2-}) ขึ้น ส่วนก๊าซแอมโมเนียและไนเตรท เมื่อถูกเมตาโบไลท์และทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stabury และ Whitaker, 1984) สารไนโตรเจนอินทรีย์ที่สำคัญ ประกอบด้วย เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ และเคซีน

Stabury และ Whitaker (1984) รายงานว่าธาตุอาหารอื่น ๆ มีความจำเป็นเกี่ยวกับอัตราการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสภายนอกเซลล์ อาทิเช่น แหล่งไนโตรเจน แคลเซียม และฟอสเฟต เป็นต้น อย่างไรก็ตามชนิดและปริมาณของธาตุอาหารที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส รวมถึงสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส อาทิเช่น พีเอช อุณหภูมิ และการให้อากาศ แหล่งไนโตรเจน เป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ถ้ามีปริมาณสูงจะลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43980

เป็นแบคทีเรียลเซลลูโลส สำหรับโปตัสเซียมและโซเดียมไนเตรทแบคทีเรียไม่สามารถใช้ได้ และยังเป็นพิษต่อเชื้ออีกด้วย (Lapuz และคณะ, 1967)

4.3 อุณหภูมิ

Alaban (1962) และ Lapuz และคณะ (1967) ได้รายงานสอดคล้องกันว่าในการหมักเชื้อ *Acetobacter* sp. ในน้ำมะพร้าว ที่อุณหภูมิในช่วง 10– 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้แต่จะไม่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส การสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสจะเริ่มมีการผลิตตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสจนถึงช่วงอุณหภูมิ 28–32 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตเซลลูโลสในปริมาณสูง เมื่ออุณหภูมิสูงจะเกิดผลเสียต่อคุณสมบัติของเอนไซม์หรือการเสียสภาพโปรตีน โครงสร้างของแฟลกเจลลา ไรโบโซม โปรโตพลาส และไมโตคอนเดรีย

Krusong และ Yoshida (1995) พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ในการผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Escherichia coli* โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 20 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณสารโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นจะต่ำกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

4.4 อัตราการให้อากาศ

Krusong และ Yoshida (1995) พบว่าปริมาณการให้อากาศและปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* โดยมีผลกับปริมาณพลังงานที่สร้างขึ้นจากกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ ในกรณีของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* และ *Aerobacter aerogenes* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ พบว่ามีการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสในปริมาณที่ต่ำกว่าในสภาพที่มีอากาศ โดยการสังเคราะห์จะต่ำกว่า 25–40 เปอร์เซ็นต์ กรณีของเชื้อ *A. xylinum* พบว่าในสภาพที่ไม่มีอากาศ จะไม่สามารถสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสได้เลย การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนมีเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์เท่านั้น

Guzman และคณะ (1982) รายงานว่าปริมาณอากาศมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส โดยได้ศึกษาการผลิตของเชื้อ *A. xylinum* ในการศึกษาใช้กระบวนการหมัก 2 แบบ คือ แบบอยู่กับที่ให้เกิดแบคทีเรียลเซลลูโลสขึ้นเองที่ผิวหน้าของอาหารเหลวเปรียบเทียบการหมักที่มีการให้อากาศและมีการกวนตลอดเวลา (submerged culture) ในถังหมักขนาด 1 ลิตร อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.25 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้ 22.47 และ 71.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ebner (1982) พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. จะมีเอนไซม์อไฟเรส (aprayrase) ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพลังงาน ATP (ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานและมีการสะสมในระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก) ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เหลือพลังงาน ATP สำหรับกิจกรรมของเมตาโบลิซึมอื่น ๆ ของเซลล์ในระดับต่ำ ดังนั้นเมื่องดให้อากาศทำให้พลังงาน ATP ในแหล่งเก็บพลังงานหรือ ATP pool สูญเสียไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

Alaban (1962) ได้ศึกษาการหมักเชื้อ *A. xylinum* บนเครื่องเขย่าโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณต่างกัน คือ 25, 50, 75, 100 และ 125 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 75 มิลลิลิตร ให้ผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสปริมาณสูงสุด

ปริมาณอากาศมีส่วนสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น จะทำให้การแผ่กระจายของอากาศลดลง เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น Kouda และคณะ (1997a) ได้ศึกษาการส่งผ่านออกซิเจน (oxygen transfer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อ *A. xylinum* BPR2001 เพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืดสูงจะทำให้อัตราการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนลดลง เป็นผลให้ก๊าซออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น เป็นตัวจำกัดปริมาณก๊าซออกซิเจนที่มีอยู่ด้วย ชนิดของใบกวนในถังหมักแบบ Maxblen และ Gate with turbine จะช่วยเพิ่มการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนได้สูงขึ้น ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านของมวล (volumetric mass transfer coessicient, K_La) มีค่าสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากใบกวนจะช่วยเพิ่มฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อและช่วยเพิ่มผิวสัมผัสระหว่างฟองอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ค่า K_La สูงขึ้น และนอกจากนี้ Kouda และคณะ (1997b) ยังพบว่าการเพิ่ม partial pressure ของก๊าซออกซิเจนในถังหมัก แบคทีเรียสามารผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้สูงขึ้น และลดพลังงานในการกวน

4.5 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Ohara และคณะ (1992) รายงานว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมัก แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงค่าพีเอช 4.0–5.0 และค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหาร รวมถึงการยอมให้สารอาหารผ่านผนังเซลล์ได้

Alaban (1962) ได้ศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* พบว่าค่าพีเอช 4.0–5.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียลเซลลูโลส ที่มีค่าพีเอช 3.0 การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงและที่ค่าพีเอชมากกว่า 8.0 เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ การเติมกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1-10 เปอร์เซ็นต์ ลงในน้ำมะพร้าว นอกจากเป็นการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ได้เมื่อเติมกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Pennicillium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้ และมีรายงานว่ากรดอะซิติกที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีค่าพีเอชประมาณ 4.0–5.0 เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. xylinum* มีผลโดยตรงต่อเอนไซม์ที่เกี่ยงข้องในการสังเคราะห์โปรโตพลาสซึม และการแบ่งเซลล์ของเชื้อ *A. xylinum* และเชื้อจุลินทรีย์ยังสามารถนำกรดอะซิติกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้อีกด้วย (Naritomi และคณะ, 1998a)

Mosaoka และคณะ (1993) รายงานว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องมีการควบคุมก่อนการหมักเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. และยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ไม่สามารถทนต่อการเป็นกรดได้

5. การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในถังหมัก (aeration and agitation culture)

5.1 การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์เชื้อแบคทีเรียผลิตเซลลูโลส

ในการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเซลลูโลส Toyosaki และคณะ (1995a) ใช้ enrichment liquid culture โดยการเติมกรดอะซิติก เอทานอล และ cyclohexamide ในอาหารเหลว BHS-medium เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดอื่นและกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติก คัดเลือกจากตัวอย่างที่เก็บมาจากธรรมชาติไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือก หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน คัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างแผ่นฟิล์มวุ้นบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ streak บนอาหารแข็ง BSH-medium agar (solidified medium) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่โคโลนีนูนใสสีขาว (milk-white and swollen) ไปทดสอบคุณสมบัติและความสามารถการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสบนเครื่องเขย่าและในถังหมัก

