สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกระดาษวุ้นมะพร้าวโดยเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และนำกระดาษที่ได้มาประยุกต์ใช้

Paper Production from Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter nataicola* and Its Application

T104397

นางสาวกนกวรรณ มะกรวัฒนะ
นางสาวสุริศา เกษกราน
นายสิทธิชัย มาตรนอก

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 104397
วัน,เดือน,ปี - 2 พ.ย. 2552

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

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Paper Production from Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter nataicola* and Its Application

Miss Kanokwan Makornwatthana

Miss Surisa Kedkran

Mr. Sitthichai Martnok

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงาน	การผลิตกระดาษวุ้นมะพร้าวโดยเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และนำกระดาษที่ได้มาประยุกต์ใช้
	Paper Production from Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter nataicola* and Its Application
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ มะกรวัฒนะ
	นางสาวสุริศา เกษกราน
	นายสิทธิชัย มาตรนอก
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2551

กรรมการการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล	
ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ	

.....

(ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงาน	การผลิตกระดาษวุ้นมะพร้าวโดยเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และนำกระดาษที่ได้มาประยุกต์ใช้
	Paper Production from Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter nataicola* and Its Application
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ มะกรวัฒนะ
	นางสาวสุริศา เกษกราน
	นายสิทธิชัย มาตรนอก
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2551
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

การผลิตวุ้นมะพร้าวโดยเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* จากน้ำมะพร้าวที่เหลือทิ้งในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสร้อยละ 5.0 โดยปริมาตรน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน น้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.5 และเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตรน้ำมะพร้าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสจากน้ำมะพร้าว โดยให้ผลผลิตเซลลูโลส 0.42 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมมาผลิตกระดาษ กระดาษที่ได้มีความหนา 0.02 เซนติเมตร นำกระดาษที่ได้มากรองอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำมันหอมระเหยจากพืช พบว่าไม่สามารถกรองได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Paper Production from Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter nataicola* and Its Application
Students	Miss Kanokwan Makornwatthana
	Miss Surisa Kedkran
	Mr. Sitthichai Martnok
Degree	Bachelor of Science
Major	Biotechnology
Academic Year	2008
Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul

ABSTRACT

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำแนะนำต่างๆ และให้คำปรึกษาในทุกๆ ด้านจนโครงงานพิเศษฉบับนี้สมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งใจมากที่อาจารย์ให้ความกรุณาช่วยเหลือในทุกๆ ด้านและอาจารย์เป็นแบบอย่างที่ดีของข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์มงคล เพ็ญสายใจ กรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้คำปรึกษา ให้วิชาความรู้ตลอดเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณ นักวิทย์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความรัก ความเข้าใจ อบรมสั่งสอน ข้าพเจ้าไม่อาจมีวันนี้ได้ หากขาดพระคุณของท่าน

ขอขอบคุณเพื่อนๆที่น่ารักทุกคนที่เป็นเพื่อนที่ดีตลอดมา

กนกวรรณ มะกรวัฒนะ

สุริศา เกษกราน

สิทธิชัย มาตรนอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 *Acetobacter xylinum*	4
2.2 เซลลูโลส	6
2.3 เส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย	7
2.4 การเพาะเลี้ยง Bacterial Cellulose ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	9
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรีย	10
2.6 นำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์	16
2.7 กระดาษจากเซลลูโลส	17
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการทดลอง	20
3.1 วัสดุอุปกรณ์	20
3.1.1 จุลินทรีย์	20
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	20
3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง 21
3.2.1 ศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ 21
Gluconacetobacter nataicola และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976
3.2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ 21
3.2.1.2 การหมักเซลลูโลส 21
3.2.1.3 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์เซลลูโลสที่ได้ 21
3.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเซลลูโลสจาก 22
เชื้อ *G. nataicola*
3.2.2.1 แหล่งคาร์บอน 22
3.2.2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน 22
3.2.2.3 ศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 22
3.2.2.4 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 22
3.2.2.5 การเติมเอทานอล 23
3.2.3 ศึกษาผลผลิตของเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม 23
3.2.4 การผลิตกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *G. nataicola* 23
3.2.5 การนำกระดาษจากเซลลูโลสมาประยุกต์ใช้ 24
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 25
4.1 ศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* 25
และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976
4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเซลลูโลสจาก 26
เชื้อ *G. nataicola*
4.2.1 แหล่งคาร์บอน 26
4.2.2 แหล่งไนโตรเจน 29
4.2.3 ศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 31
4.2.4 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH) 33
4.2.5 ศึกษาการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ 35
4.3 ผลของการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว 38
ในสภาวะที่เหมาะสม
4.4 การผลิตกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *G. nataicola* 39
4.5 ผลจากการนำกระดาษเซลลูโลสที่ได้มาประยุกต์ใช้ 39
4.5.1 แผ่นกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ 39
4.5.2 แผ่นกรองน้ำมันหอมระเหย 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์การทดลอง 40
เอกสารอ้างอิง 41
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม 44
ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์หาผลผลิตเซลลูโลส 46
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์ทางสถิติ 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *A.xylinum*	12
4.1 ผลการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 และเชื้อ *G. nataicola* ในการหมักที่สภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน	25
4.2 ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ภายหลังการหมัก 7 วัน	27
4.3 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ภายหลังการหมัก 7 วัน	29
4.4 ผลของการใช้อุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ภายหลังการหมัก 7 วัน	31
4.5 ผลของการใช้ pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ภายหลังการหมัก 7 วัน	33
4.6 ผลของการใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *G. nataicola* ภายหลังการหมัก 7 วัน	36
4.7 ผลผลิตเซลลูโลส ความหนา และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *G. nataicola* และเชื้อ *A. xylinum* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในสภาวะที่เหมาะสม	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะของ *Acetobacter xylinum*	4
2.2 แสดงลักษณะของแผ่นเซลลูโลส	6
2.3 แสดงโครงสร้างของเซลลูโลส	6
2.4 แสดงลักษณะของเซลลูโลส	7
2.5 วิถีการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*	8
2.6 โครงสร้างของ Cellulose Synthase (bcs) Operon	9
2.7 ภาพถ่ายของเชื้อ *A. xylinum* ขณะที่กำลังสร้างเส้นใยเซลลูโลส ด้วยกล้อง Transmission Electron Micrograph	10
4.1 แสดงผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 และเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* ในการหมักที่สภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน	26
4.2 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน	28
4.3 แสดงภาพการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน	30
4.4 แสดงผลของการใช้อุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน	32
4.5 แสดงผลของการใช้ ค่าความเป็นกรดด่าง เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน	34
4.6 แสดงผลของการใช้ความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ

วุ้นน้ำมะพร้าวมีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า Bacterial cellulose เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอาหารเหลว ไม่ว่าจะเป็นน้ำผัก น้ำผลไม้ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการชีววิทยา โดยใช้แบคทีเรียที่ชื่อว่า *Acetobacter xylinum* หมักด้วยน้ำมะพร้าว แผ่นวุ้นมีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว มีสีขาว สีครีม ทึบแสง เป็นสารเซลลูโลส ลักษณะทางกายภาพคล้ายวุ้นทำขนม แต่เหนียวกว่า ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส ก็ไม่ละลาย

ลักษณะเฉพาะของวุ้นมะพร้าวที่ได้จาก *Acetobacter xylinum*

- เส้นใยมีขนาดเล็กมาก คือ หนาประมาณ 3-4 นาโนเมตร กว้าง 60-80 นาโนเมตร และ ยาวประมาณ 180-960 นาโนเมตร
- จากการที่เส้นใยมีขนาดเล็กมาก ดังนั้นจึงทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่าง ๆ ได้ดี
- ไม่มีเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพกตินเจือปน
- เส้นใยมีความเป็น Hydrophilic สูง อุ้มน้ำได้ 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง
- เส้นใยมีลักษณะใส
- เส้นใยทนต่อแรงดึงได้สูงกว่าไฟเบอร์สังเคราะห์ต่าง ๆ
- สามารถใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก หาง่าย
- สามารถควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพได้ตามที่ต้องการ โดยจัดองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง และสภาวะการหมัก

จากคุณสมบัติที่เด่นของเซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose) คือ เส้นใยมีขนาดเล็กเชื่อมกันเป็นร่างแหทำให้มีความเหนียวสูง ดังนั้นจึงได้มีการนำแบคทีเรียเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาดัดแปลงใช้เป็นส่วนประกอบของเยื่อ (membrane) ต่าง ๆ เช่น นำมาทำเป็นกระดาษที่ต้องการความเหนียวสูง และใช้เป็นส่วนประกอบของลำโพง ในอุตสาหกรรมเครื่องเสียงใช้เซลลูโลสในการผลิตหูฟังคุณภาพเยี่ยม เนื่องจากเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีลักษณะละเอียดและแข็งแรง สามารถคงรูปร่างอยู่ได้แม้ถูกหล่อ สามารถถ่ายทอดเสียงได้เร็วพอๆ กับอะลูมิเนียม โดยให้เสียงก้องเพียงเล็กน้อย ในทางการแพทย์ได้มีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรีย มาพัฒนาใช้เป็นผิวหนังเทียมหรือวัสดุปิดแผลเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ไม่แนบติดกับบาดแผล สามารถปรับเปลี่ยนรูปร่างได้ง่าย ทั้งยังมีลักษณะโปร่งใส มีความเหนียวแม้ในสภาพเปียก และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังได้มีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรีย มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร เช่น ที่ฟิลิปปินส์มีการเสิร์ฟขนมพุดดิงที่ทำจากส่วนผสมของน้ำตาล น้ำกะทิ และเซลลูโลสจากแบคทีเรีย ทั้งนี้ด้วยคุณสมบัติของเซลลูโลสที่ไม่ได้ให้พลังงานกับร่างกายแต่อย่างใด เมื่อนำมาประกอบเป็นอาหารจึงสามารถรับประทานได้โดยไม่ทำให้อ้วน ดังนั้นเซลลูโลสกลายเป็นสารช่วยลดความอ้วนได้ (http://www.toryod.com/smejelly_nata_whats.php)

เนื่องจากเชื้อที่นำมาใช้ผลิตเซลลูโลสหรือวุ้นมะพร้าวในปัจจุบันเป็นเชื้อ*Acetobacter xylinum* เมื่อเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลานาน จะมีปัญหาเนื่องจากเชื้อดังกล่าวอาจกลายพันธุ์ได้ง่าย ทำให้ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงแต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอ เบญจะและปิยะศักดิ์ (2550) ได้ทำการคัดแยกเชื้อที่ผลิตเซลลูโลสได้จากผลไม้ในประเทศไทย พบว่าเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* มีประสิทธิภาพในการผลิตเซลลูโลสได้สูงเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่นที่แยกได้ ในโครงงานพิเศษนี้จึงสนใจที่จะนำเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* ที่แยกได้มาศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อ *A. xylinum* ที่ใช้ผลิตเซลลูโลสในปัจจุบัน และนำเชื้อที่แยกได้นี้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตกระดาษ ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการลดสภาวะโลกร้อนที่เป็นปัญหาที่สำคัญในปัจจุบันนี้ โดยนำเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกระดาษแทนเยื่อไม้ซึ่งต้องไปตัดไม้ทำลายป่า ดังนั้นโครงงานนี้นอกจากจะได้ผลิตภัณฑ์กระดาษที่ผลิตได้จากเชื้อที่แยกได้แล้ว ยังช่วยลดมลภาวะโลกร้อนอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 เพื่อดูว่าเชื้อทั้งสองมีการเจริญและผลิตเซลลูโลสสูงสุดในวันใด และเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อทั้งสอง

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเซลลูโลสจาก *G. nataicola* โดยศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเติมเอทานอล

3. ผลิตกระดาษโดยเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในสภาวะที่เหมาะสม และนำกระดาษที่ได้มาประยุกต์ใช้ เช่น กระดาษกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ กรองน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อนี้ จากนั้นเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมและนำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษ นำกระดาษที่ได้มาประยุกต์ใช้

