รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การต้านทานผลเชิงลบของการให้อากาศต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงเส้นใยเซลลูโลสด้วยใยบวบ

Resistance of negative impact of aeration on bacterial cellulose production by attachment of cellulose microfibril with luffa sponge

นายวราวุฒิ ครูส่ง

b. 00274584
i.

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RC00268

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การต้านทานผลเชิงลบของการให้อากาศต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงเส้นใยเซลลูโลสด้วยใยบวบ

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 349,100.- บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2558 ถึง กันยายน 2559

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การให้อากาศโดยตรงก่อให้เกิดผลเชิงลบต่อการสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการสร้างสภาพแวดล้อมในการหมักที่ต่อต้านผลกระทบจากการให้อากาศโดยอาศัยการเลือกอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการสร้างเซลลูโลสจากหัวเชื้อเส้นใยเซลลูโลส-*A. xylinum* DK ซึ่งพบว่า อัตราการให้อากาศที่ 3 ลิตร/นาที (ซึ่งมีค่า Volumetric oxygen transfer coefficient, k_La, เท่ากับ 0.06 ต่อชั่วโมง) ให้ปริมาณเซลลูโลสเฉลี่ยสูงสุด (1.86±0.5 กรัม/ลิตร) โดยมีเปอร์เซนต์ของการไม่สร้างเซลลูโลส 33.3% ในขณะที่ยิ่งใช้อัตราการให้อากาศเพิ่มขึ้น ผลผลิตเซลลูโลสกลับลดลงพร้อมทั้งเปอร์เซนต์ของการไม่สร้างเซลลูโลสเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq .05$) นอกจากนี้การสร้างสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณอากาศน้อย (Microenvironment surroundings) ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ช่วยลดผลกระทบเชิงลบดังกล่าว ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้ใยบวบ ใยบวบต้องนำมาตัดแต่งให้มีขนาด (กว้าง x ยาว x สูง) เท่ากับ 1.5 ซม. x 1.5 ซม. x 1.5 ซม. ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง สภาพที่เหมาะสมในการสร้างเซลลูโลสเมื่อใช้ใยบวบประกอบด้วย อาหารน้ำมะพร้าว (เติมน้ำตาลทราย 5%) ใยบวบ 0.5% (น้ำหนักโดยปริมาตร) หัวเชื้อเส้นใยเซลลูโลส-*A. xylinum* DK ปริมาตร 5% (ปริมาตร/ปริมาตร) ให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด 5.24±1.3 กรัม/ลิตร ทั้งนี้สภาพแวดล้อมที่มีปริมาณอากาศน้อยเกิดจากการจับตัวของใยบวบกับเส้นใยเซลลูโลสจากหัวเชื้อที่ใช้ซึ่งเมื่อการหมักครบ 7 วัน พบว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำอยู่ในระดับต่ำทั้งในน้ำหมัก (0.71 พีพีเอ็ม) และในเนื้อวุ้น (0.21 พีพีเอ็ม) ต่อมาได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงเส้นใยเซลลูโลสด้วยใยบวบในระบบการหมักแบบติดต่อกัน ทำการหมักทั้งหมด 9 รอบ โดยการใช้ใยบวบที่ตรึงเส้นใยเซลลูโลสจากการหมักรอบที่ 1 (หลังจากการเก็บเกี่ยวเซลลูโลส) เป็นหัวเชื้อสำหรับรอบถัดไป ผลการศึกษา พบว่า สามารถสร้างเซลลูโลสได้ระหว่าง 4.9±0.35 - 6.6±0.40 กรัม/ลิตร เมื่อการหมักครบ 7 วันในแต่ละรอบ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ากระบวนการตรึงเส้นใยเซลลูโลสบนใยบวบสามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาพการหมักแบบติดต่อกันในสภาพที่ให้อากาศ

คำสำคัญ : แบคทีเรียเซลลูโลส การตรึง เส้นใยเซลลูโลส ใยบวบ การให้อากาศ การหมักแบบติดต่อกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Resistance of negative impact of aeration on bacterial cellulose production by attachment of cellulose microfibril with luffa sponge

Researcher: Assoc.Prof.Dr. Warawut Krusong

Faculty: Agro-Industry **Division:** Industrial Fermentation Technology

ABSTRACT

Negative effect of aeration on bacterial cellulose (BC) production by *Acetobacter xylinum* DK is usually occurred. Creation of microenvironment surroundings against the negative effect of aeration is our aim. The suitable aeration rate providing low dissolved oxygen (DO) was investigated. Results show that at 3 l/min aeration rate which provided volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) as 0.06 per h the highest BC was produced (1.86±0.5 g/l) accompanying with 33.3% of non-cellulose production cycles, totally 3 in 9 cycles. While the increment of aeration rate (at 6 and 9 l/min) caused in the significant decrement of cellulose produced and the increment of non-cellulose production cycles ($p \geq .05$). Moreover, to improve the BC productivity under aeration cultivation, the microenvironment surroundings for *A. xylinum* DK must be created. The loffa sponge matrices (LSM) were applied for this purpose. Loffa sponge was cut into cube sized 1.5 cm x 1.5 cm x 1.5 cm as LSM and, then, sterilized at 121°C for 30 min, twice. The optimum conditions for BC production using LSM were as follows: coconut water medium supplemented with 5% sucrose, 5% (w/v) LSM, cellulose microfibril-*A. xylinum* DK starter for 5% (v/v), aeration rate at 3 l/min, fermentation temperature at 30±2°C for 7 days. The highest cellulose at 5.24±1.3 g/l was produced due to the lowered DO in both fermentation medium (0.71 ppm) and cellulose gel (0.21 ppm) on 7 days. This was belonged to the enmeshment of cellulose microfibril (CM) on surface of LSM called as "LCM-CM". The potential of re-used LSM-CM for consecutive BC production process was further investigated, nine production cycles used. Results confirm that LSM-CM works well as a starter. The LSM-CM provides a microenvironment which can be against the negative impact of aeration on BC production, resulting in 4.9±0.35-6.6±0.40 g/l of cellulose produced within each nine consecutive cycles. Sustainable consecutive process by re-used LSM-CM under aeration is beneficial as an economical process for mass production of BC.