Ishikawa และคณะ (1995) ได้ปรับปรุงพันธุ์เชื้อแบคทีเรียผลิตเซลลูโลส โดยเหนี่ยวนำเชื้อ *A xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 ให้กลายพันธุ์ด้วยสาร N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) แล้วคัดเลือกสายพันธุ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ sulfagunidine agar ซึ่งเป็นสารอะนาลอค (analog) p-amino benzoic acid (PABA) พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ชนิดใหม่มีการเจริญเติบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้นในอัตราสูง สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจากน้ำตาลฟรุกโตสได้สูง 22.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้งของแบคทีเรียลเซลลูโลสต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์) และได้มีการปรับปรุงแบคทีเรียผลิตเซลลูโลส โดยการเหนี่ยวนำเชื้อ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR2001 ให้กลายพันธุ์ด้วยสาร NTG แล้วคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPF agar ได้เชื้อกลายพันธุ์ BPR3001A พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ชนิดใหม่สามารถเจริญเติบโตและผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้มากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ และสังเคราะห์อะซิแตนได้น้อยกว่า 83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม

5.2 การหมักแบคทีเรียลเซลลูโลสในถังหมัก

Dudman (1960) รายงานว่าการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาวะแบบอยู่กับที่ จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสผลที่ได้พบว่าทั้งเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณของแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้เกิดขึ้นในอัตราต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ระยะเวลาในการผลิตนาน เมื่อเทียบผลได้ของแบคทีเรียลเซลลูโลสของการหมักทั้ง 2 แบบแล้ว การหมักในถังหมักผลได้ของแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

Naritomi และคณะ (1998a) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบเดี่ยว โดยใช้เชื้อ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR3001 เลี้ยงในอาหารน้ำตาลฟรุกโตส (Fru-CSL medium) ความเข้มข้นน้ำตาลฟรุกโตส 30 กรัมต่อลิตร โดยใช้อัตราการเติมอาหารที่อัตราการเจือจาง (dilution rate = D) ระหว่าง 0.03-0.10 พบว่าอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออัตราการเจือจางและความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มขึ้น อัตราการใช้สารอาหารน้ำตาลฟรุกโตสและผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง เมื่อเติมแลคเตทในอาหารเหลว Fru-CSL medium ปริมาณ 12.5 กรัมต่อลิตร พบว่าที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมง การเจริญเติบโตของเซลล์และผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ในอัตราการผลิต 0.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส 36 เปอร์เซ็นต์

Naritomi และคณะ (1998b) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบเดี่ยว โดยใช้เชื้อ *A. xylinum* subp. *sucrofermentans* BPR3001 เลี้ยงในอาหารน้ำตาลฟรุกโตส (Fru-CSL medium) ภายใต้สภาวะที่มีการเติมเอทานอล โดยใช้อัตราการเจือจางระหว่าง 0.03-0.10 ต่อชั่วโมง ภายใต้สภาพการให้อากาศ มีค่าออกซิเจนที่ละลาย (DO) 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอช 5.0 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์และแบคทีเรียลเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้นที่อัตราการเจือจางต่ำ ๆ เมื่อความเข้มข้นของอาหารน้ำตาลฟรุกโตสและเอทานอลมีความเข้มข้นเท่ากับ 30 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญจะคงที่และประสิทธิภาพของการหมักสูงสุดที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง ได้อัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส 46 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป

Kouda และคณะ (1997a) ได้ศึกษาผลของความดันของก๊าซออกซิเจน (partial pressure oxygen) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (partial pressure carbondioxide) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR3001ในถังหมัก ผลการศึกษาพบว่าอัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจะขึ้นกับอัตราการส่งผ่านก๊าซออกซิเจน (oxygen transfer rate) ซึ่งปริมาณอากาศมีส่วนสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสและการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้นจะทำให้การแผ่กระจายของอากาศลดลง ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง เนื่องด้วยความหนืดของอาหารเพิ่มขึ้น

Hwang และคณะ (1999) ได้ศึกษาพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสและการผลิตกรดกลูโคนิกโดยเชื้อ *A. xylinum* BRC5 ด้วยอาหารเหลว HS-medium (ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร) ในถังหมักแบบกะ ขนาด 5.0 ลิตร พบว่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ 4.1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการผลิต (Q_p) 0.095 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ของแบคทีเรียลเซลลูโลสต่อซับสเตรท ($Y_{p/s}$) 0.205 กรัมต่อกรัม และที่ค่าพีเอช 4.0 แบคทีเรียสามารถผลิตกรดกลูโคนิกได้สูง เมื่อมีการควบคุมค่าพีเอช 2 ระยะคือที่ 20 ชั่วโมงแรกของการหมัก ควบคุมค่าพีเอช 4.0 และในชั่วโมงที่ 21-50 ควบคุมค่าพีเอช 5.5 พบว่าสามารถย่นระยะเวลาการผลิตได้ และผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงกว่าแบบควบคุมค่าพีเอชระดับเดียว 1.5 เท่า และการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส 5.89 กรัมต่อลิตร การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในถังหมักแบบกึ่งกะ พบว่าการผลิตโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ HS-medium ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร และควบคุมค่าการละลายได้ของก๊าซออกซิเจนที่ 10 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้ 15 กรัมต่อลิตร ในอัตราการผลิต 0.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้น จุลินทรีย์จะสังเคราะห์อะซิแตนสูงขึ้นด้วย

Yang และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* BRC5 บนเครื่องเขย่าและในถังหมัก โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนและน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียสามารถออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิก ในขั้นสุดท้ายแบคทีเรียจะสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสจากกรดกลูโคนิก โดยวิถีกลูโคนิโอจินิซีส สำหรับน้ำตาลฟรุกโตสแบคทีเรียไม่สามารถเมตาบอไลซ์เป็นกรดกลูโคนิกได้ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส 20 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตร สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้เท่ากับ 4.06 กรัมต่อลิตร ในอัตราการผลิต 0.086 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Kouda และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* BPR3001A ในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่าที่ความดันของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง (pCO_2) ในช่วง 0.15-0.20 ความดันบรรยากาศ (atm) ส่งผลให้การเจริญเติบโต ผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสและอัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสต่อหน่วยน้ำหมัก (volumetric BCPR) ลดลง เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งกระบวนการหายใจของแบคทีเรีย มีผลต่อการสังเคราะห์ ATP ลดลง

Kouda และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลของก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* BPR3001A พบว่าประสิทธิภาพของการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสขึ้นอยู่กับค่าการส่งผ่านก๊าซออกซิเจน (OTR) ซึ่งการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนจะลดลงเมื่อความหนืดของอาหารในถังหมักสูงขึ้น เนื่องจากมีการผลิตและสะสมแบคทีเรียลเซลลูโลส การเพิ่ม partial pressure ของก๊าซออกซิเจน ด้วยการให้ก๊าซออกซิเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง (oxygen enrich air) สามารถเพิ่มการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนในน้ำหมักได้และการสะสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำหมักลดลง ทำอัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และขั้นตอนการดำเนินงาน

วัสดุ

เชื้อจุลินทรีย์

- ***Acetobacter xylinum*** **TISTR 428**

เชื้อสายพันธุ์นี้ได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำในแอมพูล (ampoule) ที่มีอาหาร YE-glucose broth หรือการเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง YE-glucose

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารเหลวประกอบด้วย (Toyosaki และคณะ, 1995)

- ซูโครส	2%
- ยีสต์สกัด	0.5%
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.3%
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5%
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.5%

(% น้ำหนักต่อปริมาตร)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
4. เครื่องเขย่า
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
6. เดสซิเคเตอร์ (desicator)
7. เครื่องชั่งสาร
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
9. เครื่องแก้ว
10. ตู้อบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนดำเนินงาน

1. นำเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 428 มาทำการ subculture เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อในจานเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารแข็ง YE-glucose

2. ทำการเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง

โดยเขี่ยเชื้อ 1 ลูปเต็ม นำมาใส่ในอาหาร YE ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส 2% ยีสต์สกัด 0.5% KH_2PO_4 0.3% $MgSO_4.7H_2O$ 0.5% $(NH_4)_2SO_4$ 0.5% (% น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์เขย่า โดยใช้อาหารปริมาตร 70 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร และความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (Toyosaki และคณะ, 1995)

2.1 การวัดปริมาณเซลล์

เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2 3 และ 4 นำมาวัดปริมาณเซลล์โดยวิธีการดังนี้ นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทรีตด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) 5% ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะนำมาใช้เป็นหัวเชื้อจะต้องมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.3 ซึ่งดัดแปลงวิธีของ Toyosaki และคณะ (1995)

3. การคัดเลือกสูตรอาหารที่เชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 428 สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดในสภาวะฟลาสก์เขย่า ในการทดลองนี้จะใช้อาหาร 5 ชนิดเพื่อทดสอบหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูโลสในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ดังนี้

- อาหาร YE (Toyosaki และคณะ, 1995)
- อาหาร BSH (Hwang และคณะ, 1999)
- อาหาร CSL (Corn Steep Liquor) (Hwang และคณะ, 1999)
- อาหาร Basal (Matsuoka และคณะ, 1996)
- อาหาร Basal ที่มีการเติมสารละลายวิตามิน (Matsuoka และคณะ, 1996)

3.1 เตรียมอาหารทั้ง 5 สูตรใส่ลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 70 มิลลิลิตร

3.2 ปิเปตต์หัวเชื้อที่เตรียมในอาหาร YE ปริมาตร 10% ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในแต่ละฟลาสก์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงแบบสภาวะฟลาสก์เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.3 การวัดปริมาณเซลลูโลส นำเซลลูโลสมาทำให้บริสุทธิ์ โดยล้างอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อชะล้างส่วนประกอบต่าง ๆ ในอาหารออก จากนั้นนำไปทรีตด้วย NaOH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 1 % ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำลายเซลล์จุลินทรีย์ แล้วนำเซลลูโลสที่ได้มาล้างให้บริสุทธิ์ด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง จึงนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (Hwang และคณะ, 1999)

4. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส ดังนี้

4.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ฟรุกโตส โดยใช้ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีชุดควบคุม คือ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารที่คัดเลือกได้

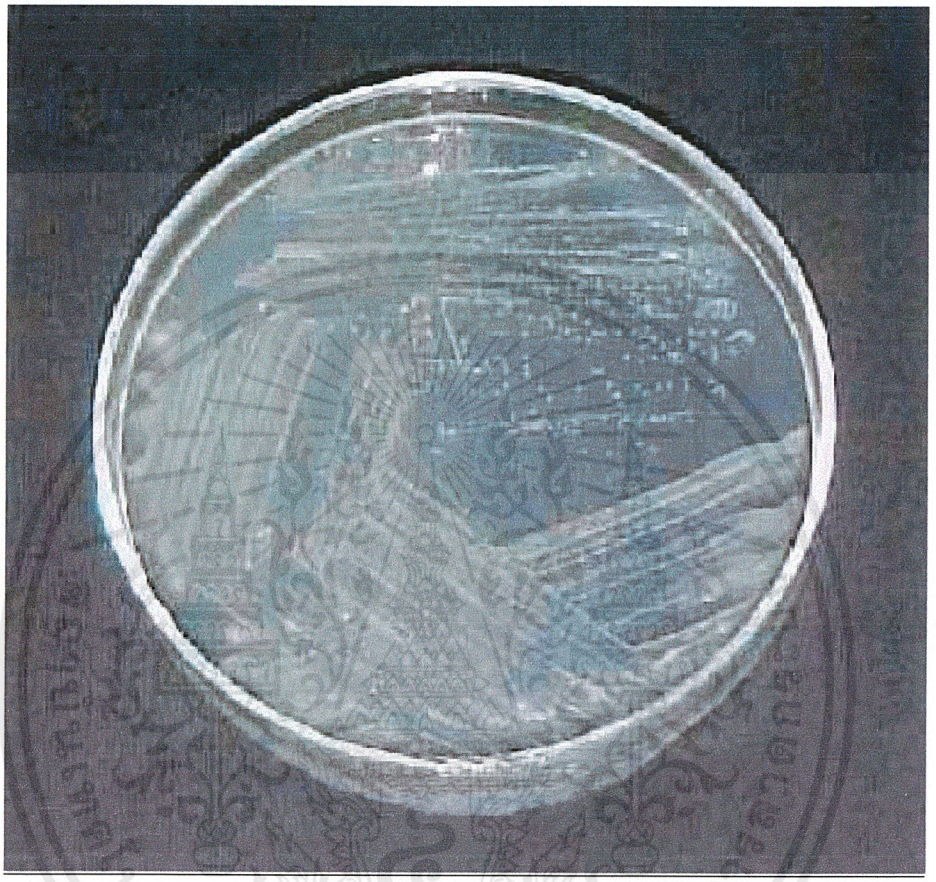
4.2 ผลของเมทไธโอนีน (methionine)

ศึกษาผลของเมทไธโอนีน โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0.001, 0.005 0.01, 0.015 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่ทำการคัดเลือกข้างต้น

4.3 ผลของแลคเตท (lactate)

ศึกษาผลของแลคเตท โดยใช้ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่ทำการคัดเลือกข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

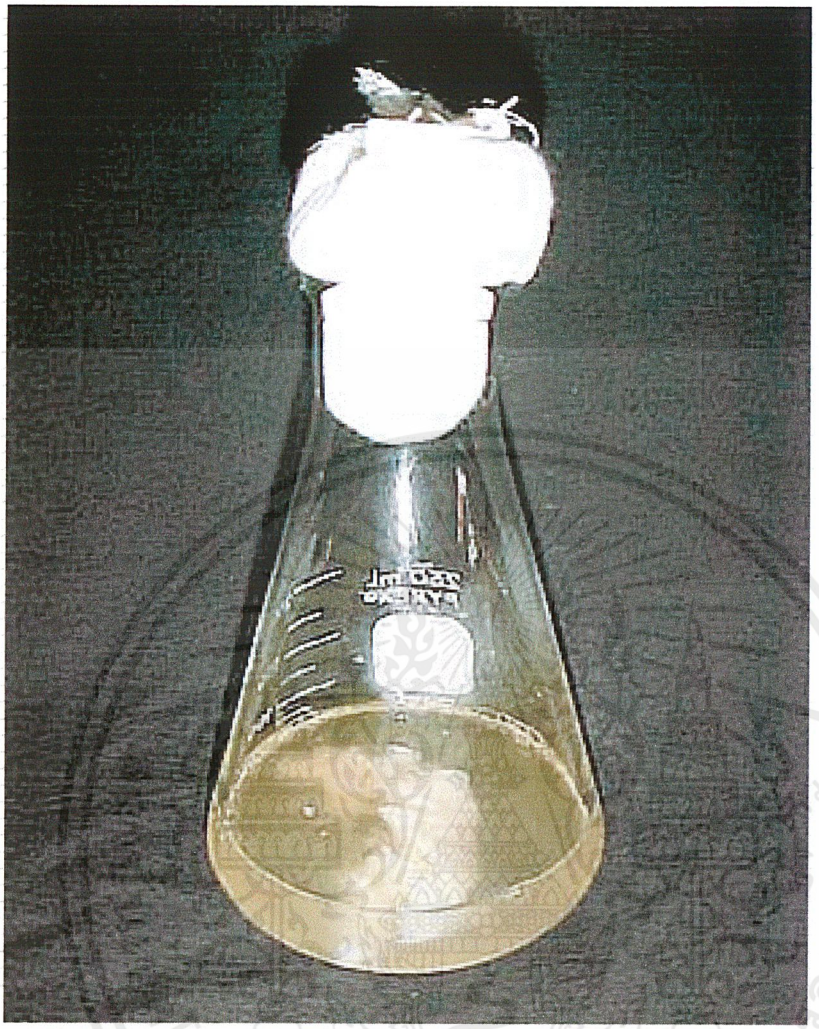


<u>รูปที่ 9</u> แสดงลักษณะเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 428 ที่ขึ้นบนอาหาร YE-glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 10 แสดงลักษณะของเซลลูโลสที่ผลิตในอาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>รูปที่ 11</u> แสดงลักษณะของเซลลูโลสที่ผลิตในอาหาร BSH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 12 แสดงลักษณะของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะฟลาสก์เขย่า