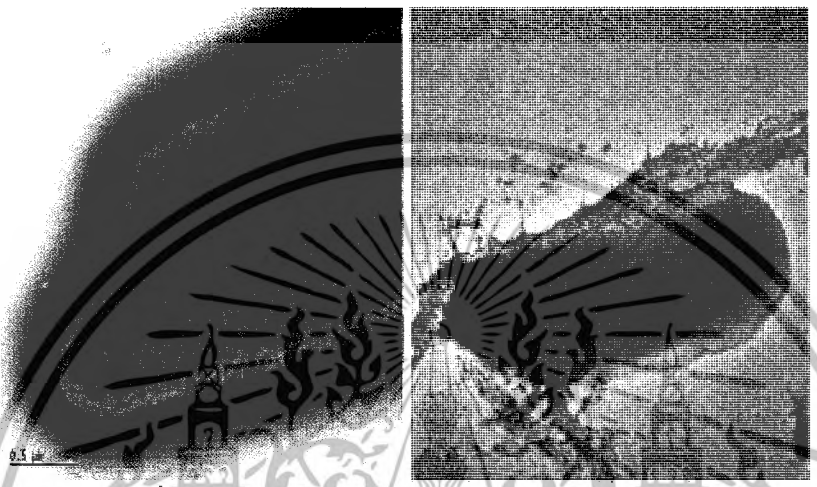
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตกระดาษจากเซลลูโลสจากแบคทีเรียหรือวุ้นมะพร้าวโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เอง และนำกระดาษที่ได้มาประยุกต์ใช้เป็นกระดาษกรองและเป็นการพัฒนากระดาษวุ้นมะพร้าวมาใช้งานด้านอื่น นอกจากการนำมาประดิษฐ์เป็นโคมไฟ หรือใช้ในงานประดิษฐ์ต่างๆ รวมทั้งเป็นการลดปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง โดยการนำน้ำมะพร้าวแก่ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ มาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เพื่อผลิตเซลลูโลสหรือวุ้นมะพร้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Acetobacter xylinum* (www.technoinhome.com)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของ *Acetobacter xylinum*

ที่มา : www.vcharkarn.com/vnews/143301

<u>อนุกรมวิธาน</u>

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Alpha Proteobacteria

Order: Rhodospirillales

Family: Acetobacteraceae

Genus: *Acetobacter*

Species :*Acetobacter xylinum*

<u>หมายเหตุ</u> ปัจจุบัน *Acetobacter xylinum* เปลี่ยนเป็น *Gluconacetobacter xylinus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

เป็นเซลล์รูปท่อนตรง หรือโค้งเล็กน้อย ขนาด 0.6-0.8 x 2.0-3.0 ไมโครเมตร การเรียงตัวอาจอยู่เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสาย เคลื่อนที่โดยเฟลกเจลลารอบๆเซลล์หรือไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เซลล์อายุน้อยติดสีแกรมลบเมื่ออายุมากบางสายพันธุ์ติดสีแกรมไม่แน่นอน

2.1.2 ลักษณะทางชีวเคมี/สรีรวิทยา (Biochemistry/Physiology)

เป็นพวกเคโมออร์แกโนโทรป หายใจโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย สามารถออกซิไดซ์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกที่พีเอชเป็นกลาง และเป็นกรด (พีเอช 4.5) และสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ แหล่งคาร์บอนที่ดีคือ เอทานอล แลกเตท โดยทั่วไปไม่สร้างสารสี มีบางสายพันธุ์อาจสร้างสารสีน้ำตาลละลายน้ำได้ เป็นพวกแอโรป

2.1.3 คุณสมบัติและลักษณะทางอุตสาหกรรม

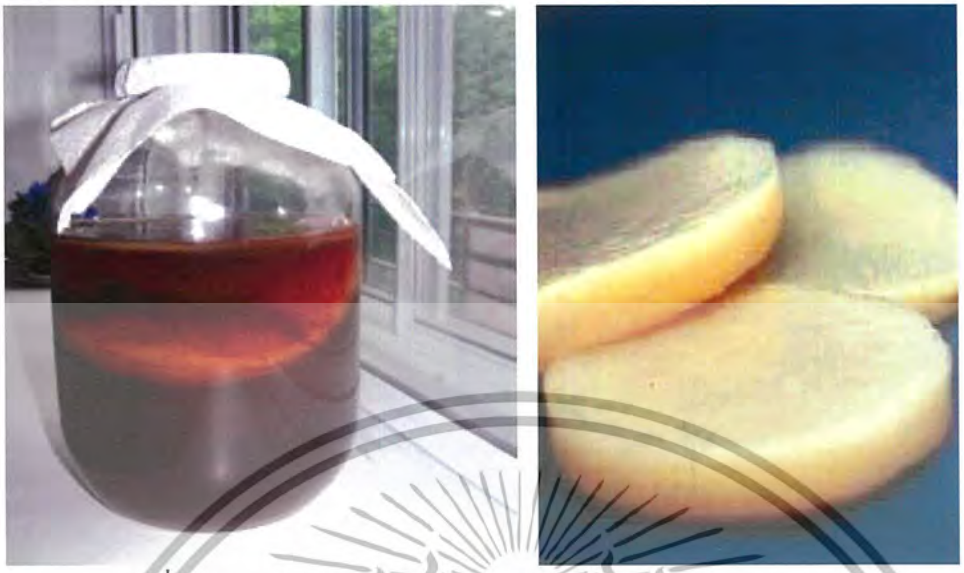
มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 30 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิในการเจริญ 5 – 42 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ 5.4 – 6.3 ซึ่งเหมาะสมในการผลิตวุ้นสวรรค์หรือวุ้นมะพร้าว เชื้อ *Acetobacter* สามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลส โดยเส้นใยเหล่านี้จะเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (liquid culture) ซึ่งถ้าเปรียบเทียบโครงสร้างและวิถีของการสังเคราะห์ พบว่าเส้นใยจากแบคทีเรียจะประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆ มากมายเชื่อมกันเป็นร่างแห ซึ่งต่างจากเส้นใยจากพืช

2.1.4 แหล่งอาศัย/นิเวศวิทยา(Habitat/Ecology)

พบได้ทั่วไปในผลไม้ มะพร้าว ผัก น้ำผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว น้ำส้มสายชู และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

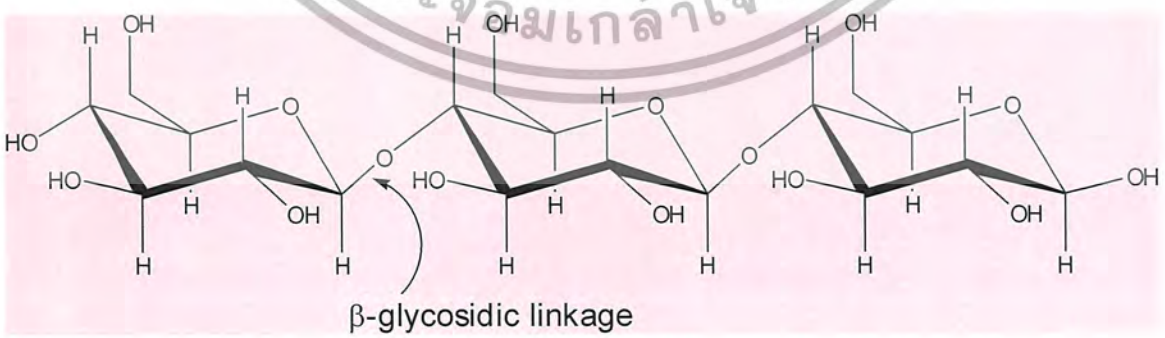
2.2 เซลลูโลส



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของแผ่นเซลลูโลส

ที่มา : http://www.botany.hawaii.edu และ http://rawinrussian.livejournal.com

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารโพลิเมอร์ธรรมชาติ ที่มีจำนวนมากที่สุดในโลก เพราะเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) ในพืช โครงสร้างของเซลลูโลสเกิดจากหน่วยของ D–กลูโคส มาจับต่อกันด้วยพันธะ β –1 , 4' ไกลโคซิดิก (β–1 , 4' glycosidic bond) มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เซลลูโลสมีลักษณะเป็นโซ่ยาว เมื่อมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโซ่ของเซลลูโลสนี้ จึงทำให้เกิดเป็นเส้นใยที่เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเซลลูโลสและนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้ เช่น *Acetobacter xylinum* โดยเรียกเซลลูโลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ว่าเซลลูโลสชีวภาพ (202.129.15.68/chemistry/Biomolecule/Biomolecule034.htm)



รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : http://www.promma.ac.th/chemistry/Biomolecule/Biomolecule034.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

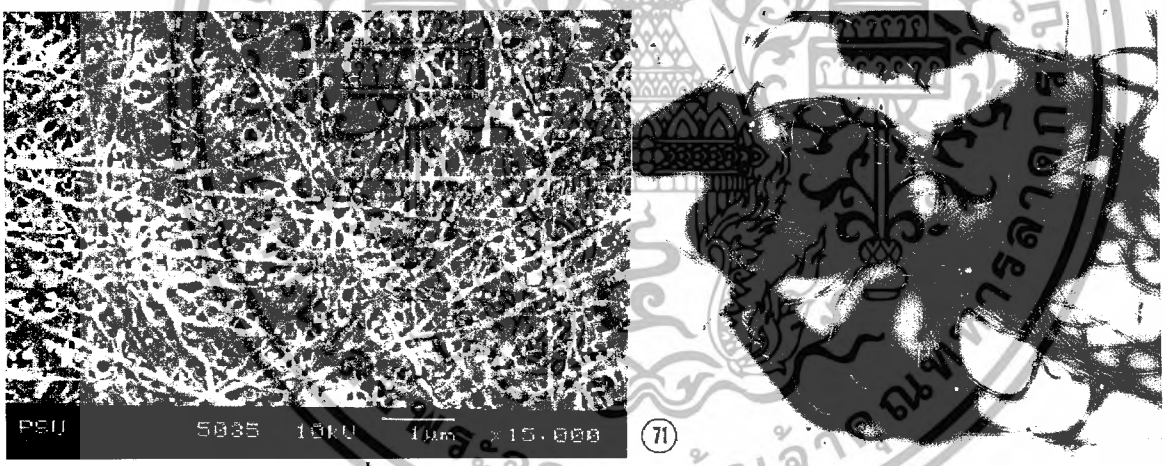
เซลลูโลสชีวภาพที่ได้จาก *A. xylinum* นั้นมีลักษณะพิเศษคือ เป็นเส้นใยเซลลูโลสขนาดเล็กมาก เล็กกว่าเส้นใยจากพืช 100-1000 เท่า (มีขนาด 1/1000 เท่า ของเส้นผมมนุษย์) สานถักเป็นแผ่นร่างแห แผ่นเส้นใยมีรูพรุนขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 200 นาโนเมตร อุ้มน้ำได้ดี บริสุทธิ์สูง สีขาว โปร่งแสง เหนียว แข็งแรงใกล้เคียงอลูมิเนียม ทนกรด ด่าง ความร้อน รังสี และให้ความเย็นเมื่อสัมผัส USFDA ได้จัดให้เซลลูโลสชีวภาพเป็นสารในกลุ่ม GRAS (Generally Recognized as Safe) ซึ่งหมายถึงมีความปลอดภัยต่อการบริโภค

(http://www.prd.go.th/Article/kaset.php?id=c5563&bow=00000000036&code=c5563)

2.3 เส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

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

ในปัจจุบันนี้ พบแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลสได้ เช่น แบคทีเรียใน Genus *Acetobacter* เช่น *Acetobacter xylinum* โดยเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose) มีโครงสร้างและคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างจากเส้นใยเซลลูโลสจากพืช ในขณะนี้ได้มีการศึกษาถึงการนำเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาประยุกต์ใช้ประโยชน์

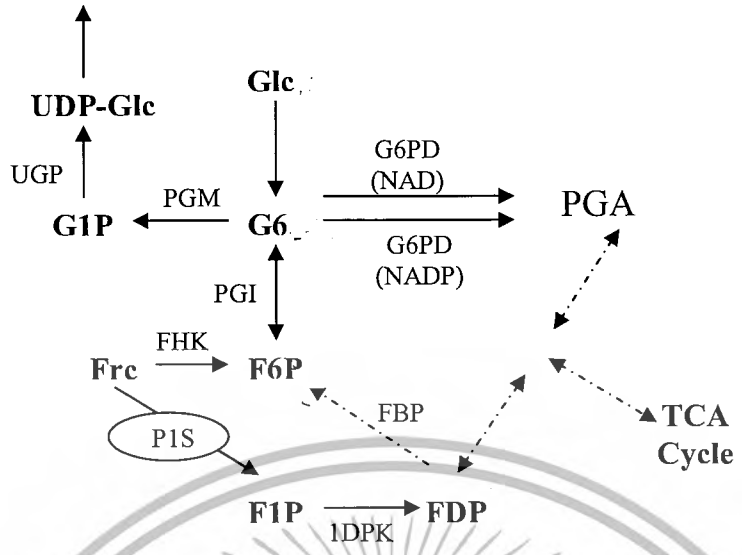


รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของเซลลูโลส

ที่มา : http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/feb18/cellulos.htm

ในทางอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มีการวิจัยถึงการเพิ่มผลผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค เชื้อ *Acetobacter* สามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลส โดยเส้นใยเหล่านี้จะเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (liquid culture) ซึ่งถ้าเปรียบเทียบโครงสร้างและวิถีของการสังเคราะห์พบว่าเส้นใยจากแบคทีเรียจะประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆ มากมายเชื่อมกันเป็นร่างแห ซึ่งต่างจากเส้นใยจากพืช การสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีวิถี ดังแสดงในรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



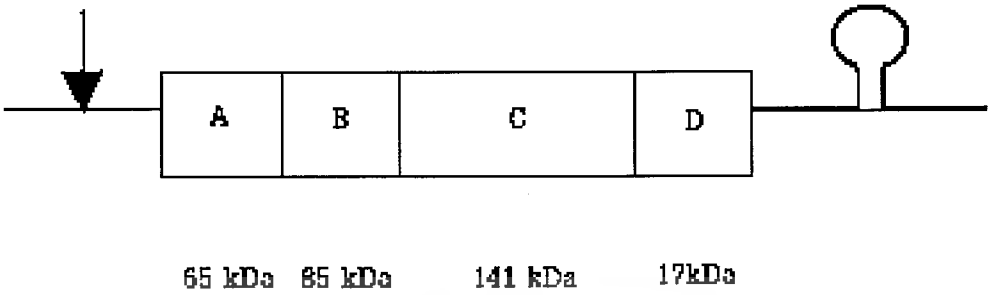
รูปที่ 2.5 วิถีการสังเคราะห์เซลลูโลสของ *Acetobacter xylinum*

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

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

ได้มีการศึกษาถึงขบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียและพบว่าน้ำตาลกลูโคสจะถูกย่อยสลายผ่านทาง pentose phosphate pathway โดย cellulose pathway จะแยกออกที่ glucose-6-phosphate (G6P) และตัวสารตั้งต้น (direct precursor) ของการสังเคราะห์ cellulose ก็คือUDP-glucose ซึ่งการสังเคราะห์ UDP-glucose จาก G6PD นั้น จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนด้วยกัน โดยพบว่าการทำงานของเอนไซม์ phosphoglucose isomerase จะแตกต่างกันไป เอนไซม์นี้จะมี activity สูงเมื่อแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาล fructose UDP-glc จะถูก polymerized ไปเป็น cellulose และ cellulose จะถูกปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะมีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเส้นใยนี้จะประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 4 ชนิด ซึ่งจะถูกควบคุมโดย cellulose synthase operon (รูปที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ Cellulose Synthase (*bcs*) Operon.
ที่มา : http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/cellu.html

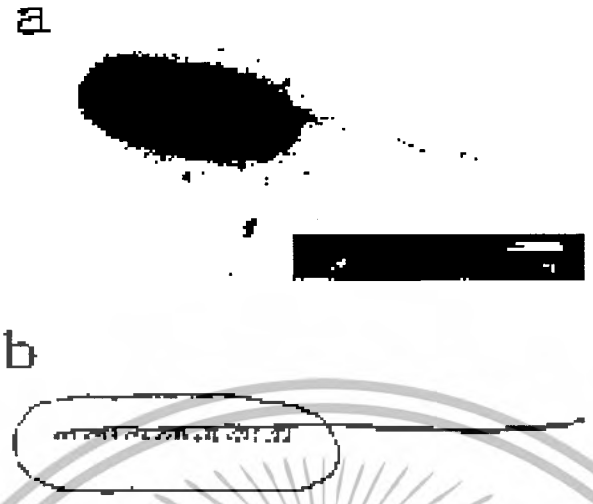
โดยยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ cellulose คือ *bcsA*, *bcsB*, *bcsC* และ *bcsD* ได้มีการทดลองพบว่ายีนส์ *bc A*, *B* และ *C* มีความสำคัญต่อการทำงานของ enzyme ต่าง ๆ ส่วนยีน *bcsD* นั้นจะมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรียซึ่งผลของการทดลองพบว่าถ้าทำให้ยีน *bcsD* ลดกิจกรรมลง พบว่าจะทำให้การสังเคราะห์เซลลูโลสลดลงถึงร้อยละ 40

2.4 การเพาะเลี้ยง Bacterial Cellulose ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการเพาะเลี้ยง *Acetobacter* เพื่อผลิตเซลลูโลสนั้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ การเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการให้อากาศและมีการเขย่าจะให้ผลดีที่สุด สำหรับการสร้างเซลลูโลสจะเกิดขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรียและเส้นใยเหล่านี้จะถูกขับออกมาทางรูของเซลเมมเบรน (รูปที่ 2.7) โดยใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และให้เซลลูโลส สูงถึง 9 กรัมต่อลิตร

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* นั้นได้ทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในสภาพนิ่ง (static) และสภาพที่มีการเขย่า (agitation) พบว่าการเลี้ยงแบบสภาพนิ่งจะทำให้เส้นใยเจริญและจับตัวกันแน่น ทำให้สภาพอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงกว่าการเลี้ยงแบบเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มกรดคาร์บอนิกจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตดีในช่วงของ lag phase และยังช่วยเพิ่มการผลิตเซลลูโลสด้วย การเพิ่มกรดแลกติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้เชื้อสังเคราะห์ ATP ได้ดีขึ้น โดยจะไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ lactate dehydrogenase และ TCA cycle นอกจากนี้ ปัจจัยอื่น ได้แก่ ชนิดของใบพัดในถังหมัก ความเร็วรอบในการกวน ปริมาณอากาศและค่าความเป็นกรดด่างก็มีผลต่อการผลิตเซลลูโลสด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 (a) ภาพถ่ายของเชื้อ *A. xylinum* ขณะที่กำลังสร้างเส้นใยเซลลูโลสด้วยกล้อง Transmission Electron Micrograph (b) เป็นโมเดลของการสร้างเซลลูโลส
ที่มา : http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/cellu.html

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดจนการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* มีดังต่อไปนี้

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์เซลล์ (Stanbury and Whitaker, 1984) ในการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อแบคทีเรียนี้ต้องการแหล่งคาร์บอนที่จำเพาะเจาะจงและแน่นอนสำหรับใช้ในการสร้างเซลลูโลส ในกรณีนี้ซึ่งพบว่าเซลลูโลสจากแบคทีเรียซึ่งเป็นสารประเภทโฮโมโพลีแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์โดยเอนไซม์ชนิดเดียว แต่เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการแหล่งคาร์บอนที่ไม่จำเพาะเจาะจง สามารถสังเคราะห์เซลลูโลสได้จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด (Crueger and Crueger, 1982)

Hestrin และคณะ (1947) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* เช่น น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส เช่น แอมโมเนียมฟอสเฟตและแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alban (1962) ได้ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซูโครส กาแลคโตส แมนนิทอล มอลโทส แลคโตส และอะราบิโนส พบว่าการหมักเซลลูโลสในซับสเตรทที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและกลีเซอรอล เป็นองค์ประกอบ สามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ผลผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสต่อน้ำตาลชนิดต่างๆ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

Lapuz และคณะ (1967) พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสจะอยู่ในช่วงร้อยละ 5-7 และได้นำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้หลายสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส ร้อยละ 5 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 4.0-6.0 ที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมประกอบด้วยเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เช่น น้ำตาลซูโครส กลูโคส และแลคโตส ตามลำดับ

Masoka และคณะ (1993) พบว่าผลผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสมีความสัมพันธ์กับการใช้น้ำตาลกลูโคส ผลผลิตของแบคทีเรียเซลลูโลสลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิค และกรดคีโตกลูนิก

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. โดยเป็นแหล่งให้พลังงานแก่เซลล์ เป็นองค์ประกอบหลักของแบคทีเรียเซลลูโลส ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่งรวมทั้งน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส กาแลคโตส ซูโครส มอลโทส และแมนโนส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตเซลลูโลสบางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้สารในกลุ่มแอลกอฮอล์ เช่น กลีเซลรอล ไกลคอล เอทานอลและโพรพานอล เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นแหล่งให้พลังงาน (Yoshinaga *et al* ., 1997) แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ phosphocose isomerase และแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลฟรุกโตส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ UDPG pyrophosphorylase สูงขึ้น ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *A.xylinum*

แหล่งคาร์บอน	ชนิด	ผลผลิตของเซลลูโลส (%)
Monosaccharide	D-fructose	92
	D-galactose	15
	D-glucose	100
	D-mannose	3
	D-xylose	11
	D-arabinose	14
	D-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 *et al.* (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 แหล่งไนโตรเจนและสารอาหารอื่นๆ

เซลล์แบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไป แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์ ที่สำคัญเป็นสารประเภทก๊าซแอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียมและไนเตรท สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟต ปกติเมื่อแอมโมเนียม (NH_4^+) ถูกใช้ไปจะทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นกรด เพราะจะเกิดการสะสมอนุมูลซัลเฟต (SO_4^{2-}) ขึ้น ส่วนก๊าซแอมโมเนียและไนเตรท เมื่อถูกเมตาบอไลท์จะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stanbury and Whitaker, 1984) สารไนโตรเจนอินทรีย์ที่สำคัญ ประกอบด้วยเปปโตน สารสกัดจากยีสต์ และเคซีน

Stanbury และ Whitaker (1984) รายงานว่าธาตุอาหารอื่นๆ มีความจำเป็นเกี่ยวกับอัตราการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสภายนอกเซลล์ เช่น แหล่งไนโตรเจน แคลเซียม และฟอสเฟต เป็นต้น อย่างไรก็ตามชนิดและปริมาณของธาตุอาหารที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส รวมถึงสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส เช่น พีเอช อุณหภูมิ และการให้อากาศ แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่ถ้ามีปริมาณสูงจะลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรตเป็นเซลลูโลส สำหรับไนไตรท์และไนเตรท แบคทีเรียไม่สามารถใช้ได้และยังเป็นพิษต่อเชื้ออีกด้วย (Lapuz *et al.*, 1967)

2.5.3 อุณหภูมิ

Alban (1962) และ Lapuz และคณะ (1967) ได้รายงานสอดคล้องกันว่าในการหมักเชื้อ *Acetobacter* sp. ในน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิในช่วง 10-45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้แต่จะไม่ผลิตเซลลูโลส การสังเคราะห์เซลลูโลสจะเริ่มมีการผลิตตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสจนถึงช่วงอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตเซลลูโลสในปริมาณสูง เมื่ออุณหภูมิสูงจะเกิดผลเสียต่อคุณสมบัติของเอนไซม์หรือการเสียสภาพโปรตีน โครงสร้างของแฟลกเจลลา ไรโบโซม โปรโตพลาสและไมโตคอนเดรีย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 อัตราการให้อากาศ

Krusong และ Yoshida (1995) พบว่าปริมาณการให้อากาศและปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* โดยมีผลกับปริมาณพลังงานที่สร้างขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ในกรณีของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* และ *Aerobacter aerogenes* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ พบว่ามีการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสในปริมาณที่ต่ำกว่าสภาพที่มีอากาศ โดยการสังเคราะห์ต่ำกว่าร้อยละ 25-40 กรณีของเชื้อ *A. xylinum* พบว่าในสภาพที่ไม่มีอากาศ ไม่สามารถสังเคราะห์เซลลูโลสได้เลย การสังเคราะห์เกิดขึ้นได้ต่อเมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนมีเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์เท่านั้น

Guzman และคณะ (1982) รายงานว่าปริมาณอากาศมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส โดยได้ศึกษาการผลิตของเชื้อ *A. xylinum* ในการศึกษาใช้กระบวนการหมัก 2 แบบ คือ แบบอยู่กับที่ให้เกิดแบคทีเรียเซลลูโลสขึ้นเองที่ผิวหน้าของอาหารเหลวเปรียบเทียบการหมักที่มีการให้อากาศ และมีการกวนตลอดเวลา (submerged culture) ในถังหมักขนาด 1 ลิตร อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.25 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ปริมาณแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้ร้อยละ 22.47 และ 71.52 ตามลำดับ

Ebner (1982) พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. มีเอนไซม์อไพเรส (aprayrase) ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพลังงาน ATP (ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานและมีการสะสมในระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก) ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เหลือพลังงาน ATP สำหรับกิจกรรมของเมแทบอลิซึมอื่นๆ ของเซลล์ในระดับต่ำ ดังนั้นเมื่องดให้พลังงาน ATP ในแหล่งเก็บพลังงานหรือ ATP pool สูญเสียไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