Keywords: bacterial cellulose, fixation, cellulose microfibril, loffa sponge, aeration, consecutive fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ ขอขอบคุณ น.ส.กัลยรัตน์ บุญเกื้อ น.ส.ณัฐธิดา โสภามาตร และ น.ส.ณัฐพร สายพรม ที่ช่วยเหลือในด้านปฏิบัติการเป็นอย่างดี

รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง จ
สารบัญภาพ ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย 2
1.6 คำสำคัญของการวิจัย 3
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 5
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 10
3.1 จุลินทรีย์ 10
3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* DK ในลักษณะเส้นใย Cellulose microfibril 10
3.3 การตรวจสอบปริมาณอากาศในระบบการหมัก 10
3.4 ผลของการให้อากาศโดยตรงต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส 12
3.5 ปริมาณของใยบวบที่มีผลต่อการสร้างสภาพที่เหมาะสมของการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส 12
3.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบ 13
3.7 การสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบในระบบการหมักแบบติดต่อกัน 13
3.8 การวางแผนการทดลอง 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย 15

4.1 การตรวจสอบปริมาณอากาศในระบบการหมักต่อค่า Volumetric mass transfer coefficient (k_La) การเปลี่ยนแปลงของค่า Dissolved oxygen (DO) 15

4.2 ผลของการให้อากาศโดยตรงต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส 16

4.3 ปริมาณของใยบวบที่มีผลต่อการสร้างสภาพที่เหมาะสมของการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส 19

4.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบ 22

4.5 การสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบในระบบการหมักแบบติดต่อกัน 23

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 28

5.1 สรุปผลการวิจัย 28

5.2 ข้อเสนอแนะ 29

เอกสารอ้างอิง 30

ภาคผนวก 36

ภาคผนวก วิธีวิเคราะห์ 36

ประวัตินักวิจัย 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงการเปรียบเทียบผลของการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Hestrin and Schramm (HS) medium และ Coconut water (CW) medium ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพที่ใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 6 ลิตร/นาที	17
4.2	แสดงผลของการให้อากาศต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Coconut water medium ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพที่ใช้อัตราการให้อากาศ 3 ระดับ	18
4.3	แสดงผลของปริมาณใยบวบที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสจากหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในสภาพที่ให้อากาศที่ 3 ลิตร/นาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แสดงเส้นใยเซลลูโลสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *A. xylinum* DK เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็คตรอน (กำลังขยาย 10,000 เท่า) : (ก) เส้นใยเซลลูโลสที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ (ศรชี้); (ข) เส้นใยเซลลูโลสล้อมรอบและหุ้มตัวเซลล์ 7

2.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* DK บนอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลัง การบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน 8

3.1 แสดงขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* DK ในลักษณะเส้นใย Cellulose microfibril (CM-*A. xylinum* starter) : (ก) หัวเชื้อสต็อก (Stock culture) ที่เลี้ยงบนอาหาร น้ำมะพร้าว; (ข) ถ่ายลงใน Sterile autoclavable blender ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ: (ค) ตีปั่น ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2551); (ง) ลักษณะของหัวเชื้อหลังการตีปั่น; (จ) ตวงใส่ขวด (ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ; (ฉ) หัวเชื้อในลักษณะเส้นใย Cellulose microfibril พร้อมใช้งาน 11

3.2 แสดงลักษณะของใยบวบที่ผ่านการตัดและฆ่าเชื้อที่พร้อมใช้ในการศึกษา 13

4.1 แสดงผลของการให้อากาศต่อปริมาณค่า Dissolved oxygen และค่า Volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) เมื่อมีการให้อากาศในระดับ 3 6 และ 9 ลิตร/นาที เปรียบเทียบ กับสภาพที่ไม่มีการให้อากาศ 16

4.2 แสดงลักษณะของการหมักเพื่อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ที่ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพที่ใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 6 ลิตร/นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อ : (ก) Hestrin and Schramm (HS) medium และ (ข) Coconut water (CW) Medium 17

4.3 แสดงลักษณะของการหมักจากผลกระทบเชิงลบของการให้อากาศต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส ด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium จนก่อให้เกิดสภาพการ ไม่สร้างเซลลูโลส (BC⁻) เมื่อให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศา เซลเซียส 19

4.4 แสดงผลของการประยุกต์ใช้ใยบวบในการสร้างเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium เมื่อให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส : (ก) เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มล.; (ข) ขวดดูแรนขนาด 500 มล. 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.5 แสดงขั้นตอนการเตรียม LSM-CM เพื่อสร้างเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium : (ก) - (ค) การถ่าย LSM (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ลงในขวดดูแลน (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว; ขนาด 2000 มล. ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ; (ง) ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดดูแลนที่บรรจุ LSM ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ; (จ) การถ่ายหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ; (ฉ) การติดตั้งระบบให้อากาศภายใต้สภาพปลอดเชื้อ 20

4.6 แสดงลักษณะการสร้างเซลลูโลสจาก 0.5% (w/v) LSM-CM ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา : (ก) 3 วัน และ (ข) 7 วัน 22

4.7 แสดงผลของระยะเวลาต่อการสร้างเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter โดยใช้ปริมาณใยบวบ(ที่เหมาะสม) 0.5% (w/v) LSM ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ในสภาพที่ให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที : (■) cell content, (♦) cellulose content; (▲) dissolved oxygen 23

4.8 แสดงลักษณะของใยบวบ Re-used LSM-CM ที่ได้จากการหมักครั้งที่ 1 แล้วนำมาใช้ในการเป็นหัวเชื้อเพื่อสร้าง BC ในสภาพการหมักแบบติดต่อกัน 23

4.9 แสดงการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสในการหมักแบบติดต่อกันด้วยหัวเชื้อ Reused LSM-CM (Reused loffa sponge matrice-cellulose microfibril ของ *Acetobacter xylinum* DK) ใน CW medium ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส : การเปลี่ยนแปลงของ (ก) (■) cell content, (♦) cellulose content และ (ข) (▲) dissolved oxygen
หมายเหตุ : การหมักแต่ละรอบใช้เวลา 7 วัน และค่าที่ระบุเป็น means ± standard deviation ของการหมัก 3 ซ้ำ 25