รูปที่ 13 แสดงลักษณะภายในของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะฟลาสเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

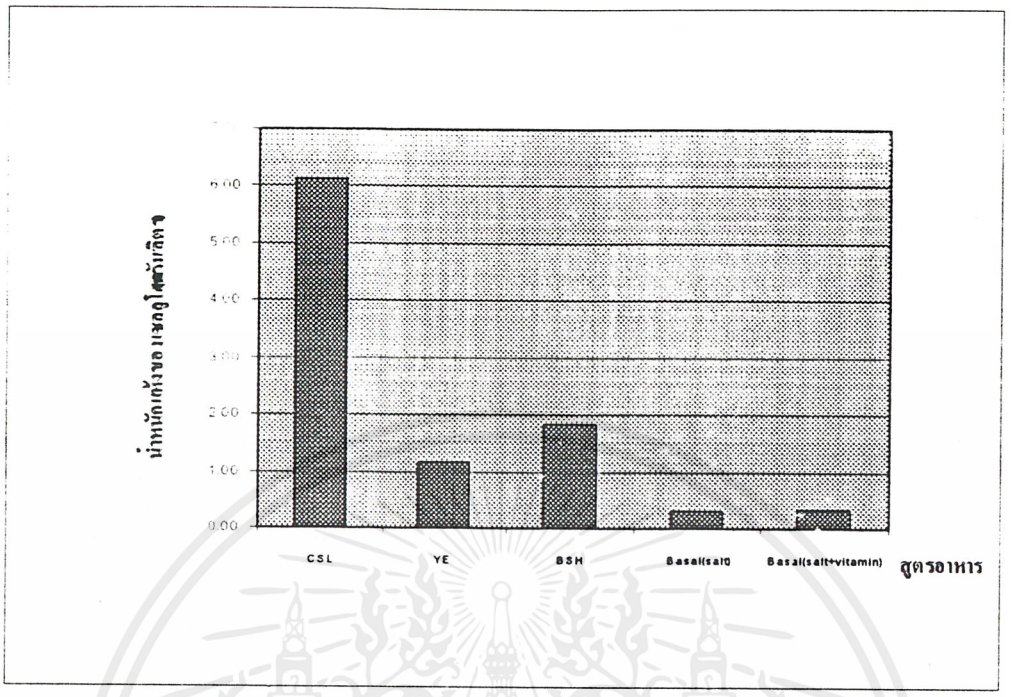
ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 428 พบว่า ในการทดสอบเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสได้ในปริมาณสูงสุด จากสูตรอาหารทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ อาหาร YE, CSL, BSH, Basal และ Basal ที่มีการเติมสารละลายวิตามิน ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าอาหาร CSL สามารถผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณมากกว่าอาหารชนิดอื่น ๆ และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งแสดงดังตารางภาคผนวกที่ 5 พบว่า น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตได้จากอาหาร CSL มีความแตกต่างจากอาหาร YE BSH Basal และ Basal ที่มีการเติมสารละลายวิตามิน ดังนั้นจึงเลือกอาหาร CSL เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการผลิตเซลลูโลส เนื่องจากมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสสูงสุดเท่ากับ 6.1356 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Matsuoka และคณะ (1996) ได้ทำการทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลส คือ เปปโตน ยีสต์สกัด และ CSL พบว่ามีเพียงอาหารที่มีการเติม CSL ชนิดเดียวเท่านั้น ที่เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีการผลิตเซลลูโลสได้ปริมาณมาก จึงสันนิษฐานว่า CSL เป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเซลลูโลส จากนั้นเมื่อทำการปรับปรุงสูตรอาหาร โดยมีการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน พบว่าในอาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตเซลลูโลสได้ดีสุดที่ระดับความเข้มข้นของฟรุกโตสเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ คือ สามารถผลิตได้ 8.5955 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 15 และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ผลิตจากอาหาร CSL ที่มีระดับความเข้มข้นของฟรุกโตสเป็น 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกอาหาร CSL ที่มีระดับความเข้มข้นของฟรุกโตสเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าและมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งสูงสุด ซึ่งปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตในอาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสนั้นมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากว่าในอาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสประกอบไปด้วย สารที่เป็นปัจจัยส่งเสริมการผลิตเซลลูโลสในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์เขย่าและฟรุกโตสยังเป็นสารต้นตอตัวหนึ่งในวิถีการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* ด้วย (Toyosaki และคณะ,1995 ; OiKawa และคณะ, 1995) ส่วนในกรณีอาหาร CSL ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อมี