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

ปริมาณอากาศมีส่วนสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียสังเคราะห์เซลลูโลสเพิ่มขึ้น ทำให้การแผ่กระจายของอากาศลดลง เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เซลลูโลสลดลง เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น Kouda *et al* ., (1997) ได้ศึกษาการส่งผ่านออกซิเจน (oxygen transfer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเชื้อ *A. xylinum* BPR2001 เพื่อผลิตเซลลูโลส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืดสูงทำให้อัตราการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนลดลง เป็นผลให้ก๊าซออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นตัวจำกัดปริมาณก๊าซออกซิเจนที่มีอยู่ด้วย ชนิดของใบกวนในถังหมักแบบ Maxblen และ Gate with turbine ช่วยเพิ่มการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนได้สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากใบกวนช่วยเพิ่มฟองอากาศในอาหารเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อและช่วยเพิ่มผิวสัมผัสระหว่างฟองอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ค่า K_La สูงขึ้นและนอกจากนี้ Kouda *et al* ., (1997) ยังพบว่าการเติม partial pressure ของก๊าซออกซิเจนในถังหมัก แบคทีเรียสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงขึ้นและลดพลังงานในการกวน

2.5.5 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Ohara และคณะ (1992) รายงานว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมัก แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 4.0-4.5 และค่าความเป็นกรดด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหาร รวมถึงการยอมให้สารอาหารผ่านผนังเซลล์

Alban (1962) ได้ศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* พบว่าค่าพีเอช 4.0-5.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส พีเอช 3.0 ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อลดลงและค่าพีเอชมากกว่า 8.0 เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ การเติมกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 1-10 ลงในน้ำมะพร้าวนอกจากเป็นการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ได้ เมื่อเติมกรดอะซิติกร้อยละ1 และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดเป็นร้อยละ 2 จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *Pennicilium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้ และมีรายงานว่ากรดอะซิติกที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีค่าพีเอชประมาณ 4.0-5.0 เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. xylinum* มีผลโดยตรงต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โปรโตพลาสซึม และการแบ่งเซลล์ของเชื้อ *A. xylinum* และเชื้อจุลินทรีย์ยังสามารถนำกรดอะซิติกมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้อีกด้วย (Naritomi *et al* ., 1998)

Mosaoka และคณะ (1993) รายงานว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องมีการควบคุมก่อนการหมักเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. และยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ไม่สามารถทนต่อการเป็นกรดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์

จากคุณสมบัติที่โดดเด่นของเซลลูโลสจากแบคทีเรียคือ เส้นใยมีขนาดเล็กเชื่อมกันเป็นร่างแหทำให้มีความเหนียวสูง ดังนั้นจึงได้มีการนำมาดัดแปลงใช้เป็นส่วนประกอบของเมมเบรนต่าง ๆ เช่น เป็นส่วนประกอบของลำโพง และกระดาษที่ต้องการความเหนียวสูง

ในอุตสาหกรรมเครื่องเสียง บริษัทโซนี่ ได้ใช้เซลลูโลสในการผลิตหูฟังคุณภาพเยี่ยมที่เรียกว่า "ไบโอเซลลูโลส" เนื่องจากเส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีลักษณะละเอียดและแข็งแรง สามารถคงรูปร่างอยู่ได้แม้ถูกหล่อและสามารถถ่ายทอดเสียงได้เร็วพอๆ กับอะลูมิเนียม โดยให้เสียงก้องเพียงเล็กน้อย เมื่อบริษัทเริ่มผลิตหูฟังในปี พ.ศ. 2532 หูฟังนี้มีราคาสูงถึงคู่ละ 2,500 ปอนด์ (หนึ่งแสนบาท) แต่ในปัจจุบันด้วยกรรมวิธีการหมักที่พัฒนาขึ้น ทำให้โซนี่สามารถขายสินค้านี้ได้ในราคาเพียงคู่ละ 200 ปอนด์ (แปดพันบาท) เท่านั้น (http://oho.ipst.ac.th/bookroom/snet4/feb18/cellulos.htm)

ในทางการแพทย์ได้มีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาพัฒนาใช้เป็นผิวหนังเทียมและวัสดุปิดแผล เช่น เซลลูโลสที่ได้จาก *Acetobacter xylinum* เพราะว่ามีคุณสมบัติที่ไม่แนบติดอยู่กับบาดแผล สามารถปรับเปลี่ยนรูปร่างได้ง่าย ทั้งยังมีลักษณะโปร่งใส มีความเหนียวแม้ในสภาพเปียก และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ทำให้บรรดาแพทย์ในสหรัฐอเมริกาสนใจทดลองใช้เซลลูโลสในการตกแต่งบาดแผล

จากการวิจัยพบว่านอกจากวุ้นมะพร้าวจะใช้บริโภคโดยการเชื่อมและแปรรูปต่างๆ แล้ว วุ้นมะพร้าวยังมีประโยชน์อีกมากมาย ดังต่อไปนี้ (http://rescom2006.trf.or.th/display/show_colum_print.php?id_colum=1268)

- ใช้ทำกาว
- ใช้ในอุตสาหกรรมการพิมพ์ เช่น ทำกระดาษชนิดคุณภาพพิเศษ ช่วยลดฝุ่นจากกระดาษพิมพ์ ผิวกระดาษมีความเหนียวและแข็งขึ้น
- นำไปใช้ในงานหัตถกรรม เช่น ดอกไม้ประดิษฐ์ ฯลฯ
- ใช้ผสมน้ำยาฉีดพ่นพืชผักผลไม้ ช่วยให้ตัวยาติดกับต้นพืชได้ดี สามารถย่อยสลายได้
- ใช้ผสมกับเครื่องสำอางชนิดสเปรย์เพื่อให้เครื่องสำอางติดผิวได้ดีขึ้น
- ใช้ทำกระดาษกรองชนิดต่างๆ
- ใช้ทำพลาสเตอร์สำหรับปิดแผลในช่องปาก
- ใช้ผสมกับวัสดุทำผลิตภัณฑ์เซรามิค
- นำมาทำแผ่นวัสดุเหนียวลักษณะคล้ายหนัง
- ทำวัสดุทนไฟ
- ใช้ทำเป็นฟิล์มเคลือบผักผลไม้ ทำให้ลดการสูญเสียน้ำ และเก็บไว้ได้นาน
- ใช้ประกอบอาหารคาวหวานต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.7 กระดาษจากเซลลูโลส (นิโลบล, 2545)

การศึกษาวิจัย บีซี เพื่อใช้การผลิตกระดาษคุณภาพพิเศษ เริ่มมีรายงานการพัฒนางานวิจัยนี้ในปี 2532 โดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่น เยอรมันและสหรัฐอเมริกา งานวิจัยเหล่านี้เกิดขึ้น เพื่อพัฒนาวิธีการผลิตเยื่อกระดาษด้วยวัตถุดิบประเภทแปลกและใหม่ ซึ่งจะนำไปสู่การลด ปริมาณการใช้ การตัดการทำลายทรัพยากรป่าไม้ใหญ่ๆบนพื้นโลกลงได้ BC คือเซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial Cellulose) สร้างจากแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* บางสายพันธุ์ เช่น ไซลินัม (*A. xylinum*), ปาสเทนเรียนัส (*A. pastenrianus*) และสายพันธุ์ใหม่ที่มีชื่อว่า Cellulon BC นี้เดิมรู้จักกันในชื่อว่าแบคทีเรียในน้ำส้มสายชู (Vinegar Plant) เซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้สร้างสารประกอบเซลลูโลสเป็นสายยาวประมาณครั้งละ 12-70 โมเลกุล สายเซลลูโลสนี้ออกมาจากช่องเปิด (Pores) ที่ เรียงกันอยู่เป็นแถว ๆ บนผนังเซลล์แบคทีเรีย มีระยะห่างช่องเปิดประมาณ 10 นาโนเมตร สายเซลลูโลสที่พ่นออกมาจะลงไปอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื่อมต่อกับสารเซลลูโลสอันอื่น ๆ ด้วยพันธะไฮโดรเจน (H-Bond) เมื่อเกิดขบวนการทางชีวภาพที่บริเวณผิวเซลล์แล้วจะได้เส้นใยขนาดเล็ก คือไฟบริล (Fibril) ไฟบริลนี้มีคุณภาพเหนือกว่าไฟบริลของพืช มีขนาด 0.01 ไมครอน เล็กกว่าเส้นใยของไม้และพืชชนิดอื่นถึง 30 เท่า มีคุณสมบัติอุ้มน้ำไว้ได้มากกว่าพืชอื่นๆ และมีลักษณะประสานกันคล้ายร่างแห ได้มีการนำไปทดลองสร้างเป็นแผ่นกระดาษที่คาดว่าจะมี คุณสมบัติกันเสียงก้องสะท้อน (Acoustic Diaphram) เพื่อใช้กับอุตสาหกรรมผลิตอุปกรณ์เครื่องเสียง เป็นต้น

วุ้นมะพร้าวเป็นแหล่งเซลลูโลสชั้นดีสามารถนำมาทำกระดาษคุณภาพพิเศษ เช่น กระดาษพาร์ชเมนท์ ที่มีคุณสมบัติป้องกันน้ำมันหรือไขมันรั่วซึมได้เป็นเวลานาน ทั้งยังมีค่าต้านทานแรงดึงดูดสูงเมื่อเปียกน้ำ ทึบแต่โปร่งแสง ซ้ำยังสามารถป้องกันอากาศผ่านเข้าออกได้อีกด้วย

นักวิจัยได้เริ่มศึกษามาตั้งแต่ปี 2540 จนได้กรรมวิธีในการผลิตกระดาษพาร์ชเมนท์จากวุ้นมะพร้าว เส้นใยที่ได้มีลักษณะเป็นแผ่นคล้ายกระดาษ โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* สามารถนำไปใช้ในงานหัตถกรรม เช่น โคมไฟ โคมเทียนหอม กระดาษทำการ์ดอวยพร นามบัตร และวัสดุตกแต่งอื่นๆ ต่อมายังได้พัฒนาเครื่องมือรวมไปถึงเครื่องอัดรีดน้ำขนาดแรงอัด 10 ตันสำหรับการบีบน้ำออกจากแผ่นเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นบรรจุภัณฑ์

อย่างไรก็ดี ตลาดบรรจุภัณฑ์ มีการแข่งขันที่สูงมาก ในขณะที่บรรจุภัณฑ์จากกระดาษวุ้นมะพร้าวนั้น มีต้นทุนที่สูง ไม่สามารถเข้าไปแย่งส่วนแบ่งในตลาดบรรจุภัณฑ์ที่มีอยู่ก่อนแล้ว จึงต้องหันไปในส่วนของหัตถกรรม โดยการพัฒนาต่อยอดไปเรื่อยๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
104397

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yamanaka และคณะ (1989) ได้ศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของกระดาษที่ได้จากแบคทีเรียเซลลูโลส โดยใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* พบว่าการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแผ่นเซลลูโลสในอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้ น้ำตาลซูโครส 50 กรัม ยีสต์สกัด 50 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่าง5.0 เลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษพบว่ากระดาษที่ได้มีค่า Young's Modulus สูงกว่า 15 GPa ซึ่งแสดงว่าโมเลกุลเซลลูโลสจับตัวกันแน่นมาก ทำให้กระดาษที่ได้มีความแข็งแรงใกล้เคียงสารในกลุ่มโพลิเมอร์

นิโลบล (2545) ได้ศึกษาการผลิตกระดาษคุณภาพพิเศษด้วยแบคทีเรียเซลลูโลสพบว่าเซลลูโลสที่ผลิตได้จากการหมักของแบคทีเรียมีเส้นใยขนาดเล็กมาก มีส่วนประกอบดังนี้ คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 3.00 โปรตีนร้อยละ 0.68 ไขมันร้อยละ 0.50 เถ้าร้อยละ 0.77 น้ำร้อยละ 94.4 และสารจำพวกเกลือแร่ วิตามินเล็กน้อยรวมอยู่ด้วยกัน จนเกิดเป็นแผ่นวุ้นหนานุ่มและกระดาษมีความเหนียวสูงกว่ากระดาษโดยทั่วไปหลายเท่า เช่น มีค่าต้านทานแรงดึงสูงสุดได้ถึง 9.5 กิโลนิวตันเมตรต่อกิโลกรัม