4.10แสดงลักษณะ LSM-CM (อบแห้ง) ที่ได้จากการหมักแบบติดต่อกัน...26

4.11แสดง SEM images ของ Cellulose microfibril (CM)-*Acetobacter xylinum* DK ที่จับกับใยบวบ (Loffa sponge matrice; LSM) เพื่อก่อให้เกิด LSM-CM : (ก) BC ที่สร้างขึ้นจากเซลล์และCM ที่หุ้มภายนอกของผิว LSM (ลูกศรชี้) (x302 magnification), (ข) CM ที่มีเซลล์ปริมาณมาก (ลูกศรชี้) ที่จับกับ CM (x20000 magnification), และ (ค) ปริมาณเซลล์ *A. xylinum* DK (ลูกศรชี้) ที่อยู่ที่ CM (x40000 Magnification) 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สืบเนื่องจากที่หัวหน้าผู้วิจัย ได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria) ตั้งแต่ปี พ.ศ.2535 โดยเริ่มด้วยการศึกษากระบวนการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในระหว่างปีพ.ศ.2535-2544 ซึ่งได้ทำการศึกษาภายใต้โครงการความร่วมมือทางวิชาการไทย-ญี่ปุ่นภายใต้ NRCT-JSPS เป็นระยะเวลา 8 ปี และต่อมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 ได้ศึกษาการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากแบคทีเรีย *A. aceti* ทั้งนี้แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยและพัฒนาได้คัดเลือกมาจากธรรมชาติและปรับปรุงอย่างต่อเนื่องที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอม เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ในโครงการวิจัยนี้ได้นำเอาองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาช่วงแรกเกี่ยวกับแบคทีเรียเซลลูโลส ที่พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มักจะเกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์จากเซลล์ที่สร้างเซลลูโลส (Cellulose positive cells, Cel^+) เป็นเซลล์ที่ไม่สร้างเซลลูโลส (Non-cellulose cells, Cel^-) ในสภาพที่ได้รับอากาศในสภาพการเลี้ยงในอาหารเหลวในถังหมักแบบเขย่า (Stirred-tank bioreactor) หรือในถังหมักแบบให้อากาศ (Air-lift bioreactor) ประกอบกับองค์ความรู้ที่หัวหน้าวิจัยได้พบว่า การสร้างสภาพการหมักให้เชื้อดังกล่าวอยู่ในสภาพที่มีอากาศไม่มากนัก (Micro-aerophilic condition) สามารถกระทำได้โดยอาศัยการตรึงเส้นใยเซลลูโลส (Cellulose microfibril) ด้วยตัวตรึงคงที่ (Matrix) ในสภาพการเลี้ยงในทั้งสองสภาพ อนึ่งจากองค์ความรู้ทั่วไประบุว่าเชื้อ *A. xylinum* ที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจะเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศ (Aerobic microorganism) แต่เมื่อทำการศึกษาเชิงลึกกลับพบว่าเชื้อนี้มีสมบัติที่ต้องการอากาศน้อย (Micro-aero philic microorganism) เท่านั้นซึ่งเป็นเหตุผลให้เกิดการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ดังที่กล่าวถึงข้างต้น นอกจากนี้แล้วจากการศึกษาด้านการพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเชื้อ *A. aceti* ของหัวหน้าวิจัยก็ยังพบองค์ความรู้ว่า ใยบวบ (Luffa sponge) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเส้นใยเซลลูโลสที่มีรูพรุนในโครงสร้างซึ่งทำให้มีความเหมาะสมเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria) ผลการศึกษาดังกล่าวเป็นที่น่าพอใจโดยจัดเป็นทีมงานแรกที่ใช้ใยบวบในการผลิตน้ำส้มสายชูนอกเหนือจากทีมงานวิจัยอื่น ๆ ทั่วโลกที่ใช้ในด้านอื่น ๆ ดังนั้นด้วยพื้นฐานองค์ความรู้ทั้งสองเรื่องนี้จึงเป็นที่มาของแนวความคิดในการเลือกใช้ใยบวบเพื่อใช้เป็นตัวตรึงเส้นใยเซลลูโลสเพื่อเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพการเลี้ยงที่ให้อากาศโดยตรง อนึ่งหัวหน้าวิจัยได้ค้นพบวิธีการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสเพื่อให้มีลักษณะเป็นเส้นใยเซลลูโลสที่มีขนาดเล็ก หรือ เรียกว่า Cellulose microfibril Starter (CM starter) ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในระบบการเลี้ยงเพื่อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพการตรึงดังที่กล่าวถึงนี้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาสภาพในการเลี้ยงแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพที่ให้อากาศโดยตรงด้วยการตรึงเส้นใยเซลลูโลสบนใยบวบ

2. เพื่อศึกษาผลการต้านทานผลเชิงลบของการให้อากาศโดยตรงต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสจากเส้นใยเซลลูโลสที่ตรึงบนใยบวบ

3. ความเป็นไปได้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงเส้นใยเซลลูโลสบนใยบวบด้วยระบบการหมักแบบติดต่อกัน (Consecutive BC fermentation)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

มุ่งเน้นการพัฒนากระบวนการหมักที่ใช้ใยบวบซึ่งเป็นวัสดุธรรมชาติ เพื่อใช้ในการตรึงเส้นใยเซลลูโลสในการปรับสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลลูโลสในสภาพที่มีการให้อากาศโดยตรง เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าใยบวบสามารถสร้างสภาพแวดล้อมในลักษณะ Microenvironment ที่สนับสนุนการสร้างเซลลูโลสของเซลล์ของแบคทีเรียเซลลูโลสได้ อีกทั้งศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยระบบการหมักแบบติดต่อกัน (Consecutive BC fermentation) โดยอาศัยการใช้หัวเชื้อเส้นใยเซลลูโลสบนใยบวบ (Cellulose microfibril enmeshed loffa sponge matrices; LSM-CM) ที่นำกลับมาใช้ใหม่ (โดยนำใยบวบที่มีเส้นใยเซลลูโลสหุ้มอยู่ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสออกไปแล้วมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักรอบถัดไป) ทั้งนี้เพื่อเป้าหมายการนำผลผลิตเซลลูโลสที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ นอกเหนือจากที่ใช้ในเชิงอาหาร (Food use) เท่านั้น

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการทดสอบระบบการให้อากาศที่ออกแบบเพื่อให้สามารถรองรับปริมาณอากาศที่ต้องการ โดยศึกษาค่า Volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) และค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ (Dissolved oxygen; DO) ของการให้อากาศที่ระดับ 3 6 และ 9 ลิตรต่อนาที จากนั้นจึงทำการศึกษาผลของการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพที่ให้อากาศทั้ง 3 ระดับ เปรียบเทียบกับที่ไม่ให้อากาศ เพื่อทำการคัดเลือกระดับการให้อากาศที่เหมาะสมและศึกษาผลกระทบเบื้องต้นของการให้อากาศต่อการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรียเซลลูโลส หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณใยบวบที่เหมาะสมต่อการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพที่ให้อากาศในระดับที่คัดเลือก จึงนำปัจจัยที่ได้ทั้งหมดไปใช้ในการศึกษาการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพที่ให้อากาศในระบบการหมักแบบติดต่อกัน (Consecutive BC fermentation)

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

จากองค์ความรู้เกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK จากเซลล์ที่สร้างเซลลูโลส (Cel^+, cellulose producing cells) เป็นเซลล์ที่ไม่สร้างเซลลูโลส (Cel^-, non-cellulose producing cell) ในสภาพการเลี้ยงที่ได้รับอากาศทั้งในสภาพการเลี้ยงในอาหารเหลวในระบบการหมักแบบให้อากาศ (Aeration system) รวมทั้งองค์ความรู้ด้านการปรับสภาพที่เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในการสร้างเซลลูโลส คือ สภาพที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (Microenvironment) อย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก็ตามปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการผลิตในสภาพ Submerged fermentation ในถังหมักแบบให้อากาศมีสูงกว่าสภาพการหมักในสภาพ Surface fermentation ที่ใช้กันทั่วไป (Bae et al., 2004) แต่นักวิจัยบางกลุ่มก็ยังคงยืนยันว่าการหมักในสภาพ Surface fermentation ให้ผลผลิตที่ดีกว่า อย่างไรก็ตามเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในถังหมักที่ให้อากาศมีลักษณะที่ไม่ได้อัดตัวกันแน่นจึงสะดวกในการนำไปประยุกต์ใช้ได้ง่าย ทั้งนี้หัวหน้าผู้วิจัยได้เคยนำไปใช้ในการผลิตสาร Carboxy methyl cellulose (CMC) ซึ่งเป็นชนิดหนึ่งของสารให้ความหนืดโดย CMC ที่ผลิตขึ้นได้จัดอยู่ในระดับ Food grade ได้แล้ว (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ, 2540) นอกจากนี้จากองค์ความรู้เกี่ยวกับการนำใยบวบมาใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรียอะซิติก โดยหัวหน้าวิจัยได้นำมาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักได้สำเร็จทั้งในถังหมักแบบให้อากาศ (Airlift fermenter; Krusong *et al.*, 2007) และในถังหมักแบบเขย่า (Agitated fermenter; Krusong *et al.*, 2010) รวมถึงใน “ถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ” (Krusong, unpublished data) และระบบReciprocal shaking system (Krusong *et al.*, 2014) อนึ่งถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศนี้เป็นสิ่งประดิษฐ์ที่ได้รับรางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกลยอดเยี่ยมประจำปี 2554 สาขาเครื่องจักรกลการผลิต จากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ซึ่งถังหมักดังกล่าวสนับสนุนให้เกิดการให้อากาศที่ดีในลักษณะ Bubble regime ซึ่งคาดว่าในอนาคตจะนำมาประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสเพราะสามารถควบคุมปริมาณอากาศได้ตามอัตราการให้อากาศที่ต้องการได้ จากบทพิสูจน์ถึงความเหมาะสมของใยบวบจึงเป็นที่มาของการประสานองค์ความรู้ทั้งสองด้านโดยอาศัยการประยุกต์ใช้ใยบวบสำหรับตรึงเส้นใยเซลลูโลสที่เตรียมจากแบคทีเรีย *A. xylinum* DK เพื่อการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพการที่มีการให้อากาศโดยตรง การปรับสภาพที่เหมาะสมโดยรอบใยบวบจะช่วยสร้างสภาพที่เหมาะสมให้แก่แบคทีเรีย *A. xylinum* DK จนสามารถสร้างเซลลูโลสได้ดี เนื่องจากน่าจะสามารถต่อต้านผลกระทบจากการให้อากาศโดยตรงได้