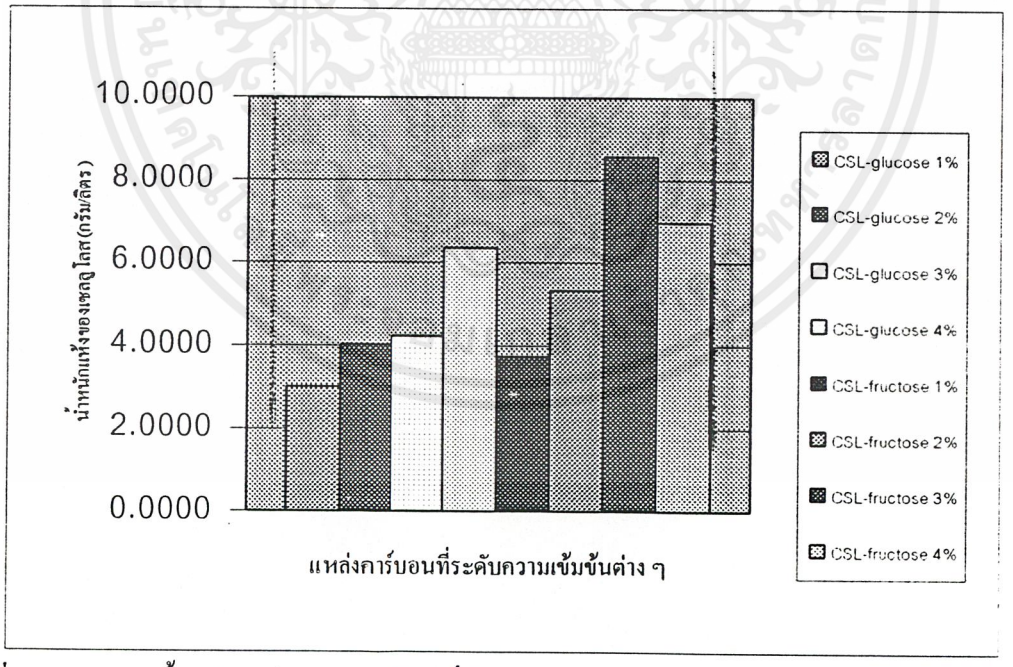
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเซลลูโลสได้ดีสุดเมื่อใช้กลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเซลลูโลส 6.3490 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 3 2 และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Mosaoka และคณะ (1993) พบว่าผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสจะมีความสัมพันธ์กับการใช้น้ำตาลกลูโคส และผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิกและกรดคีโตกลูโคนิก ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสจะอยู่ในช่วง 5-7 เปอร์เซ็นต์ (Lapus และคณะ, 1967) จากการศึกษาผลของเมทไธโอนีนซึ่งมีการเติมลงในอาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลลูโลสที่ผลิตในอาหารที่มีความเข้มข้นของเมทไธโอนีน 0.001 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสูงกว่าตัวควบคุม (อาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มีการเติมเมทไธโอนีน ดังแสดงในรูปที่ 16 เนื่องจากการเติมเมทไธโอนีนจะเป็นการกระตุ้นอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์และช่วยลดระยะเวลาช่วงแลกเฟส (lag phase) ส่งผลให้มีการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้น (Matsuoka และคณะ, 1996) และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าอาหารที่ไม่มีการเติมเมทไธโอนีนและมีการเติมเมทไธโอนีนที่ระดับความเข้มข้นเป็น 0.001 0.005 0.01 0.015 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นอาหาร CSL ที่มีการเติมเมทไธโอนีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ และที่ไม่มีการเติมเมทไธโอนีนจึงให้ผลผลิตเซลลูโลสที่ไม่แตกต่างกันมากนัก และในขั้นต่อไปได้ทำการศึกษาผลของแลคเตท พบว่าปริมาณเซลลูโลสสูงสุดในอาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์และมีการเติมแลคเตทที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ คือเท่ากับ 5.5279 กรัมต่อลิตร และเซลลูโลสที่ผลิตได้ที่ทุกระดับความเข้มข้นของแลคเตท คือ 0.1 0.15 0.2 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณมากกว่าตัวควบคุม (อาหาร CSL ที่มีฟรุกโตสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีการเติมแลคเตท) ดังแสดงในรูปที่ 17 จากงานวิจัยของ Matsuoka และคณะ (1996) พบว่าการเติมแลคเตทที่ระดับความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร CSL จะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าอาหาร Basal ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนคือ ยีสต์สกัด และ เปปโตน ถึง 4- 5 เท่า จึงสันนิษฐานว่าการเติมแลคเตทเป็นการส่งเสริมให้เกิดวัฏจักร TCA ซึ่งทำให้ได้พลังงานมาใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และส่งผลให้มีการผลิตเซลลูโลสเพิ่มขึ้นด้วย และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแลคเตทเป็น 0.1 0.15 0.2 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกับตัวควบคุม ดังนั้นในอาหารที่มีการเติมแลคเตทที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ จะให้ผลผลิตของเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน แต่ผลผลิตของเซลลูโลสที่ได้มีปริมาณมากกว่าอาหารที่ไม่มีการเติมแลคเตท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