Keshk และคณะ (2005) ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียโดยมี lignosulfonate ผสมอยู่ด้วย พบว่าจากการใช้เชื้อ *Gluconobacter xylinus* (ATCC 10245 ,IFO 13963 ,13772 และ 13773) จากอาหาร Hestrin and Shramm medium (HS) และมี lignosulfonate ผสมในสูตรอาหารนี้ด้วย (HSL) จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดพบว่าเส้นใยที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ จะมีลักษณะการรวมกันอย่างหลวมๆและหยาบ เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยของเชื้อในอาหารสูตรที่เป็นชุดควบคุม(ไม่ผสม lignosulfonate) และพบว่าแผ่นเซลลูโลสที่ผสม lignosulfonate จะมีค่ามอดูลัสของยัง 633.00 Mpa ขณะที่แผ่นเซลลูโลสชุดควบคุมมีค่า 450.76 Mpa และแผ่นเซลลูโลสที่ผสม lignosulfonate มีค่าความหนืดสูงกว่าแผ่นเซลลูโลสที่เป็นชุดควบคุมคือ 76.98 cP และ 36.48 cP จากอาหาร HS medium ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แผ่นเซลลูโลสที่ผสม lignosulfonate จะมีค่า degree of polymerization สูงกว่าแผ่นเซลลูโลสที่เป็นชุดควบคุม

Ochaikul และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกระดาษและสมบัติของกระดาษที่ได้จากเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* TISTR 976 พบว่าจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 วันเชื้อจะผลิตเซลลูโลสสูงสุดจากนั้นนำเซลลูโลสที่ได้มาผลิตกระดาษใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เป็นสารฟอกสีทำให้กระดาษที่ได้มีค่ามอดูลัสของยัง ค่าความแข็งแรงดึง สูงกว่าการใช้ความเข้มข้นอื่น (ร้อยละ 0 ,0.5 และ 1.0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธนุสรา และ สุพัตรา (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำตาลโตนด โดยใช้ *Acetobacter xylinum* TISTR 107 พบว่าจากการใช้น้ำตาลโตนดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมคือ น้ำตาลโตนด 1 ลิตร บริกซ์เริ่มต้น 15 องศาบริกซ์ เติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 7.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.7 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 4.25 หมักที่อุณหภูมิห้อง จะทำให้ได้แผ่นวุ้นหนา 1.15 เซนติเมตร ในเวลา 9 วัน เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า กลิ่นและการยอมรับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวุ้นสวรรค์ที่ได้จากน้ำมะพร้าว แต่สีและลักษณะเนื้อสัมผัสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวุ้นสวรรค์ที่ได้จากน้ำตาลโตนดมีเนื้อสัมผัสดีกว่า การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวุ้นสวรรค์ที่ได้จากน้ำตาลโตนด พบว่ามีโปรตีนร้อยละ 0.13 ไขมันร้อยละ 0.012 เยื่อใยร้อยละ 2.74 เถ้าร้อยละ 0.11 และความชื้นร้อยละ 96.63

Premjet และคณะ (2003) ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Acetobacter* sp ที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในการศึกษานี้ใช้สายพันธุ์ของ *Acetobacter* 14 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหาร 4 ชนิด คือ HS HSM KC และ KCM media อาหาร HSM ซึ่งมีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงกว่าอาหาร HS media 1.65 เท่า และสายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลสได้สูงสุดคือ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหาร HSM เมื่อใช้อาหาร KC ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและลิกโนซัลโฟเนต และอาหาร KCM ที่มีกากน้ำตาลร่วมด้วย พบว่าการใช้อาหาร KCMจะให้ผลผลิตของเซลลูโลสสูงกว่าอาหาร KC ประมาณ 1.75 เท่า โดยเฉพาะใน *Acetobacter xylinum* TISTR 975 แต่เมื่อนำเชื้อเหล่านี้มาเลี้ยงในสภาวะเขย่า ผลผลิต ของเซลลูโลสจะลดลง

Soo-Yeon Kim และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยเชื้อ *Gluconoacetobacter* sp. RKY5 ซึ่งแยกได้จากน้ำส้มสายชู (Persimmon Vinegar) พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อชนิดนี้ คือ การใช้กลีเซอรอล (glycerol) ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ยีสต์สกัด (yeast extract) ความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เติมฟอสเฟตในรูปไดโปแตสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร และเติมกรดอินทรีย์ในรูปกรดอะซิติกความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ทำให้ได้เซลลูโลส 5.63 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงใจสภาวะเขย่าเป็นเวลา 144 ชั่วโมง แต่เมื่อเลี้ยงในสภาวะนิ่งจะให้เซลลูโลส 4.45 กรัมต่อลิตร ปริมาณของเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อชนิดนี้เมื่อเลี้ยงในสภาวะเหมาะสมจะได้เซลลูโลสสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร Hestrin and Shramm (HS medium) ซึ่งเป็นสูตรมาตรฐานในการผลิตเซลลูโลสประมาณ 2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 จุลินทรีย์

3.1.1.1 *Acetobactor xylinum* TISTR 976 เชื้อนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.1.2 *Gluconacetobacter nataicola* แยกได้จากมะละกอในประเทศไทย (เบญจะ และปิยะศักดิ์, 2550)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2.1 อาหารสูตรน้ำมะพร้าว

3.1.2.2 อาหาร GEY (Glucose-Ethanol-Yeast medium)

3.1.2.3 อาหาร HS (Hestrin- Schramm medium)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.3.1 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.1.3.2 ตู้เขี่ยเชื้อ

3.1.3.3 หม้อนึ่งความดันไอ

3.1.3.4 ตู้อบลมร้อน

3.1.3.5 ตู้บ่ม

3.1.3.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.3.7 เครื่องวัดพีเอช

3.1.3.8 เครื่องอัดรีดน้ำ

3.1.3.9 ถาดพลาสติก

3.1.3.10 ปิเปต

3.1.3.11 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.3.12 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976

3.2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

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

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

3.2.1.2 การหมักเซลลูโลส

เตรียมอาหารสูตรเดียวกับอาหารที่ใช้เตรียมหัวเชื้อ (อาหารสูตรน้ำมะพร้าว) แบ่งใส่ ฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ น้ำที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งให้เย็น เติมหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 ร้อยละ10 ของปริมาตร อาหาร (20 มิลลิลิตร/ฟลาสก์) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 12 วัน จะได้เซลลูโลสจาก แบคทีเรียหรือวุ้นมะพร้าว เก็บตัวอย่างในวันที่ 3 5 7 9 และ 12 ของการหมัก นำแผ่นเซลลูโลสมาวัด ความหนาโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์และผลผลิตเซลลูโลสโดยการหาน้ำหนักแห้ง รวมทั้งวัดค่า ความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก

3.2.1.3 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์เซลลูโลสที่ได้

นำแผ่นเซลลูโลสที่ผลิตได้ล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้สะเด็ดน้ำ นำมาวัดความหนาโดยวัดที่จุดต่างๆกัน 10 จุดใน 1 แผ่นเซลลูโลส หาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสมาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรียออกจากแผ่นเซลลูโลส ล้างด้วยน้ำหลายๆครั้งจนสะอาด นำไปอบ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน จนแห้งสนิท นำมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งให้เย็น จากนั้น นำมาชั่งน้ำหนักแผ่นเซลลูโลสที่ได้ ซึ่งจะเป็นค่าของผลผลิตเซลลูโลส รายงานผลเป็นน้ำหนักแผ่น เซลลูโลสที่ได้ (กรัม) ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (มิลลิลิตร)

$$\text{ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อ100 มิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักแผ่นเซลลูโลสที่ได้ (กรัม)}}{\text{ปริมาณอาหารที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *G. nataicola*

3.2.2.1 แหล่งคาร์บอน

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

3.2.2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจน

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

3.2.2.3 ศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

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

3.2.2.4 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยแปรผันความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 โดยนำน้ำมะพร้าวแก่กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุ่นให้ละลาย เติมกรดอะซิติกในปริมาณต่างๆ เพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 จากนั้นนำไปใส่ ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็น ถ่ายเชื้อ *G. nataicola* ลงไปร้อยละ 10 เขย่าให้เข้ากัน บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลลูโลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ และวัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก

3.2.2.5 การเติมเอทานอล

โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลดังนี้ ร้อยละ 1 3 5 7 และ9 ของปริมาตรอาหาร โดยนำน้ำมะพร้าวแก่กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 อุ่นให้ละลาย เติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 และเติมเอทานอลในความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำไปใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้เย็นถ่ายเชื้อ *G. nataicola* ลงไปร้อยละ 10 เขย่าให้เข้ากัน บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลลูโลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ และวัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก

3.2.3 ศึกษาผลผลิตของเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของสภาวะต่างๆจากการทดลองในข้างต้น เลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวเป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับผลผลิตของเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum*

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของดันแคน โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.2.4 การผลิตกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *G.nataicola*

เลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด แช่แผ่นเซลลูโลสในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปิดฝาภาชนะทิ้งไว้ 1 คืน เป็นการปรับแผ่นเซลลูโลสให้เป็นกลาง นำแผ่นเซลลูโลสต้มในน้ำเดือด 30 นาที เพื่อไล่แอมโมเนียออก นำเข้าเครื่องอัดรีดน้ำ อบให้แห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปฟอกสีโดยต้มในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 นาน 30 นาที ล้างน้ำให้สะอาด นำเข้าเครื่องอัดรีดน้ำ ขึงตึงด้วยกรอบยึด อบในตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จะได้กระดาษจากเซลลูโลสหรือ กระดาษวุ้นมะพร้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การนำกระดาษจากเซลลูโลสมาประยุกต์

3.2.5.1 แผ่นกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

ชุดที่หนึ่ง อาหารที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลส

ชุดที่สอง อาหารที่ไม่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลส และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ชุดที่สาม อาหารที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Millipore paper ที่มีขนาด pore size 0.45 ไมครอน

ชุดที่สี่ อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสี่ชุดการทดลอง วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลทุกวัน โดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.2.5.2 แผ่นกรองน้ำมันหอมระเหย

นำกระดาษกรองที่ได้มากรองน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากลาเวนเดอร์ ตัดกระดาษกรองให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร นำมาวางบนกรวยแก้วและใช้กรองน้ำมันหอมระเหย วัดปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่ผ่านการกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

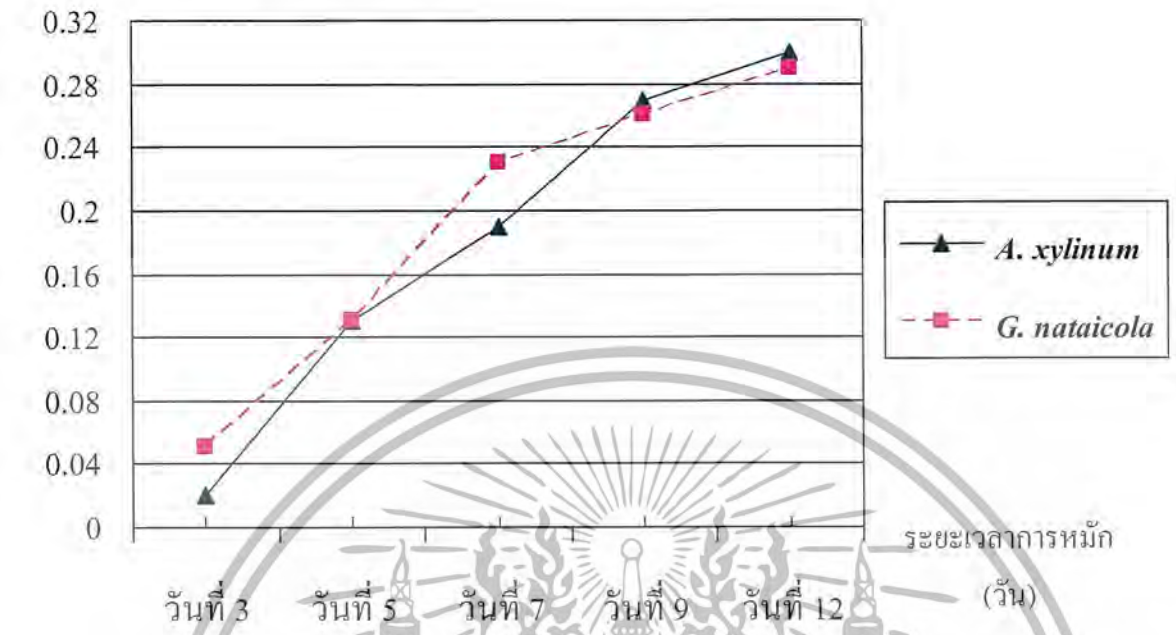
4.1 ศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976