นอกจากนี้จากประสบการณ์ด้านการพัฒนาองค์ความรู้ด้านการผลิตน้ำส้มสายชูด้วยระบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous acetification) จึงได้ทำการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาระบบการหมักแบคทีเรียเซลลูโลสแบบติดต่อกัน (Consecutive BC fermentation) ด้วยหัวเชื้อใยบวบตรึงเส้นใยเซลลูโลสที่นำกลับมาใช้ (Reused LSM-CM; re-used cellulose microfibril enmeshed loffa sponge matrices) สำหรับการผลิตแบค ทีเรียเซลลูโลสในสภาพการหมักที่ให้อากาศโดยตรงด้วย

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

(ภาษาไทย) แบคทีเรียเซลลูโลส เส้นใยเซลลูโลส สภาพแวดล้อมที่มีอากาศน้อย ใยบวบ การให้อากาศ

(ภาษาอังกฤษ) bacterial cellulose, cellulose microfibril, microenvironment, loffa sponge, aeration

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่คาดหวังจะได้รับ คือ แนวทางในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพที่ให้อากาศโดยอาศัยหัวเชื้อที่ตรึงเส้นใยเซลลูโลสบนใยบวบที่สามารถนำกลับมาใช้ในการผลิตได้ในลักษณะติดต่อกันซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถเผยแพร่ผลงานในลักษณะบทความวิจัยอย่างน้อย 1 เรื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ที่ปรากฏในฐานข้อมูลการจัดอันดับวารสาร ISI ซึ่งแตกต่างจากที่ระบุไว้ในข้อเสนอโครงการที่จะนำเสนอผลงานในวารสาร SJR (SCImago Journal Rank) ในควอไทล์ที่ 3 หรือ 4 ส่วนหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ประกอบด้วย บริษัทที่ได้ดำเนินธุรกิจเกี่ยวกับการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส รวมถึงสถาบันการศึกษา

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ในการตรึงเซลล์ หรือที่เรียกว่า "Cell immobilization" จัดเป็นเทคนิคในการยึดเซลล์จุลินทรีย์ไว้กับตัวกลาง (Support หรือ matrix) การตรึงเซลล์นิยมใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักได้ เนื่องจากช่วยในการเพิ่มชีวมวล (Biomass) ความสามารถในการใช้ซ้ำ (Reusability) รวมถึงการป้องกันเซลล์จากผลกระทบเชิงลบจากปัจจัยต่างๆซึ่งประกอบด้วยค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำ หรือ อุณหภูมิ หรือ สารยับยั้ง (Inhibitors) (Brodelius and Vndamme, 1987) สำหรับตัวอย่างของตัวกลางที่ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ที่ผ่านมา ประกอบด้วย Monolithic Support (European Patent EP0121981, 1981), Porous cellulose carrier (Sakurai *et al.*, 2000), Chitosan-treated polypropylene (Krishnan *et al.*, 2001), Fibrous inert support (WO/2002/068578, 2002) และ Polyurethan foam (de Ory *et al.*, 2003) เป็นต้น ขณะเดียวกันได้มีความสนใจเกี่ยวกับตัวกลางที่เป็นสารธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายภายหลังจากการใช้ ตัวอย่างของตัวกลางในประเภทนี้ ได้แก่ เศษไม้ (de Ory *et al.*, 2003) ชานอ้อย (Kocher *et al.*, 2006) และใยบวบ (Ogbonna *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Pekdemir *et al.*, 2003; Vignoli *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2007; Krusong *et al.*, 2007, 2010, 2014; Krusong and Vichitraka, 2011) เป็นต้น