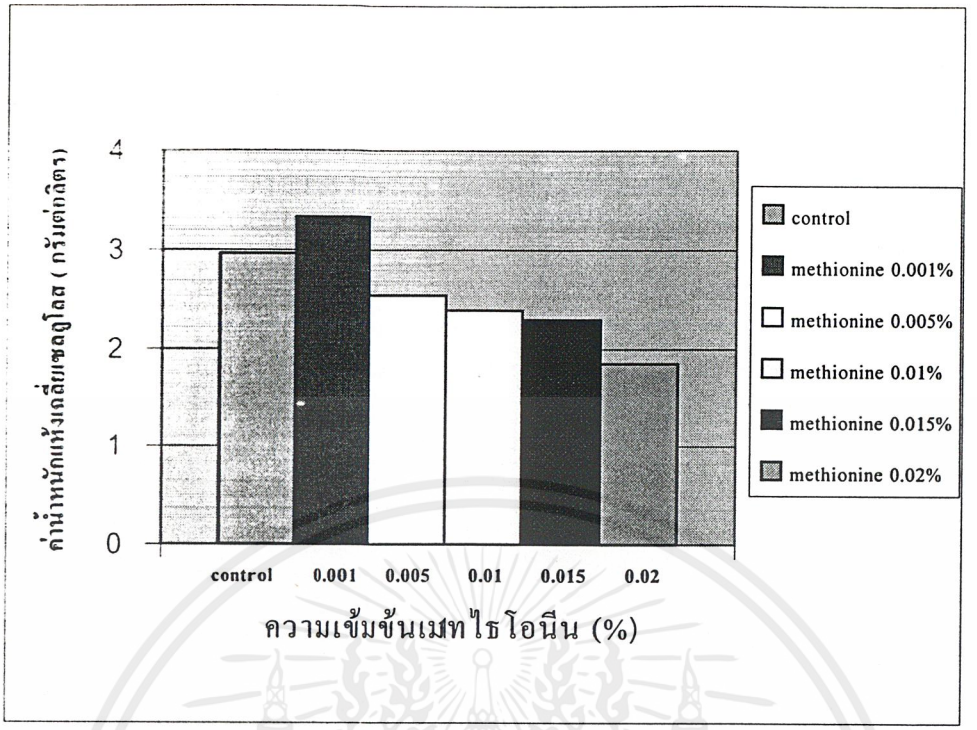


รูปที่ 14 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

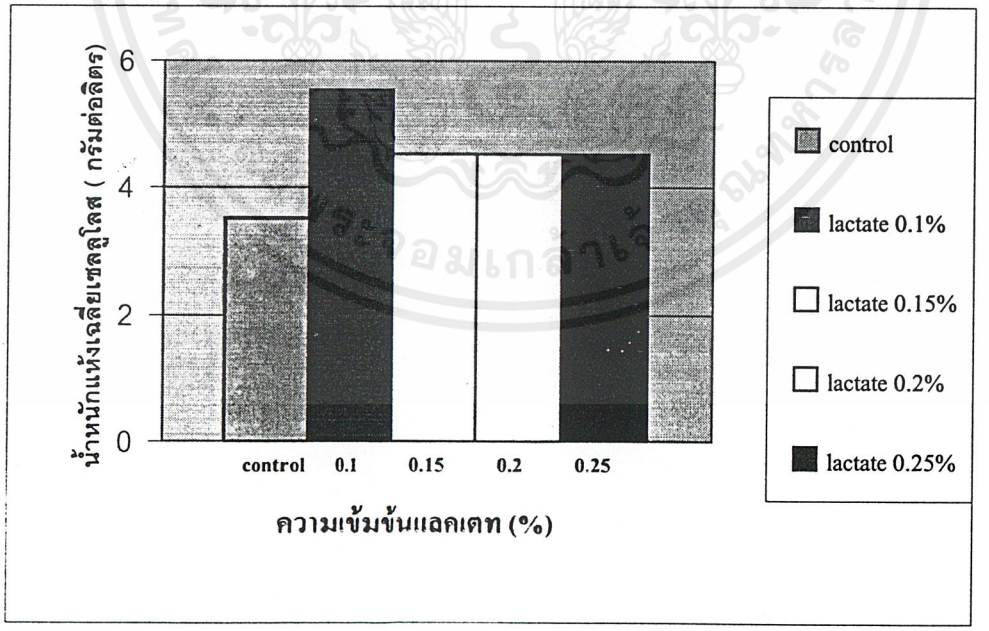


รูปที่ 15 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่มีแหล่งคาร์บอนระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงผลของเมทไธโอนีนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่มีต่อการผลิตเซลลูโลส เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 17 แสดงผลของแลคเตทที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่มีต่อการผลิตเซลลูโลสเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลส โดยทำการคัดเลือกสูตรอาหาร พบว่าสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 428 ได้แก่ อาหาร CSL และจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสและให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด คือ น้ำตาลฟรุกโตส และระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาผลของเมทไธโอนีน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนต่ำ ๆ จะส่งเสริมการผลิตเซลลูโลสให้สูงขึ้น คือ การใช้เมทไธโอนีนที่ระดับความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทไธโอนีนจะพบว่า ปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้ลดลง นอกจากนั้นผลของการเติมแลคเตทที่ได้ จากการทดลองพบว่าผลที่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการเติมเมทไธโอนีน คือ ปริมาณเซลลูโลสจะสูงเมื่อใช้แลคเตทที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ คือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแลคเตทให้สูงขึ้น พบว่าปริมาณเซลลูโลสที่ได้กลับลดลง ดังนั้นจากการทดลองนี้สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสของ *A. xylinum* TISTR 428 เพื่อให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะฟลาสก์เขย่า คือ การเลี้ยงในอาหาร CSL โดยใช้ฟรุกโตสที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมเมทไธโอนีนหรือแลคเตทที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ เท่ากับ 0.001 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* เป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ดังนั้นสำหรับในกรณีของสภาวะในการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควรจะทำการทดลองการเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ความเร็วรอบที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเซลลูโลส
2. เนื่องจากเซลลูโลสมีคุณลักษณะเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ ดังนั้นในการกรองด้วยวิธีธรรมดาต้องใช้เวลานาน และอาจมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ ผลอาจทำให้น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ได้คลาดเคลื่อน จึงควรใช้วิธีการเติมสารลดแรงตึงผิวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขณะทำการกรอง เช่น เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทวีน 80 (tween 80) หรือใช้ผ้าขาวบางในการกรอง เป็นต้น

3. การทำการย่อยเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส เราไม่สามารถทราบได้แน่นอนว่าเอนไซม์สามารถย่อยเซลลูโลสได้หมดหรือไม่ ส่งผลให้การวัดปริมาณเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงคลาดเคลื่อนและมีผลกระทบต่อการทดลอง

4. ในการจะเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมไม่ว่าจะเป็น แหล่งคาร์บอน และแหล่งกรดอะมิโนในการผลิตเซลลูโลสจะต้องคำนึงถึงค่าทางสถิติด้วย เนื่องจากว่าบางครั้งใน 2 ระดับความเข้มข้นให้ผลผลิตเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน จึงควรใช้ระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่า เพื่อลดต้นทุนการผลิต

5. แหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในประเทศไทยยังมีอีกมากที่ราคาถูกหาง่าย เช่น หางนม กากน้ำตาล น้ำมะพร้าว น้ำสับปะรด แต่ยังไม่มีการนำมาศึกษาในการผลิตเซลลูโลส จึงน่าจะมีการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้อีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

วราวุฒิ ครูส่ง, นฤมล ชูวัฒนะเดช, แชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และอินทิรา ปรุงเลิศบัวทอง. 2533. การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2534. 10(4) : 46 - 60.

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

สมคิด ธรรมรันต์. 2530. วุ้นจากน้ำมะพร้าว. กสิกร 5 : 433 – 435.

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

Atkinson, B and F. Mavituna. 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2 nd ed., United kingdom. p. 1,741.

Benziman, M. and A. Mazover. 1973. Nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate specific glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Acetobacter xylinum* and their role in the regulation of the pentose cycle. J. Biological Chemistry. 248 : 1,603 – 1,608.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Delhi, S. D. 1980. " Dairy by-product". Oxford University Press. Bombay, Calcutta. p. 545.

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

Gossele, F. and J. Swings. 1985. Identification of nata – producing bacterium as *Acetobacter hansenni*. The Philippine J. of Science. 114 (3 – 4) : 179 – 182.

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

Haigler, C.H. 1985. The function and biogenesis of native cellulose. *In* Nevell R.P. and S.H. Zeronian (eds.) Cellulose chemistry and Its Applications. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England. pp.30-80.

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

Holt, J. G., N. R. Krieng, P. H. A. Sneath, J. T. Statley and S. T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., Williams and Wikins Co., Baltimore. p.78.

Iannino, N. I. D, R. Couso and M. A. Dankert. 1988. Lipid – linked intermediates and the synthesis of acetan in *Acetobacter xylinum*. J. of General Microbiology. 134 : 1,731 – 1,736.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kennedy, J.F. 1988. Carbohydrate Chemistry. Oxford University Press, New York. p.678.

Kang, K.S. and I.W. Corrtell. 1979. Polysaccharide *In* H.J., Peppler and D. Perlman (eds.). Microbial Technology. Academic Press, New York. pp. 418 – 481.

Kring, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 William and Wilkins, Baltimore. p.964.

Krusong, W. and T. Yoshida. 1995. Counteraction of negative effect on cellulose formation in agitated culture of *Acetobacter xylinum* by addition of alginate gel beads as microaerophillic carrier. Annual Report International Conference Biotechnology, Japan. pp.155 – 200.

Kojima, Y., A. Seto, N. Tonuuchi, T. Tsuchida and F. Yoshinaga. 1997. High rate production in static culture of bacterial cellulose from sucrose by a newly isolated *Acetobacter* strain. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 61(9) : 1,585 – 1,586.

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

Kouda, T., Y. Hisato, Y. Fumihiro and Y. Hisato. 1997b. Effect of oxygen and carbon dioxide pressure on bacterial cellulose production by *Acetobacte*r in aerated and agitation culture. J. Fermentation and Bioengineering. 84(2) : 124 – 127.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Marx – Figini, M. and B. G. Pion. 1982. The control of molecular weight and molecular-weight Distribution. *In* R. M. Brown, Jr.(ed.). Cellulose and the Other Natural Polymer System. Plenim Publishing Corp., New York. pp. 243 - 271.

Matsuoka, M., T. Tsuchida, K. Matsushita, O. Adachi and Y. Yoshinaga. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans.* Bioscience Biotechnology Biochemistry. 60 : 575 – 579.

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

Mayer, R., P. Ross, H. Weinhouse, D. Amikam, G. Volman, P. Ohana, R. D. Calhoon, H. C. Wong, A. W. Emerick and M. Benziman. 1991. Polypeptide composition of bacterial cyclic diquanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 5,472 – 5,476.

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

Oikawa, T., T. Kamatani, M. Ameyama and K. Soda. 1997. Endo-β-glucanase from *Acetobacter xylinum* : purification and characterization. Current Microbiology. 34 : 309 – 313.

Ross, P., M. Raphae and B. Moshe. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiology Review. 55: 35 – 38.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Tahara, N., M. Tabuchi, K. Watanabe, H. Yano, Y. Morinaga and F. Yoshinaga. 1997a. Degree of polymerization of cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 decrease by cellulose produced by the strain. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 61(11) : 1,862 – 1,865.

Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, M.Tsuchida and F. Yoshinag. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strain suitable for agitated culture. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 59 : 1498 – 1502 .

Whitfield, C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. Canadian J. Microbiology. 34 : 415 – 420.

Wilkinson, J.F. 1958. The extra cellular polysaccharide of bacteria. Bacteriology Review. 22 : 46 – 73.

Yang, Y. K., S. H. Park, J. W. Hwang, Y. R. Pyurr and Y. S. Kim. 1998. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. J. of Fermentation and Bioengineering. 85(3) : 312 – 317.