จากการเลี้ยงเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* และ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 12 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างเซลลูโลสจากแบคทีเรียหรือวุ้นมะพร้าวในวันที่ 3 5 7 9 และ12 ของการหมัก โดยทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก วัดความหนาของแผ่นเซลลูโลส และผลผลิตเซลลูโลส โดยคำนวณจากน้ำหนักแห้งต่ออาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่าระยะเวลาการเจริญที่มีอัตราการสร้างเซลลูโลสสูงสุดของเชื้อ *G. nataicola* อยู่ในช่วง 5-7 วันของการหมัก โดยให้ผลผลิตเซลลูโลสอยู่ในช่วง 0.13-0.23 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หลังวันที่ 7 ของการหมักอัตราการสร้างเซลลูโลสต่ำลง สำหรับเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 มีอัตราการสร้างเซลลูโลสสูงสุดในช่วง 7-9 วัน โดยได้ผลผลิตเซลลูโลสอยู่ในช่วง 0.19-0.27 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มผลผลิตเซลลูโลสลดลง แสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อทั้งสองแตกต่างกัน โดยพบว่าเซลลูโลสที่ได้จากการหมักของเชื้อ *G. nataicola* จะมีลักษณะบวมน้ำ ผิวเรียบไม่สม่ำเสมอ สำหรับเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ผิวเรียบสม่ำเสมอ ไม่บวมน้ำ

ตารางที่ 4.1 แสดงผลผลิตเซลลูโลส ความหนา และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 และเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* ในการหมักที่สภาวะนิ่งอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงผลผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 และเชื้อ *Gluconacetobacter nataicola* ในการหมักที่สภาวะนิ่งอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 วัน

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *G. nataicola*

4.2.1 แหล่งคาร์บอน

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว โดยใช้แหล่งคาร์บอน 4 ชนิดเปรียบเทียบกันคือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลแมนนิทอล โดยเติมความเข้มข้นร้อยละ 5 บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำเก็บตัวอย่างแผ่นเซลลูโลสโดยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก วัดความหนาของแผ่นเซลลูโลส หาน้ำหนักแห้งและนำมาคำนวณหาผลผลิตเซลลูโลสต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร พบว่าในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดโดยแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีความหนาเท่ากับ 0.91 เซนติเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.09 และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.31 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร รองลงมาเป็นน้ำตาลกลูโคส แสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 จากการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด อาจเนื่องมาจาก *G. nataicola* ที่นำมาใช้ในการทดลองสามารถออกซิไดซ์น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และแมนนิทอล ขณะที่เชื้อ *A. xylinum* ที่นำมาใช้ผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลส ส่วนใหญ่จะออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสและได้กลูโคเนท (gluconate) (De Lay *et al* ., 1984) มีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารลดลงมาก การเจริญของเชื้อและผลผลิตเซลลูโลสจะลดลงตามไปด้วย จากการทดลองของ Akira และคณะ (1997) พบว่า จากการใช้เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสที่แยกได้จากแหล่งต่างๆและให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงมาทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนสองชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส พบว่า เชื้อต่างๆที่แยกได้สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส โดยจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าและค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงน้อยกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ได้

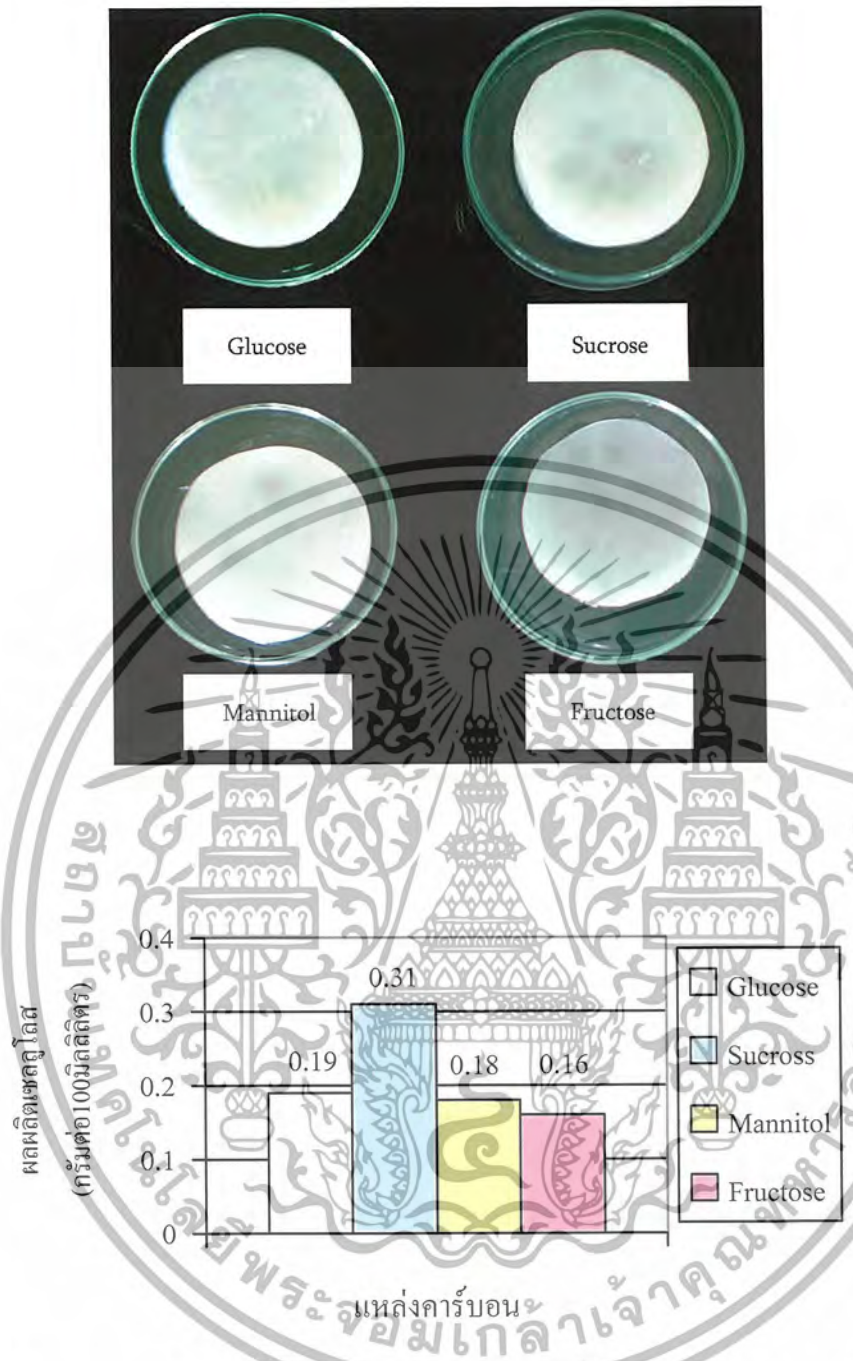
ตารางที่ 4.2 ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ความหนาของแผ่นเซลลูโลส และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการหมัก 7 วัน

แหล่งคาร์บอน	เชื้อ *Gluconacetobacter nataicola*		
	ผลผลิตเซลลูโลส[1] (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- Glucose	0.19[b(2)]	0.71	2.97
- Sucrose	0.31[a]	0.91	3.09
- Mannitol	0.18[b]	0.65	3.37
- Fructose	0.16[b]	0.82	3.37

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลสภายหลังการหมัก 7 วัน

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลลูโลสจากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลฟรุคโตสไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 แหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวโดยใช้แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดเปรียบเทียบกันคือ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) โดยเติมความเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำเก็บตัวอย่างแผ่นเซลลูโลสโดยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก วัดความหนาของแผ่นเซลลูโลส และคำนวณหาผลผลิตเซลลูโลสต่ออาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่าในการใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด โดยแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีความหนาเท่ากับ 0.63 เซนติเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.47 และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.39 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร รองลงมาเป็นเปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟตและยีสต์สกัด ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

จากการใช้น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor, CSL) เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ซึ่งผลการทดลองจะสอดคล้องกับการทดลองของ Matsuoka *et al* ., (1993) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในน้ำแช่ข้าวโพดมีแลคเตท (lactate) เป็นส่วนประกอบ จึงมีผลทำให้การเจริญและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter xylinum* เพิ่มสูงขึ้น

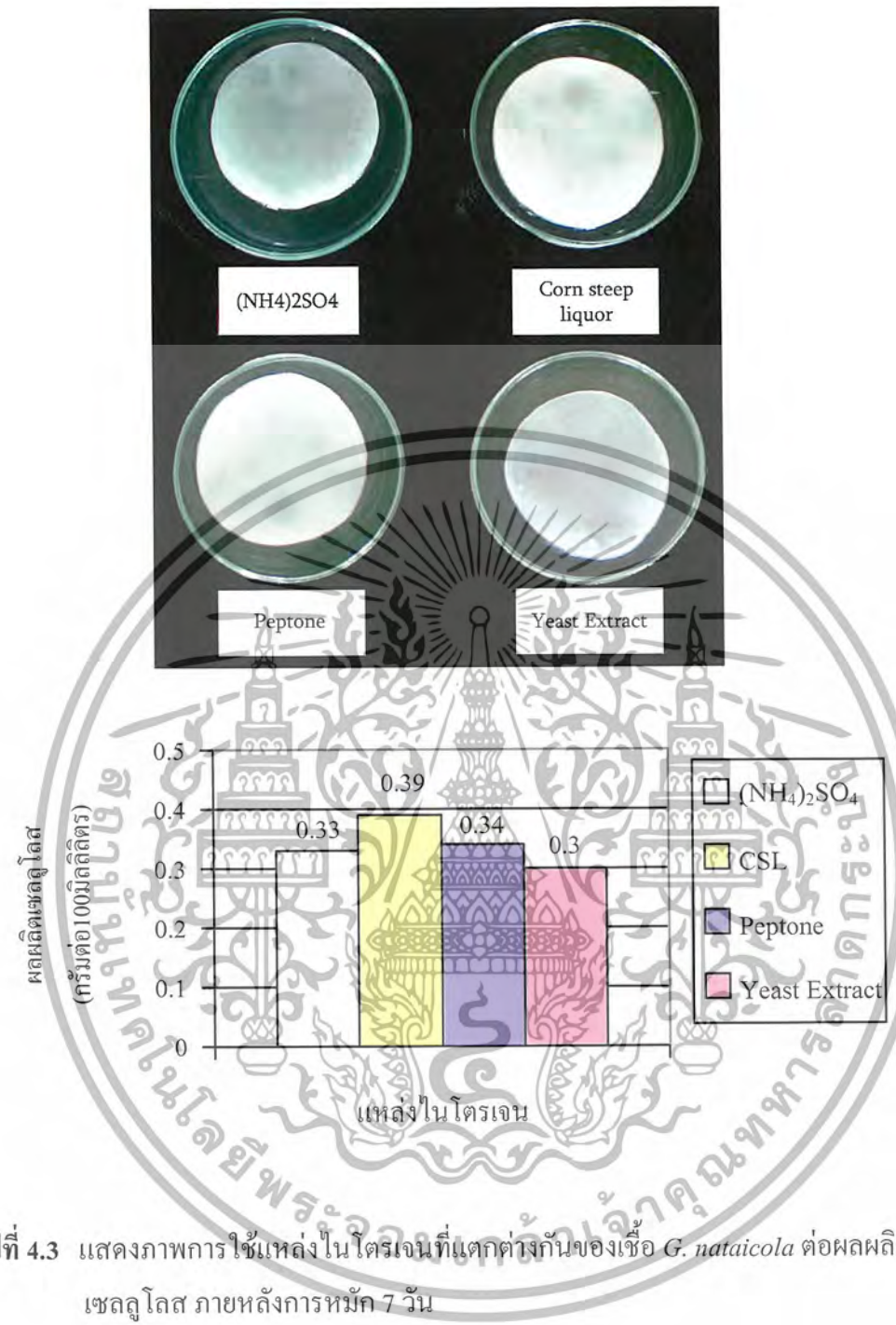
ตารางที่ 4.3 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ความหนาของแผ่นเซลลูโลส และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการหมัก 7 วัน

แหล่งไนโตรเจน	เชื้อ *Gluconacetobacter nataicola*		
	ผลผลิตเซลลูโลส[1] (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- $(NH_4)_2SO_4$	0.33 [b(2)]	0.65	3.10
- Corn steep liquor	0.39 [a]	0.63	3.47
- Peptone	0.34 [b]	0.62	3.19
- Yeast Extract	0.30 [c]	0.57	3.18