บวบเป็นพืชตระกูลแตง จัดอยู่ใน Order: Cucurbitales, Family: Cucurbitaceae มีชื่อจีนัสว่า *Luffa* spp. สำหรับในประเทศไทยนั้นแต่เดิมส่วนใหญ่จะปล่อยให้บวบเลื้อยตามรั้วหรือปล่อยให้เลื้อยพันไปตามต้นไม้แล้วคอยเก็บผลอ่อนมารับประทานเป็นผัก ส่วนบวบที่ไม่ได้เก็บจะปล่อยจนแก่แห้งเหลือแต่เป็นเส้นใยที่เรียกว่า "รังบวบ" หรือ "ใยบวบ" บวบที่สามารถปลูกในประเทศไทยประกอบด้วย บวบเหลี่ยม บวบงู และบวบหอม ทั้งนี้บวบเหลี่ยม (*Luffa acutangular* Roxb.) มีชื่อสามัญว่า Angeld loofah เป็นไม้เถาอายุปีเดียว ผลของบวบมีรูปทรงกระบอกมีเหลี่ยมตามความยาวของผล ขณะที่บวบงู (*Trichosanthes anguina* Linn.) มีชื่อสามัญว่า Snake gourd ผลลักษณะกลมยาวปลายผลแหลม ผิวเรียบ มีแถบสีขาวสลับเขียวทั้งผล เมื่อสุกมีสีส้มแดง ส่วนบวบหอม (*L. cylindrica* Roem.) มีชื่อสามัญว่า Smooth loffah หรือ Sponge gourd vegetable sponge ผลอ่อนสีเขียวมีลายเขียวเข้ม ผลแก่สีเขียวออกเหลืองจนถึงสีน้ำตาล มีเส้นใยเหนียวลักษณะเป็นร่างแห (สิริกุล วะสี, 2548) ในต่างประเทศอาจเรียกบวบในลักษณะต่างๆ เช่น Dishcloth gourd, Chinese okra, "Luffa sponge" หรือ "Loffa sponge" ใยบวบนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่ใช้ผลอ่อนมาประกอบอาหารโดยนิยมบริโภคในประเทศแถบเอเชียซึ่งรวมถึงประเทศไทย ขณะที่เส้นใยในผลแก่จะถูกนำมาใช้แทนฟองน้ำในการขัดตัวขณะอาบน้ำ หรือ ใช้เป็นอุปกรณ์ล้างจาน (Washing items) หรือ สบู่ใยบวบ (Luffa soap) นอกจากนี้แล้วยังมีการทำใยบวบให้เป็นผงและใช้เป็นยาจีน (http://www.luffa.info/) ใยบวบได้ถูกเลือกให้เป็นตัวกลางเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ โดยจัดเป็น "Fibrous support" เนื่องจากโครงร่างที่เป็นเส้นใย ใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บวบที่นิยมใช้ในงานนี้ คือ ใยบวบหอม (*L. cylindrica*) หรือนิยมเรียกชื่อสามัญว่า "Loffa sponge" ทั้งนี้การประยุกต์ใช้ใยบวบมีหลากหลาย เริ่มตั้งแต่การผลิตผลิตภัณฑ์และการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยการตรึงเชื้อยีสต์ *Candida brassicae* (Ogbonna *et al*., 1997) การตรึงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตไวน์และเบียร์ที่ใส (WO/2002/068578) การตรึงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* RBU2-10 เพื่อผลิตกรดแลคติก (Ganguly *et al*., 2006) การตรึงเซลล์ยีสต์ *Zymomonas mobilis* เพื่อผลิตซอบิทอล (Vignoli *et al*., 2006) และการตรึงเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวโพด (Krusong *et al*., 2007, 2010, 2014; Krusong and Vichitraka,2011) นอกจากนี้ยังมีการนำใยบวบไปใช้ในทางการแพทย์ เช่น การเคลือบสารฆ่าเชื้อ (Germicide) บนใยบวบ (WO/2000/006210) อุปกรณ์ในการรักษาความสะอาดในช่องปากเพื่อช่วยลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เคลือบอยู่ที่ผิวฟันโดยใช้แทนแปรงสีฟัน (Schwartz *et al*., 2007) ใยบวบยังมีการนำมาใช้ในงานที่เกี่ยวกับสิ่งแวดล้อมดังเช่น การเพิ่มประสิทธิภาพสารฆ่าสาหร่าย (Algicidal agent) ด้วยการตรึงแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารฆ่าสาหร่าย *Stephanodiscus hantzschii* (Kang *et al*., 2007) การดึงโลหะหนักเช่น แคดเมียม จากน้ำเสีย (Akhtar *et al*., 2003) และประจุเฟอรัส (Ferrous ion) (Pekdemir *et al*., 2003) รวมถึงใช้เป็นตัวกลางในระบบการหมักมีเธน (Yang *et al*., 2004) เป็นต้น

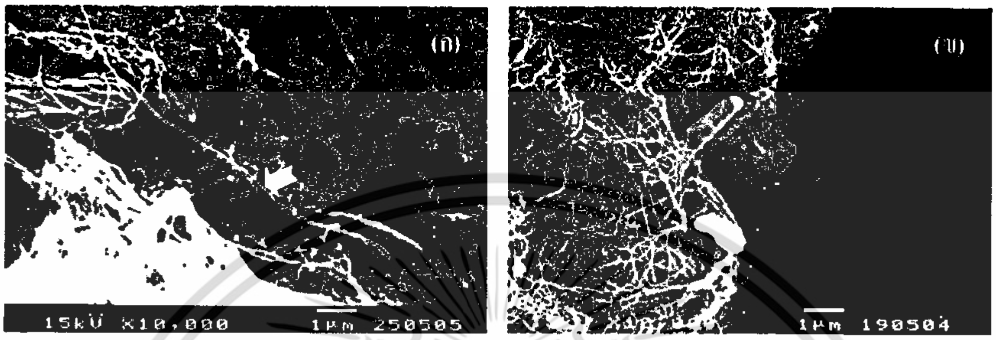
"เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose)" เป็นสารอินทรีย์ที่บริโภคได้ ไม่มีรสชาติ ไม่มีกลิ่น เซลลูโลสจากแบคทีเรียนี้นิยมเรียกอีกอย่างว่า "Nata" ซึ่งนิยมเรียกที่ประเทศฟิลิปปินส์ หรือ ในประเทศไทยมักจะเรียกว่า "วุ้นสวรรค์" หรือ "วุ้นน้ำมะพร้าว" ทั้งนี้แต่เดิมนิยมใช้มะพร้าวซึ่งส่วนใหญ่จะเลือกใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ, 2535) อีกทั้งยังสามารถเลือกใช้กะทิเป็นวัตถุดิบได้เช่นกัน ดังนั้นจึงเรียกเซลลูโลสจากแบคทีเรียนี้ว่า "Nata de Coco" ซึ่งเป็นการเน้นว่าเป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียจากการใช้วัตถุดิบเป็นมะพร้าวนั่นเอง นอกจากนี้ยังอาจเรียกว่า "Nata de pina" ผลิตจากน้ำสับปะรด อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาถึงวัตถุดิบที่สามารถใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส เช่น น้ำหางนม (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ, 2536) น้ำกากส่า (วราวุฒิ ครูส่ง, 2538) กากน้ำตาล (Çakar et al., 2014) และ Waste beer yeast (Lin *et al*., 2014) เป็นต้น

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลสและพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ประกอบด้วย แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter* spp., *Achromobacter* spp., *Aerobacter* spp., *Agrobacterium* spp., *Azotobacter* spp., *Psuedomonas* spp., *Rhizobium* spp. และ *Sarcinar* spp. แต่แบคทีเรียที่มีความสำคัญมากในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส คือ สายพันธุ์ *Acetobacter xylinum* เนื่องจากมีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสได้ในปริมาณสูง (วราวุฒิ ครูส่ง, 2551)

สายพันธุ์ของ *Acetobacter* spp. ที่เป็นที่รู้จักและใช้ในการผลิตเซลลูโลสกันอย่างกว้างขวางคือ *A. aceti* subsp. *xylinum* ซึ่งโดยมากมักเรียกว่า "*A. xylinum*" อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้กลุ่มนักจำแนกกลุ่มแบคทีเรียได้จัดเปลี่ยนชื่อเชื้อ *A. xylinum* เป็น *Gluconacetobacter xylinus* (Çakar *et al*., 2014) แบคทีเรีย *A. xylinum* นี้เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อน เซลล์อาจอยู่เรียงต่อกันหรือเป็นเซลล์เดี่ยว ในการสังเคราะห์เซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* จะผลิตเส้นใยเซลลูโลสซึ่งมีขนาดเล็กและขับออกมาภายนอกเซลล์ เส้นใยเซลลูโลสเล็กๆ เหล่านี้จะมาต่อกันเป็นสายยาว (ดังแสดงในภาพที่ 2.1ก ลูกศรชี้) โดยความกว้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