Yamada, Y. 1983. *Acetobacter xylinum* sp. Nov., nom. Rev., for the cellulose-forming and cellulose-less, acetate-oxidizing acetic acid bacteria with the Q – 10 system. J. General Applied Microbiology. 29 : 471 – 420.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yoshino, T., T. Asakura and K. Toda. 1996 Cellulose production by *Acetobacter pasteurianus* on silicone membrane. J. of Fermentation and Bioengineering. 81(1) : 32 – 36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร YE (yeast extract) (Toyosaki และคณะ, 1995)

ประกอบด้วย

- ซูโครส	2.0 เปอร์เซ็นต์
- ยีสต์สกัด	0.5 เปอร์เซ็นต์
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.3 เปอร์เซ็นต์
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตระไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5 เปอร์เซ็นต์
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.5 เปอร์เซ็นต์

(เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร)

สูตรอาหาร BSH (Buffered Schramm & Hestrin' s) (Hwang และคณะ, 1999)

ประกอบด้วย

- กลูโคส	2.0 เปอร์เซ็นต์
- ยีสต์สกัด	0.5 เปอร์เซ็นต์
- เปปโตน	0.5 เปอร์เซ็นต์
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.27 เปอร์เซ็นต์
- กรดซิตริก	0.115 เปอร์เซ็นต์

(เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร)

สูตรอาหาร CSL (Corn Steep Liquor) (Hwang และคณะ, 1999)

ประกอบด้วย

- CSL	8.0 เปอร์เซ็นต์
- กลูโคส	2.0 เปอร์เซ็นต์
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.27 เปอร์เซ็นต์
- กรดซิตริก	0.115 เปอร์เซ็นต์

(เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร Basal (Matsuoka และคณะ, 1996)

ประกอบด้วย

- ฟรุกโตส	4.0	เปอร์เซ็นต์
- KH_2PO_4	0.1	เปอร์เซ็นต์
- $MgSO_4.7H_2O$	0.025	เปอร์เซ็นต์
(เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร)		
- สารละลายผสมของเกลือ	1.0	เปอร์เซ็นต์
(เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร)		

ประกอบด้วย

$FeSO_4.7H_2O$	3.6	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	14.7	มิลลิกรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	2.4	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	1.7	มิลลิกรัม
$MnSO_4.5H_2O$	1.4	มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.05	มิลลิกรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

สูตรอาหาร Basal ที่มีการเติมสารละลายวิตามิน (Matsuoka และคณะ, 1996)

สูตรอาหารที่ใช้เหมือนกันกับสูตรอาหาร Basal ดังข้างต้นแต่มีการเติมสารละลายวิตามิน

สารละลายวิตามิน ประกอบด้วย

- อิโนซิทอล (inositol)	2.0	มิลลิกรัม
- กรดนิโคตินิก (nicotinic acid)	0.4	มิลลิกรัม
- ไพริดอกซีน ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxine hydrochloride)	0.4	มิลลิกรัม
- ไทอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ (thaimine hydrochloride)	0.4	มิลลิกรัม
- กรดดี–แพนโทเทนิก แคลเซียม (D- pantothenic acid calcium)	0.2	มิลลิกรัม
- ไรโบฟลาวิน (riboflavin)	0.2	มิลลิกรัม
- กรดอะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid)	0.2	มิลลิกรัม
- กรดโฟลิก (folic acid)	0.0002	มิลลิกรัม
- ดี-ไบโอติน (D-biotin)	0.0002	มิลลิกรัม

ส่วนผสมทั้งหมดนี้ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ผลน้ำหนักแห้งของเซลลูโลส

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงผลน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสในการคัดเลือกสูตรอาหารเมื่อทำเลี้ยงเชื้อที่อุณภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

สูตรอาหาร	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม)	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม/ ลิตร)
CSL	0.2794	3.9914
	0.2051	2.9300
	0.324	4.6286
	0.4171	5.9586
	0.3700	5.2857
	0.3459	4.9414
	0.6068	8.6686
	0.7708	11.0114
	0.5463	7.8043
เฉลี่ย	0.4295	6.1356
YE	0.1362	1.9457
	0.0611	0.8729
	0.0803	1.1471
	0.0475	0.6786
	0.0494	0.7057
	0.0672	0.9600
	0.0744	1.0629
	0.0751	1.0729
	0.1394	1.9914
เฉลี่ย	0.0812	1.1597

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม)	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม/ ลิตร)
BSH	0.1598	2.2829
	0.169	2.4143
	0.0948	1.3543
	0.0771	1.1014
	0.0614	0.8771
	0.0508	0.7257
	0.0185	0.2643
	0.1841	2.6300
	0.183	2.6143
เฉลี่ย	0.1109	1.5849
BASAL (salt)	0.0259	0.3700
	0.0169	0.2414
	0.018	0.2571
	0.0196	0.2800
	0.0160	0.2286
	0.0194	0.2771
	0.0258	0.3686
	0.0231	0.3300
	0.0354	0.5057
เฉลี่ย	0.0222	0.3176
BASAL+ vitamin	0.0238	0.3400
	0.0174	0.2486
	0.0224	0.3200
	0.0218	0.3114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม)	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม/ ลิตร)
	0.0116	0.1657
	0.0204	0.2914
	0.023	0.3286
	0.0135	0.1929
	0.0516	0.7371
เฉลี่ย	**0.0228**	**0.3262**

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสในการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

อาหาร	น้ำหนักแห้ง	น.น. กรัม/ลิตร
CSL-glucose 1%	0.1446	2.0657
	0.2103	3.0043
	0.3125	4.4643
	0.2111	3.0157
	0.2022	2.8886
	0.1864	2.6629
เฉลี่ย	**0.2112**	**3.0169**
CSL-glucose 2%	0.429	6.1286
	0.432	6.1714
	0.2334	3.3343
	0.2268	3.2400
	0.1823	2.6043
	0.1926	2.7514
เฉลี่ย	**0.2827**	**4.0383**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร	น้ำหนักแห้ง	น.น. กรัม/ลิตร
CSL-glucose 3%	0.3562	5.0886
	0.3219	4.5986
	0.2989	4.2700
	0.2934	4.1914
	0.3032	4.3314
	0.1994	2.8486
เฉลี่ย	**0.2955**	**4.2214**
CSL-glucose 4%	0.4694	6.7057
	0.401	5.7286
	0.6224	8.8914
	0.5211	7.4443
	0.3369	4.8129
	0.3158	4.5114
เฉลี่ย	**0.4444**	**6.3490**
CSL-fructose 1%	0.1963	2.8043
	0.2212	3.1600
	0.2759	3.9414
	0.2439	3.4843
	0.3267	4.6671
	0.3156	4.5086
เฉลี่ย	**0.2633**	**3.7610**
CSL-fructose 2%	0.319	4.5571
	0.3537	5.0529
	0.3316	4.7371
	0.4616	6.5943
	0.4295	6.1357
	0.3442	4.9171
เฉลี่ย	**0.3733**	**5.3324**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร	น้ำหนักแห้ง	น.น. กรัม/ลิตร
CSL-fructose 3%	0.6532	9.3314
	0.356	5.0857
	0.6831	9.7586
	0.652	9.3143
	0.5898	8.4257
	0.676	9.6571
เฉลี่ย	**0.6017**	**8.5955**
CSL-fructose 4%	0.4187	5.9814
	0.4062	5.8029
	0.615	8.7857
	0.6897	9.8529
	0.3715	5.3071
	0.4224	6.0343
เฉลี่ย	**0.4873**	**6.9607**

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสจากการทดสอบผลของเมทไธโอนีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

อาหาร CSL-frurtose 3% เติม methionine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม)	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)
Control (CSL-fructose 3%)	0.2082	2.9743
	0.207	2.9571
	0.2154	3.0771
	0.1999	2.8557
เฉลี่ย	**0.2076**	**2.9661**
Methionine 0.001 %	0.4093	5.8471
	0.134	1.9143