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงภาพการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลลูโลสจากแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นน้ำแช่ข้าวโพดให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และมีความแตกต่างทางสถิติ($P \leq 0.05$) กับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน และยีสต์สกัด แสดงดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวโดยแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อดังนี้ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลลูโลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ วัดความหนาและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด โดยแผ่นเซลลูโลสมีความหนาเท่ากับ 0.94 เซนติเมตรค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.08 และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.22 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร รองลงมาเป็นที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4

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

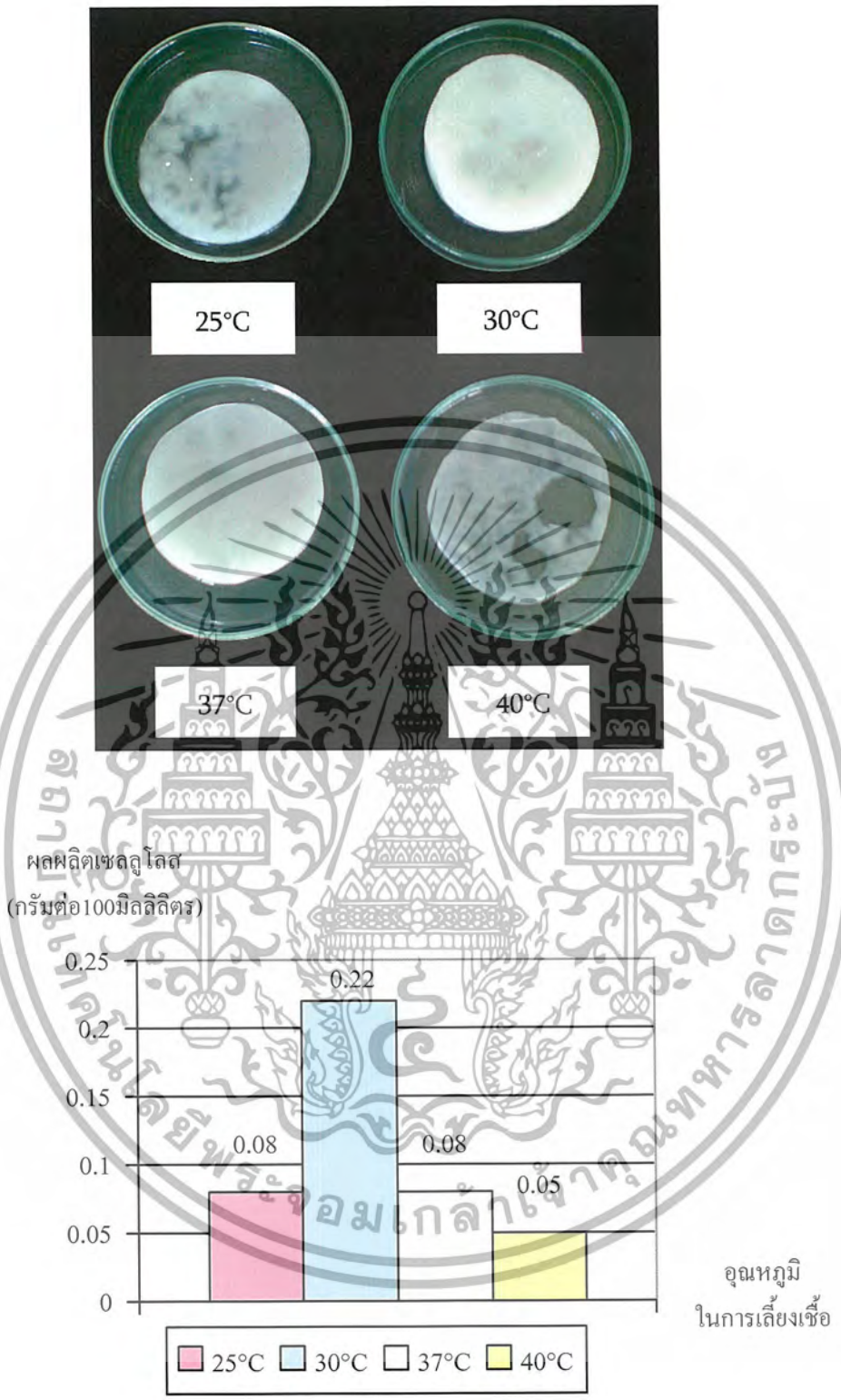
ตารางที่ 4.4 ผลของการใช้อุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ความหนาของแผ่นเซลลูโลส และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการหมัก 7 วัน

อุณหภูมิ	เชื้อ *Gluconacetobacter nataicola*		
	ผลผลิตเซลลูโลส[1] (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 25°C	0.08 [b(2)]	0.43	3.28
- 30°C	0.22 [a]	0.94	3.08
- 37°C	0.08 [b]	0.57	3.11
- 40°C	0.05 [c]	0.33	3.38

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลลูโลสที่อุณหภูมิต่างๆ มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ในการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 37 และ 40 องศาเซลเซียส

4.2.4 ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH)

ในการศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ6.0 ทำการบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดจึงทำการเก็บตัวอย่างเซลลูโลสมาวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ วัดความหนาและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.5 และ 6.0 ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงใกล้เคียงกัน โดยให้แผ่นเซลลูโลสที่มีความหนาเท่ากับ 0.80 0.52 และ 0.52 เซนติเมตรตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมักเท่ากับ 3.21 3.54 และ 3.73 ตามลำดับ และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.26 0.24 และ 0.25 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตรตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.5 โดยทั่วไปค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสอยู่ในช่วง 4-7 ส่วนใหญ่จะใช้ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5–6 (Pourramezan *et al*., 2009)

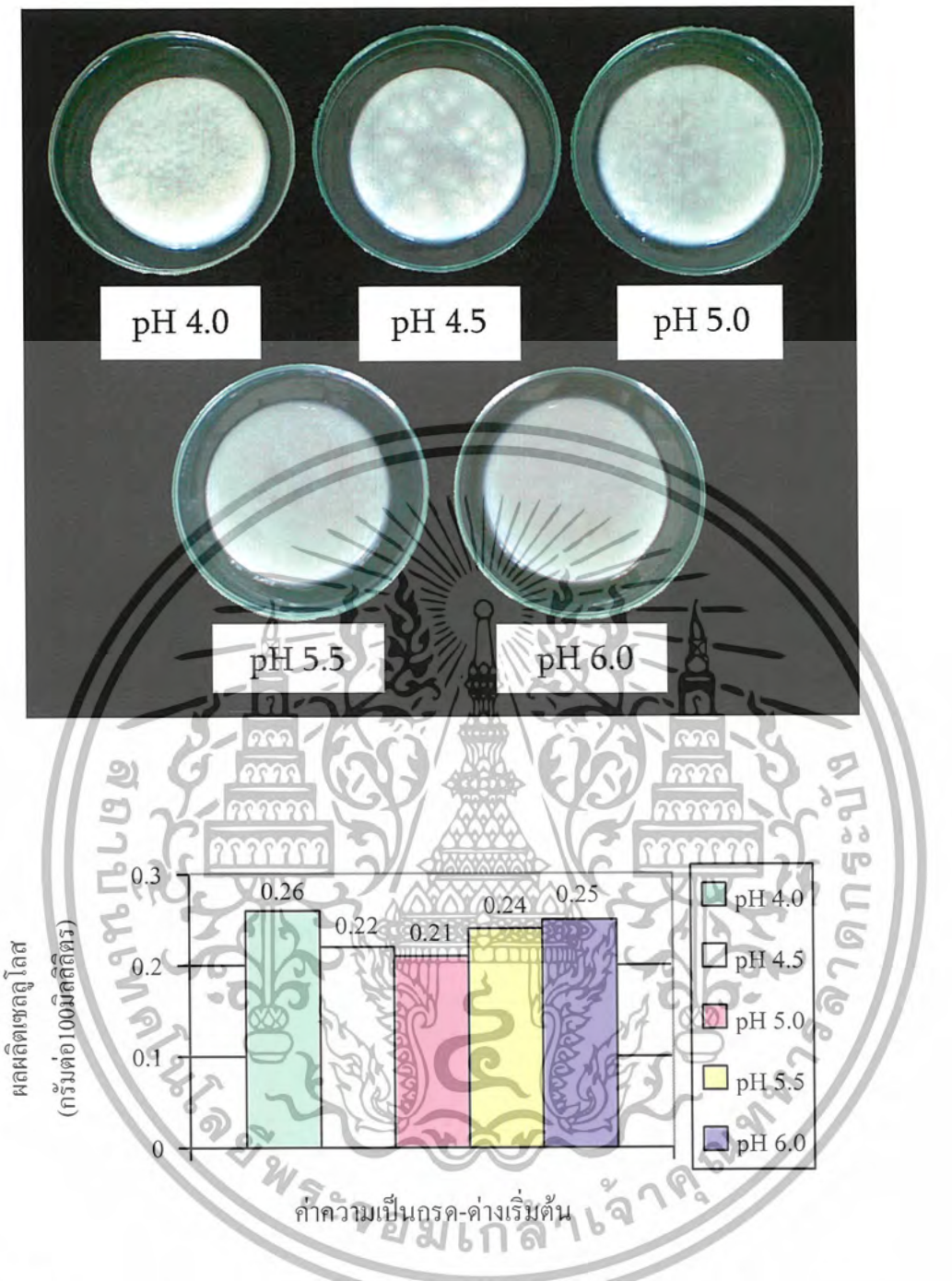
ตารางที่ 4.5 ผลของการใช้ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ความหนาของแผ่นเซลลูโลส และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการหมัก 7 วัน

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	เชื้อ *Gluconacetobacter nataicola*		
	ผลผลิตเซลลูโลส[1] (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- pH 4.0	0.26[a(2)]	0.80	3.21
- pH 4.5	0.22[b]	0.56	3.27
- pH 5.0	0.21[b]	0.49	3.53
- pH 5.5	0.24[ab]	0.52	3.54
- pH 6.0	0.25[ab]	0.52	3.73

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงผลของการใช้ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลลูโลสในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ในการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 ซึ่งให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด ไม่มีความแตกต่างกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 และ 6.0 แสดงดังตารางที่ 4.5 ในการทดลองนี้จึงเลือกการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเป็น 5.5 เนื่องจากให้ผลผลิตเซลลูโลสใกล้เคียงกับการใช้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้กรดในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เนื่องจากอาหารสูตรน้ำมะพร้าวมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5

4.2.5 ศึกษาการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดลองเติมเอทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลดังนี้ ร้อยละ 1 3 5 7 และ9 ของปริมาตรอาหาร บ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลลูโลสวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ วัดความหนาและวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเอทานอลร้อยละ 1 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด โดยให้แผ่นเซลลูโลสที่มีความหนาเท่ากับ 0.75 เซนติเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมักเท่ากับ 3.08 และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.15 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร รองลงมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเอทานอลร้อยละ 3 และร้อยละ 5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.6 ซึ่งการเติมกรดอินทรีย์บางชนิดรวมทั้งเอทานอลจะส่งเสริมการผลิตเซลลูโลสให้สูงขึ้น (Soo – Yeon Kim *et al* ., 2006) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Son *et al* ., (2001) ซึ่งพบว่าการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักของเชื้อ *Acetobacter* sp.A9 ทำให้ผลผลิตของเซลลูโลสเพิ่มสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