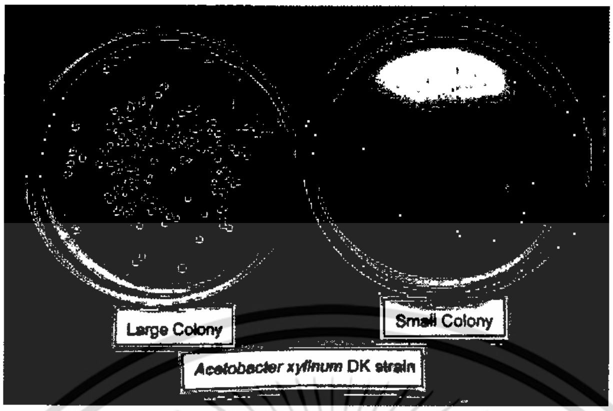
ของเส้นใยนี้ประมาณ 3.2 x 133 นาโนเมตร ส่วนความยาวแปรตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก อัตราการเจริญของเส้นใยนี้ประมาณ 2 นาโนเมตรต่อนาที เส้นใยเซลลูโลสที่แบคทีเรีย *A. xylinum* ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์และเมื่อเส้นใยเซลลูโลสนี้มีจำนวนมากขึ้น เส้นสายเหล่านี้จะล้อมรอบและหุ้มตัวเซลล์ของแบคทีเรีย *A. xylinum* ไว้ภายใน (ภาพที่ 2.1ข)



ภาพที่ 2.1 แสดงเส้นใยเซลลูโลสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *A. xylinum* DK เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (กำลังขยาย 10,000 เท่า) : (ก) เส้นใยเซลลูโลสที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์ (ศรชี้); (ข) เส้นใยเซลลูโลสล้อมรอบและหุ้มตัวเซลล์
ที่มา : วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2546; 2551)

อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสนี้มีลักษณะการเกิดโคโลนีที่เฉพาะโดย Yamanaka *et al.* (1989) พบว่าโคโลนีของแบคทีเรีย *A. aceti* AJ 12368 มีสองลักษณะ คือ โคโลนีผิวขรุขระ (Rough colony) และโคโลนีผิวเรียบ (Smooth colony) ทั้งสองโคโลนีมีความสามารถในการสร้างเซลลูโลสเช่นกัน แต่โคโลนีผิวขรุขระสามารถสร้างได้มากกว่าโคโลนีผิวเรียบเมื่อทำการเลี้ยงในสภาพนิ่งเป็นเวลา 7 วัน ต่อมา Toyosaki *et al.* (1995) รายงานว่า การเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง (Agar medium) ของแบคทีเรีย *Acetobacter* spp. มีลักษณะเป็นทรงกลมนูน (Pulvinate) สีขาว ผิวเรียบ แยกโคโลนีเดี่ยวๆ ชัดเจน เมื่อหัวเชื้อมีอายุมากขึ้นจะมีผิวขรุขระหรือมีรอยย่น หรือสร้างโคโลนีซ้อนขึ้นมา ขุ่นเหนียว หรือสีน้ำตาลอ่อน ความเหนียวจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น โคโลนีมีทั้งขนาดใหญ่และเล็ก ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Acetobacter* spp. เป็นสำคัญ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Samporn *et al.* (2002) ช่วยยืนยันข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะของโคโลนีโดยระบุถึงลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างของหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. aceti* IFO3284 พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อมีสองลักษณะ ประกอบด้วยโคโลนีผิวหน้าหยาบ (Rough-surface colony) และโคโลนีผิวหน้าเรียบ (Smooth-surface colony) โดยที่โคโลนีผิวหน้าเรียบเจริญได้ดีทั้งในสภาพนิ่งและสภาพเขย่า สำหรับหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสที่หัวหน้าผู้วิจัยได้คัดเลือกขึ้นมาจากธรรมชาติก็พบลักษณะที่เฉพาะนี้เช่นกัน ดังแสดงในรายงาน Krusong *et al.* (2001) ที่ระบุว่า หัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* DK ที่ผ่านการคัดเลือกและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี โดยทำการถ่ายเชื้อทุกเดือน ผลที่ได้เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า มีโคโลนีของหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสที่เกิดขึ้นเป็นโคโลนีสองลักษณะที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน คือ โคโลนีเล็กและใส เรียกว่าชนิด “โคโลนีเล็ก (Small colony; SC type)” และโคโลนีใหญ่ ขุ่น ขอบเรียบและสีครีม เรียกว่าชนิด “โคโลนีใหญ่ (Large colony; LC type)” ทั้งนี้ดังแสดงในภาพที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* DK บนอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน
ที่มา : Krusong *et al.* (2001); วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2551)

หัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลสที่มีโคโลนีทั้งสองลักษณะของเซลลูโลส *A. xylinum* DK นี้ สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีอากาศน้อย แต่เจริญได้เร็วในสภาพที่มีอากาศ อีกทั้งหัวเชื้อทั้งสองโคโลนียังคงไว้ซึ่งความสามารถในการสร้างเซลลูโลสทั้งในสภาพนิ่ง (Static and surface cultivation) และสภาพเขย่า (Agitated cultivation) ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ, 2551)

โดยทั่วไปนักวิทยาศาสตร์หลายๆท่านได้กล่าวว่าหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ แต่ในทางตรงกันข้าม Williums and Cannon (1989) ระบุว่าหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* นี้สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีอากาศน้อย จากการที่พบข้อมูลที่น่าสนใจนี้ทำให้สามารถอธิบายถึงสาเหตุที่แผ่นวุ้นเซลลูโลสสามารถเจริญที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักสภาพนิ่งและเพิ่มความหนาของแผ่นที่ผิวหน้านั้นให้หนาขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นได้ซึ่งออกซิเจนที่เชื้อจะใช้นั้นต้องอยู่ในน้ำหมักที่ไม่มีการให้อากาศเพิ่มเติมจากผิวหน้า เนื่องจากแผ่นวุ้นที่อุ้มน้ำลอยอยู่บนผิวหน้าในลักษณะเช่นนี้เปรียบได้ว่าแผ่นวุ้นที่ผิวหน้าเป็นฉนวนของอากาศ นอกจากนี้แล้วการศึกษาของ Krusong *et al.* (2001) ยังให้ผลสนับสนุนหลักการดังกล่าวด้วย

เนื่องจากมีการพัฒนากระบวนการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสเพิ่มเติมจากที่นิยมใช้การผลิตในระบบวางนิ่งมาเป็นระบบอื่นๆ ซึ่งประกอบด้วย ระบบการกวน หรือ ระบบการให้อากาศ แต่มีข้อสันนิษฐานหลากหลายต่อผลกระทบของการกวน หรือ การให้อากาศต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* โดยที่ Hestrin and Schramm (1954); Cook and Colvin (1980), Byrom (1991) รวมถึง Bae *et al.* (2004) เสนอแนวคิดว่าระบบการกวน หรือ การให้อากาศจะส่งผลกระทบเชิงลบ (Negative effect) ต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* อย่างไรก็ตามมีข้อคิดเห็นในทางตรงข้าม เช่น จาก Kouda *et al.* (1998) ที่กล่าวว่าการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจำเป็นต้องได้รับการส่งถ่ายออกซิเจน (Oxygen Transfer) ในอัตราที่สูง ขณะที่ Krusong *et al.* (1999; 2003; 2004) ได้พิสูจน์และสนับสนุนว่า ระบบการกวน หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบการให้อากาศ ส่งผลกระทบต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* DK ในลักษณะที่เรียกว่า "ผลกระทบหลากมิติ (Multi-effect)" เช่นกัน