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร CSL-frurtose 3% เติม methionine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม)	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)
	0.1434	2.0486
	0.247	3.5286
เฉลี่ย	**0.2334**	**3.3346**
Methionine 0.005 %	0.1911	2.7300
	0.1372	1.9600
	0.2014	2.8771
	0.1771	2.5300
เฉลี่ย	**0.1767**	**2.5243**
Methionine 0.01%	0.1809	2.5843
	0.1463	2.0900
	0.148	2.1143
	0.1939	2.7700
เฉลี่ย	**0.1673**	**2.3896**
Methionine 0.015%	0.1332	1.9029
	0.1864	2.6629
	0.1641	2.3443
	0.1549	2.2129
เฉลี่ย	**0.1597**	**2.2807**
Methionine 0.02%	0.1375	1.9643
	0.1375	1.9643
	0.1206	1.7229
	0.1184	1.6914
เฉลี่ย	**0.1285**	**1.8357**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสจากการทดสอบผลของแลคเตทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

อาหาร CSL-frurtose 3% เติม lactate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัม)	น้ำหนักแห้งของเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)
control (CSL-fructose 3%)	0.2534	3.6200
	0.2411	3.4443
	0.2391	3.4157
	0.2536	3.6229
เฉลี่ย	**0.2468**	**3.5257**
Lactate 0.1 %	**0.3409**	**4.8700**
	0.4251	6.0729
	0.4029	5.7557
	0.3789	5.4129
เฉลี่ย	**0.38695**	**5.5279**
Lactate 0.15 %	0.3104	4.4343
	0.3056	4.3657
	0.3110	4.4429
	0.3379	4.8271
เฉลี่ย	**0.3162**	**4.5175**
Lactate 0.2 %	0.2822	4.0314
	0.2974	4.2486
	0.3157	4.5100
	0.2958	4.2257
เฉลี่ย	**0.2978**	**4.2539**
Lactate 0.25 %	0.2850	4.0714
	0.3233	4.6186
	0.3048	4.3543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร CSL-frurtose 3%	น้ำหนักแห้งของ	น้ำหนักแห้งของ
เติม lactate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	เซลลูโลส (กรัม)	เซลลูโลส (กรัมต่อลิตร
	0.3394	4.8486
เฉลี่ย	0.3131	4.4732

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการวิเคราะห์ผลการทดลองในทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองในทางสถิติโดยวิธีของ Turkey's test

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการคัดเลือกสูตรอาหาร

	sum of Square	df	mean Square	F	Sig.
สูตรอาหาร	1.034	4	0.258	35.304	0.000
้าหนักแห้ง(กรัม	0.293	40	7.32E-03		
ผลรวม		1.327	44		

หมายเหตุ p-value = 0.05 ($\alpha = 0.05$)

Ho : A = B = C = D = E

Ha : มีสูตรอาหารอย่างน้อย 1 สูตรที่แตกต่างกัน

A คือ สูตรอาหาร CSL

B คือ สูตรอาหาร YE

C คือ สูตรอาหาร BSH

D คือ สูตรอาหาร Basal (salt + vitamin)

E คือ สูตรอาหาร Basal (salt)

สรุปผล

จากตาราง ANOVA พบว่าค่า p-value < α ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมุติฐานหลัก แสดงว่ามีสูตรอาหารอย่างน้อย 1 สูตรที่แตกต่างกันจากการวิเคราะห์พบว่าสูตรอาหาร Basal (salt +vitamin) และ Basal (salt) ไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างจากสูตรอาหาร CSL YE และ BSH ซึ่งสูตรอาหาร YE และ BSH นี้ไม่มีความแตกต่างกันแต่มีความแตกต่างกับสูตรอาหาร CSL Basal (salt) และ Basal (salt +vitamin) ดังนั้นสูตรอาหาร CSL จึงมีความแตกต่างทางสถิติกับทุกสูตรอาหาร และสูตรอาหาร CSL ให้ผลค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสสูงสุด ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สูตรอาหาร CSL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

Source	Type III Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
ชนิดของแหล่งคาร์บอน	0.181	1	0.181	20.193	0.000
ระดับความเข้มข้น	0.417	3	0.139	15.485	0.000
ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแหล่งคาร์บอนและระดับความเข้มข้น	0.138	3	4.61E-02	5.131	0.004
ค่าความคลาดเคลื่อน	0.359	40	8.98E-33		
ผลรวม	7.664	48			

หมายเหตุ p-value = 0.05 ($\alpha = 0.05$)

Ho : A = B

Ha : ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีความแตกต่างกัน

A คือ น้ำตาลกลูโคส

B คือ น้ำตาลฟรุกโตส

สรุปผล

จากตาราง ANOVA พบว่าค่า p-value < α ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมุติฐานหลัก แสดงว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีความแตกต่างกันจากการวิเคราะห์พบว่า สูตรอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสน้อยกว่าสูตรอาหารที่มีฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

Ho : A = B = C = D = E

Ha : มีระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

A คือ ระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 1 เปอร์เซ็นต์

B คือ ระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 2 เปอร์เซ็นต์

C คือ ระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 3 เปอร์เซ็นต์

D คือ ระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ 4 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผล

จากตาราง ANOVA พบว่าค่า p-value < α ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมุติฐานหลัก แสดงว่าระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีความแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฟรุกโตส 1 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างจากระดับความเข้มข้นของฟรุกโตส 3 เปอร์เซ็นต์และ 4 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้นของฟรุกโตส 2 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้นของฟรุกโตส 2 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างจากระดับความเข้มข้นของฟรุกโตส 3 เปอร์เซ็นต์และ 4 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้นของฟรุกโตส 3 เปอร์เซ็นต์และ 4 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างกัน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฟรุกโตส 3 เปอร์เซ็นต์ให้ผลค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสสูงสุด

ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการใช้เมทไธโอนีนที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

	sum of Square	df	mean Square	F	Sig.
ระดับความเข้มข้น	2.88E-02	5	5.77E-03	1.888	0.147
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	5.50E-02	18	3.06E-03		
ผลรวม	8.38E-02	23			

หมายเหตุ p-value = 0.05 (α = 0.05)

Ho : A = B = C = D = E = F

Ha : มีระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

A คือ ไม่มีการเติมเมทไธโอนีน

B คือ ระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนที่ 0.001 เปอร์เซ็นต์

C คือ ระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนที่ 0.005 เปอร์เซ็นต์

D คือ ระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนที่ 0.01เปอร์เซ็นต์

E คือ ระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนที่ 0.015 เปอร์เซ็นต์

F คือ ระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนที่ 0.02 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผล

จากตาราง ANOVA พบว่าค่า p-value > α ดังนั้นจึงยอมรับสมมุติฐานหลัก จากการวิเคราะห์พบว่าที่ทุกระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการเติมเมท-ไธโอนีนในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ให้ผลไม่แตกต่างกับระดับความเข้มข้นของเมทไธโอนีนที่สูงขึ้น

ตารางภาคผนวกที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการใช้แลคเตทที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
ระดับความเข้มข้น	4.05E-02	4	1.01E-02	21.91	0.000
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	6.93E-03	15	4.62E-04		
ผลรวม	4.74E-02	19			

หมายเหตุ p-value = 0.05 (α = 0.05)

Ho : A = B = C = D = E

Ha : มีระดับความเข้มข้นของแลคเตทอย่างน้อย 1 ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

A คือ ไม่มีการเติมแลคเตท

B คือ ระดับความเข้มข้นของแลคเตทที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์

C คือ ระดับความเข้มข้นของแลคเตทที่ 0.15 เปอร์เซ็นต์

D คือ ระดับความเข้มข้นของแลคเตทที่ 0.2 เปอร์เซ็นต์

E คือ ระดับความเข้มข้นของแลคเตทที่ 0.25 เปอร์เซ็นต์

สรุปผล

จากตาราง ANOVA พบว่าค่า p-value > α ดังนั้นจึงยอมรับสมมุติฐานหลัก จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของของแลคเตทเป็น 0.1 0.15 0.2 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างจากตัวควบคุม ดังนั้นการเติมแลคเตทในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่มีผลแตกต่างจากการไม่เติมแลคเตท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้