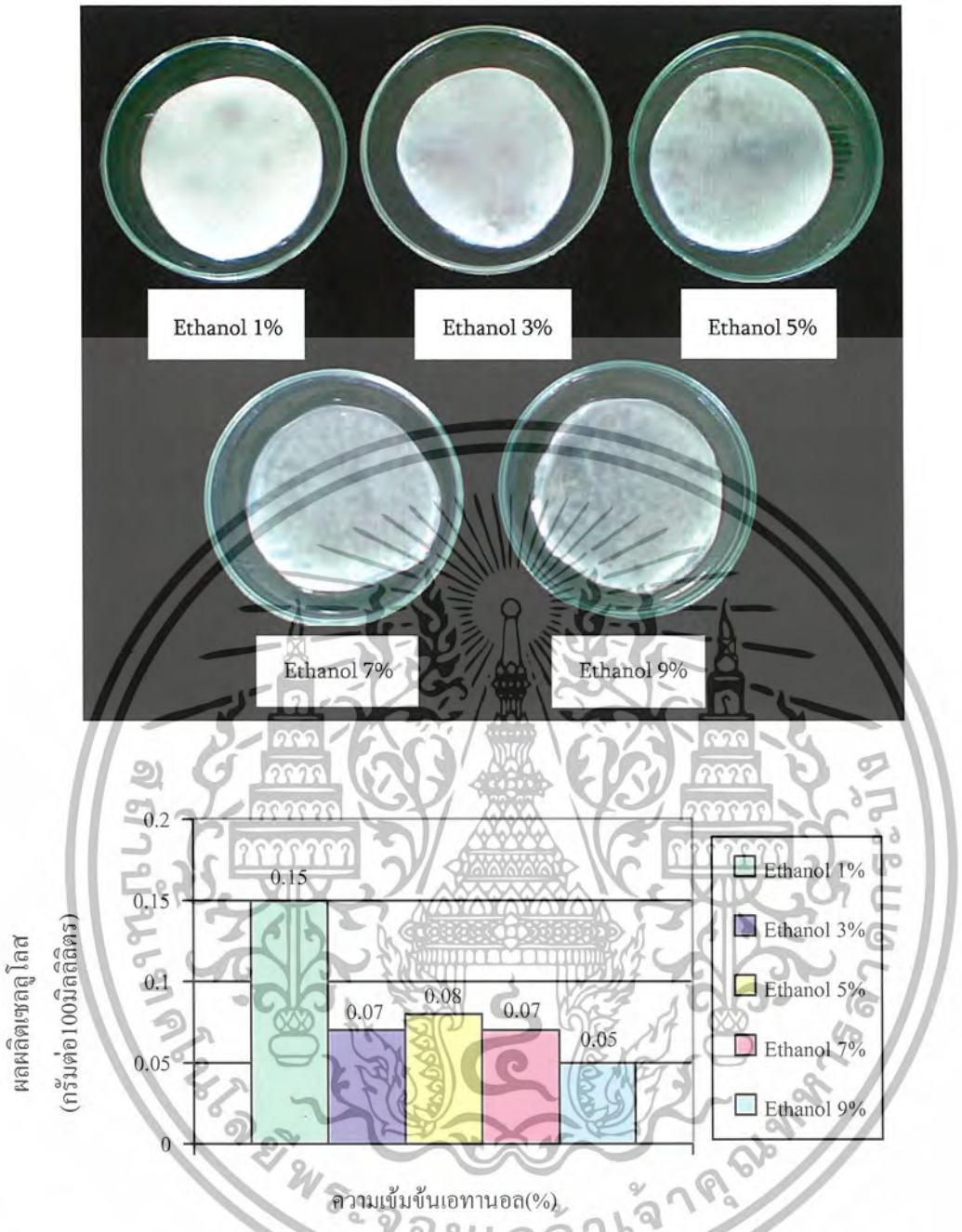
ตารางที่ 4.6 ผลของการใช้ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ความหนาของแผ่นเซลลูโลส และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการหมัก 7 วัน

Ethanol	เชื้อ *Gluconacetobacter nataicola*		
	ผลผลิตเซลลูโลส[1] (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- Ethanol 1%	0.15 [a(2)]	0.75	3.08
- Ethanol 3%	0.07 [b]	0.44	3.20
- Ethanol 5%	0.08 [b]	0.43	3.17
- Ethanol 7%	0.07 [bc]	0.37	3.24
- Ethanol 9%	0.05 [c]	0.38	3.32

(1) ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงผลของการใช้ความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันของเชื้อ *G. nataicola* ต่อผลผลิตเซลลูโลส ภายหลังการหมัก 7 วัน

เมื่อนำผลของผลผลิตเซลลูโลสในอาหารที่มีการเติมเอทานอลในความเข้มข้นที่แตกต่างกันมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมเอทานอลร้อยละ 1 ให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการเติมเอทานอลในความเข้มข้นอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของการเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในสภาวะที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *G. nataicola* ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 4.2 โดยใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว และใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิในการเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 โดยใช้กรดอะซิติกเป็นตัวปรับความเป็นกรด-ด่าง และเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1 เลี้ยงในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเก็บตัวอย่างเซลลูโลสวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ วัดความหนา และวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก พบว่าแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีความหนาเท่ากับ 0.95 เซนติเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมักเท่ากับ 4.93 และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.42 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

และได้ทำการเลี้ยงเปรียบเทียบกับเชื้อ *A. xylinum* TISTR 976 ในสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อชนิดนี้ คือใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิในการเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 โดยใช้กรดอะซิติกเป็นตัวปรับความเป็นกรด-ด่าง เลี้ยงในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 7 วัน พบว่าแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีความหนาเท่ากับ 0.97 เซนติเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมักเท่ากับ 4.81 และมีผลผลิตเซลลูโลสเท่ากับ 0.65 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.7 ซึ่งการทดลองในหัวข้อนี้จะเห็นได้ว่าผลผลิตของเซลลูโลสที่ได้จากการเลี้ยง *G. nataicola* ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้นมีค่าต่ำกว่าเชื้อ *A. xylinum* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความไม่คงตัวของสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองและปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการเตรียมหัวเชื้อ (starter) น้อยเกินไป ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตเซลลูโลสน้อยกว่าที่ควรจะเป็น

ตารางที่ 4.7 แสดงผลผลิตเซลลูโลส ความหนา และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ของเชื้อ *G. nataicola* และเชื้อ *A. xylinum* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในสภาวะที่เหมาะสม

เชื้อ	ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	ความหนา (เซนติเมตร)	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
G. nataicola	0.42	0.95	4.93
A. xylinum	0.65	0.97	4.81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การผลิตกระดาษเซลลูโลสที่ได้จากเชื้อ *G. nataicola*

ในการศึกษาการผลิตกระดาษโดยเลี้ยงเชื้อ *G. nataicola* ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น เลี้ยงในสภาพนิ่งที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสมาผลิตกระดาษตามวิธีของ Ochaikul *et al* ., (2008) จากการทดลองพบว่า เมื่อนำเชื้อ *G. nataicola* มาเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น คือ ใช้อาหารสูตรน้ำมะพร้าว เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 ใช้น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.5 เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) เป็นเวลา 7 วัน เซลลูโลสที่ได้จากการหมักโดยเชื้อ *G. nataicola* มีความหนา คือ 0.87 เซนติเมตร(แผ่นเปียก) เมื่อนำมาผลิตกระดาษ ทำให้กระดาษที่ได้มีความหนา 0.02 เซนติเมตร (แผ่นแห้ง)

4.5 ผลจากการนำกระดาษเซลลูโลสที่ได้มาประยุกต์ใช้

4.5.1 แผ่นกรองอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

4.5.2 แผ่นกรองน้ำมันหอมระเหย

พบว่าไม่สามารถกรองน้ำมันหอมระเหยได้เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่5
สรุปผลและวิจารณ์การทดลอง

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

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

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

ข้อเสนอแนะ

1. กระดาษเซลลูโลสที่ผลิตได้ควรนำมาประยุกต์ใช้ เป็นกระถางต้นไม้ เพื่อรักษาความชุ่มชื้นให้กับดิน และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ
2. ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ ควรเพิ่มขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อให้มากขึ้นกว่าเดิม ก่อนที่จะนำมาใช้เตรียมหัวเชื้อ (starter) เพื่อให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นีโลบล สุวรรณภินันท์. 2545. กระดาษ parchment ชนิดใหม่จากวุ้นมะพร้าว เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร "เทคนิควิธีการผลิตกระดาษด้วยวุ้นมะพร้าวและนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ" 20-23 พฤษภาคม 2545.

ธนุสรา เหล่าเจริญสุข และสุพัตรา แก้วทะโร. 2548. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำตาลโตนดโดยใช้ *Acetobactor xylinum* TTSTR 107 ; ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27(6) : ซ 1253 – 1261

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

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

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

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

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

Johnson, D.C. 1990. Pulp & paper. May : 105-107.

Keshk, S., Fujiwara, S., Sameshima, K. 2006. Properties of Bacterial Cellulose Sheets Produced In Presence of Lignosulfonate, Enzyme and Microbial Technology. 40:9–12

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

Krusong, W. and Yoshida, T. 1995. Counteraction of negative effect on cellulose formation in microaerophilic carrier. In annual Report International Conference Biotechnology, Japan. Pp. 155-200.

Lapuz, M.M., Gallardo, E.G. and Palo, M.A. 1967. The nata organism-cultural requirements characteristics and identify. Philippines. J. Science. 96 : 91-109.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaga, F. 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. J. Ferment Bioeng. 85(6) : 598-603.

Ochaikul, D., Rukchonlatee, S., Soisant, P., Aramruang S. and Fapratanchai, T. 2004. Paper production and Properties from Bacterial Cellulose *Acetobacter xylinum* TISTR 967. International Conference on Engineering, Applied Sciene, and Technology, Bangkok, Thailand.

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

Pourramezan, G.Z., Roayaei, A.M. and Qezelbash , Q.R. 2009. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2. Biotechnology 8, 150-

Premjet, S., Vorasingha, A., Somsiri, A. , Ohtani, Yand Sameshima, K. 2003. Selection on high cellulose producing strains of *Acetobacter* suitable for use with black strap molasses as a carbon source. Thai. J. Biotechnol. Vol. 4(1) : 34-36.

Premjet, S. 1999. Production of bacterial cellulose from blackstrap molasses by *Acetobacter xylinum* ATCC 10245. Naresuan University Journal 7, 18-32.

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

Soo-Yeon Kim, Jin-Nam Kim, Young-Jung Wee, Don-Hee Park, and Hwa-Won Ryn. 2006. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 isolated from Persimmon Vinegar. Appl. Biochem. Biotechnol 6, 705-715.

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

Czaja, W., Romanovicz, D. and Brown, R.M. 2004. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. Cellulose 11, 403-411.

Yamanaka, S., Watanabe, K. and Kitamura, N. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. J. Mat. Sci. 24 : 3141 – 3145.

Yoshinaga, F., Tonouchi, N. and Watanabe, K. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. Biosci. Biotech. Biochem. 59 : 219-224.

http://202.29.77.139/magazine/tech26.html

http://news.pharmacy.psu.ac.th/index.php?option=com_content&task=view&id=213&Itemid=30

http://news.pharmacy.psu.ac.th/index.php?option=com_content&task=view&id=213&Itemid=30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://oho.ipst.ac.th/bookroom/snet4/feb18/cellulos.htm

http://rescom2006.trf.or.th/display/show_colum_print.php?id_colum=1268

http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/feb18/cellulos.htm

http://www.bangkokbiznews.com/2007/06/04/WW54_5406_news.php?newsid=76836

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

http://www.thainanocellulose.com/

http://www.toryod.com/smejelly_nata_whats.php

http://www.toryod.com/smejelly_nata_whats.php

http://www.vcharkarn.com/vnews/143301

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. อาหาร GEY

น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
เอทานอล 95%	50	มิลลิลิตร
ยีสต์สกัด	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	3	กรัม

นำน้ำตาลกลูโคส ยีสต์สกัด และวุ้น ละลายในน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นใส่แคลเซียมคาร์บอเนต นำไปอุ่นให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตรน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวแก่	1,000	มิลลิลิตร
น้ำตาลทราย	50	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
กรดอะซิติก	10	มิลลิลิตร

นำน้ำมะพร้าวแก่มากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมน้ำตาลทราย แอมโมเนียมซัลเฟต และกรดอะซิติกคนให้เข้ากัน แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Hestrin and Schramm medium (HS)

น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
ยีสต์สกัด	10	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.7	กรัม
กรดซิตริก	1.2	มิลลิลิตร

ทำการผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับ 5 จากนั้นแบ่งใส่หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์หาผลผลิตเซลลูโลส

1. การวิเคราะห์หาผลผลิตเซลลูโลส

1.1 อบกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

1.2 นำเซลลูโลสที่ได้มาวางบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์

1.3 นำเซลลูโลสมาชั่งหาน้ำหนัก และนำมาคำนวณหาน้ำหนักเซลลูโลสแห้งจากสูตร

การคำนวณ

น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง (กรัมต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ)

= น้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลลูโลสหลังอบ - น้ำหนักกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

จากนั้น นำน้ำหนักเซลลูโลสแห้งมาคำนวณผลผลิตเซลลูโลสที่ได้ จากสูตร

$$\text{ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้(กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลลูโลสแห้ง x1000 มิลลิลิตร}}{\text{ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้ข้อมูลแต่ละช่วงการทดลอง ซึ่งเป็นแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มาทำการวิเคราะห์ในโปรแกรม SPSS for Windows version 16.0 โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของดันแคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

dry weight

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.161	4	10	.384

ANOVA

dry weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.016	4	.004	58.781	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.017	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

dry weight

Duncan

Ethanol	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
9%	3	.05350		
7%	3	.06633	.06633	
3%	3		.07433	
5%	3		.07550	
1%	3			.14633
Sig.		.085	.221	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้