ดังนั้นในการวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* DK โดยอาศัยการตรึงเส้นใยเซลลูโลสบนใยบวบ (ซึ่งผู้วิจัยได้พิสูจน์แล้วว่าสามารถใช้เป็นตัวกลางในการยึดเซลล์แบคทีเรียอะซิติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ) ในสภาพที่มีการให้อากาศโดยตรง รวมถึงความเป็นไปได้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในลักษณะการหมักแบบติดต่อกัน

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Williums and Cannon (1989) ระบุว่าหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* นี้สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีอากาศน้อย จากการที่พบข้อมูลที่น่าสนใจนี้ทำให้สามารถอธิบายถึงสาเหตุที่แผ่นวุ้นเซลลูโลสสามารถเจริญที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักสภาพนิ่ง และเพิ่มความหนาของแผ่นที่ผิวหน้านั้นให้หนาขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นได้ซึ่งออกซิเจนที่เชื้อจะใช้นั้นต้องอยู่ในน้ำหมักที่ไม่มีการให้อากาศเพิ่มเติมจากผิวหน้า เนื่องจากแผ่นวุ้นที่อุ้มน้ำลอยอยู่บนผิวหน้า ในลักษณะเช่นนี้เปรียบได้ว่าแผ่นวุ้นที่ผิวหน้าเป็นฉนวนของอากาศ

Hestrin and Schramm (1954); Cook and Colvin (1980), Byrom (1991) รวมถึง Bae *et al.* (2004) เสนอแนวคิดว่าระบบการกวน หรือ การให้อากาศจะส่งผลกระทบเชิงลบ (Negative effect) ต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* อย่างไรก็ตามมีข้อคิดเห็นในทางตรงข้าม เช่น จาก Kouda *et al.* (1998) ที่กล่าวว่าการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสจำเป็นต้องได้รับการส่งถ่ายออกซิเจน (Oxygen Transfer) ในอัตราที่สูง

Joris *et al.* (1993) และ Vandamme *et al.* (1998) ทำการศึกษาเพื่อลดผลกระทบของการให้อากาศต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* โดยอาศัยการเติมตัวกลางที่มีขนาดเล็กและไม่ละลายน้ำ (Insoluble microparticles) เช่น Diatomaceous earth, Silica, Glass beads ขนาดเล็ก และดินร่วน (Loam particle) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อก่อให้เกิดสภาพที่มี DO ในปริมาณต่ำโดยเรียกสภาพดังกล่าวว่า **"Microenvironment"**

นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการลดค่า DO ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส ดังเช่น การเติมวุ้น (Agar; Bae *et al.*, 2004) และ CMC (Tantratian *et al.*, 2005)

อนึ่งนอกจากสาเหตุผลเชิงลบของการให้อากาศต่อผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* ในประเด็นของปริมาณ DO ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตแล้ว อีกสาเหตุหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์หลายๆกลุ่มให้ความสนใจ คือ ผลกระทบที่มีต่อเซลล์ ทั้งนี้ Krystynowicz *et al.* (2002) และ Jung *et al.* (2005) ได้รายงานว่าในสภาพที่มีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยเซลล์ที่สามารถสร้างเซลลูโลส (Cellulose producing cell, **Cel^{+}**) จะเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่ไม่สร้างเซลลูโลส (Non-cellulose producing cells, **Cel^{-}**) ซึ่งส่งผลให้ไม่พบการผลิตเซลลูโลสในสภาพการเลี้ยงที่ให้อากาศนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK ที่ได้จากการคัดเลือกจากผลไม้เมืองร้อน โดยผ่านการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์มามากกว่า 10 ปี เก็บรักษาไว้ในอาหาร Coconut water (CW) agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* DK ในลักษณะเส้นใย Cellulose microfibril

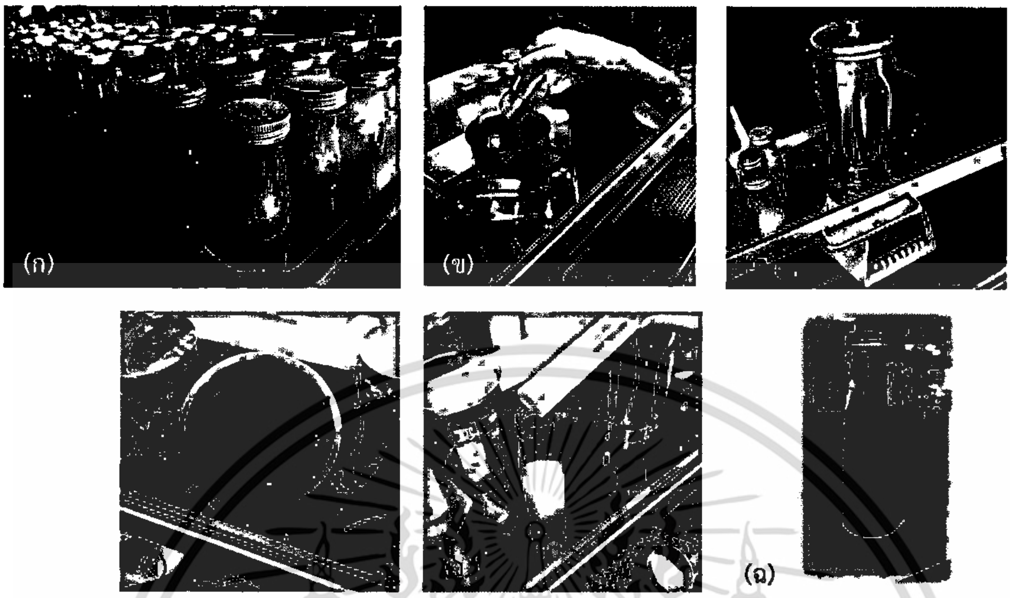
หัวเชื้อที่เตรียมจากเชื้อ *A. xylinum* DK (จากข้อ 3.1) ในการศึกษานี้เรียกว่า "หัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* DK ในลักษณะเส้นใย Cellulose microfibril" หรือเรียกสั้นๆว่า "**CM-*A. xylinum* DK starter**" (ในรายงานจะกล่าวถึง CM starter ในกรณีที่กล่าวถึงหัวเชื้อที่เตรียมจากเชื้อ *A. xylinum* DK)

ทำการเตรียมหัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter ตามวิธีการของ Krusong *et al.* (1996) และ วราวุฒิ ครูส่ง (2551) ซึ่งได้พัฒนา "เทคนิคการเตรียมหัวเชื้อเส้นใยเซลลูโลส" เพื่อมุ่งเน้นการใช้เส้นใยเซลลูโลส (Cellulose microfibril) ที่มีขนาดเล็ก โดยทำการเลี้ยงหัวเชื้อ *A. xylinum* DK ในอาหารเหลว CW medium ปริมาตร 100 มล. บรรจุในขวดทรงกระบอกขนาด 200 มล. โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อมีแผ่นวุ้นเกิดที่ผิวหน้าจะทำการเขย่าให้แผ่นวุ้นจมน้ำแล้วทำการหมักต่อ ทำซ้ำๆกันจนครบเวลา 7 วัน จากนั้นจึงถ่ายใส่ Sterile autoclavable blender ขนาด 2 ลิตร โดยใช้ขวดหัวเชื้อจำนวน 10 ขวด (ปริมาตรโดยรวมเท่ากับ 1000 มล.) ทำการตีปั่น (Homogenize) แผ่นวุ้นเซลลูโลสด้วยความเร็วรอบในการตีปั่นเท่ากับ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบ ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายใส่ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 2 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป สำหรับลักษณะของการเตรียมแสดงในภาพที่ 3.1

3.3 การตรวจสอบปริมาณอากาศในระบบการหมัก

เนื่องจากการหมักเพื่อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในสภาพการให้อากาศทำในขวดดูแรนขนาด 2 ลิตรโดยกำหนดให้ปริมาตรที่ใช้เท่ากับ 1 ลิตร ดังนั้นเพื่อให้ทราบผลของการให้อากาศที่มีต่อการผลิตเซลลูโลสของหัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter จึงจำเป็นต้องทราบปริมาณอากาศในระบบ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์หาค่า Volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) และค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำได้ (Dissolved oxygen; DO)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส *A. xylinum* DK ในลักษณะเส้นใย Cellulose microfibril (CM-*A. xylinum* starter) : (ก) หัวเชื้อสต็อก (Stock culture) ที่เลี้ยงบนอาหารน้ำมะพร้าว; (ข) ถ่ายลงใน Sterile autoclavable blender ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ: (ค) ตีปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2551); (ง) ลักษณะของหัวเชื้อหลังการตีปั่น; (จ) ตวงใส่ขวด (ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ; (ฉ) หัวเชื้อในลักษณะเส้นใย Cellulose microfibril พร้อมใช้งาน

(ที่มา : วราวุฒิ ครูส่ง, 2551)

3.3.1 อัตราการให้อากาศต่อค่า Volumetric mass transfer coefficient (k_La)

อัตราการให้อากาศที่จะใช้ในระบบให้อากาศโดยตรงเท่ากับ 3 6 และ 9 ลิตร/นาที โดยอาศัยการปั๊มอากาศผ่านแผ่นกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจถึง Oxygen-transfer capacity ของระบบ จึงทำการหาค่า k_La ของทั้งสามระดับการให้อากาศด้วย Sodium sulfite oxidation method (Stenstrom, 2007)

3.3.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า Dissolved oxygen (DO)

แต่เดิมได้วางแผนใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Hestrin and Schramm (1954) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาพบปัญหาในการเจริญของหัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้ CW medium เนื่องจากหัวเชื้อ *A. xylinum* DK ได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium มาเป็นเวลาร่วมสิบปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากสารอาหารที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อค่า DO ดังนั้นจึงทำการติดตามค่า DO ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium ในสภาพการให้อากาศเท่ากับ 3 6 และ 9 ลิตร/นาที ด้วยเครื่อง HI9146 Microprocessor Dissolved Oxygen Meter (HANNA Instruments Inc., Romania)

3.4 ผลของการให้อากาศโดยตรงต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส

ทำการศึกษาผลของการให้อากาศต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสในขวดดูแรนขนาด 2 ลิตร โดยใช้น้ำหมัก CW medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter (ที่เตรียมจากข้อ 3.2) ในปริมาณ 5% (v/v) แล้วจึงทำการติดตั้งระบบการให้อากาศ ทั้งนี้ทำการศึกษาการให้อากาศทั้งสามระดับ (3 6 และ 9 ลิตร/นาที) ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

เมื่อครบกำหนดทำการติดตามปริมาณเซลลูโลส (Cellulose content) และปริมาณเซลล์ (Cell content) โดยปริมาณเซลลูโลสวิเคราะห์ตามวิธีการของ Wu *et al.* (2010) โดยนำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำและแช่ไว้ค้างคืน จากนั้นแช่ในสารละลาย 0.1 mol L^{-1} NaOH ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อแยกแบคทีเรียออก แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้งเพื่อกำจัดด่างออกไป ก่อนที่จะนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ปริมาณเซลลูโลสคิดเป็นน้ำหนักต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้แล้วน้ำหนักแห้งที่แตกต่างของระหว่างเซลลูโลสที่ผ่านล้างน้ำและที่ผ่านการแช่ด่าง คือ ปริมาณเซลล์ (Cell content)

ในทุกระดับของการให้อากาศที่ศึกษาทำการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าที่แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย และดำเนินการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's Test ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 95%

3.5 ปริมาณของใยบวบที่มีผลต่อการสร้างสภาพที่เหมาะสมของการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส

3.5.1 การเตรียมใยบวบ

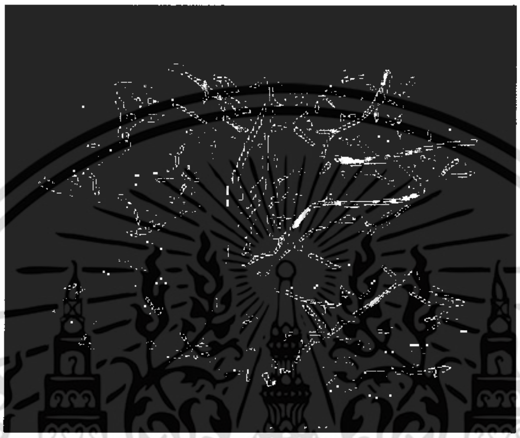
ใยบวบที่ใช้ต้องนำมาล้างเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะนำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงทิ้งไว้ให้แห้งแล้วจึงตัดให้มีขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 1.0 ซม. x 1.0 ซม. x 1.0 ซม. จากนั้นจึงนำมาผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที รอให้เย็น นำไปแช่ในน้ำส้มสายชูกลั่น 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาต้มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อล้างกรดออกจากใยบวบ แล้วทิ้งไว้ให้เย็นแช่น้ำทิ้งไว้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงต้มใยบวบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะทำการฆ่าเชื้อให้สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ด้วยเครื่องฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (Autoclave)

อนึ่งก่อนใช้งานจะทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยการสุ่มไปแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปบ่มด้วยการเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ถ้าพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นเกิดขึ้น สรุปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่า ใยบวบใน Lot ที่สุ่มมานั้นยังผ่านการฆ่าเชื้อที่ไม่สมบูรณ์ ให้ดำเนินการฆ่าเชื้ออีกครั้งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือ จนกว่าจะไม่พบการปนเปื้อน ทั้งนี้เนื่องจากในสภาพการสร้างเซลลูโลสที่ศึกษาได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium ที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่ดีเหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ทั่วไปซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้การสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสเกิดข้อผิดพลาดได้

ลักษณะของใยบวบที่ผ่านการฆ่าเชื้อและพร้อมใช้งานแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะของใยบวบที่ผ่านการตัดและฆ่าเชื้อที่พร้อมใช้ในการศึกษา

3.5.2 การสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสโดยใช้ใยบวบในการตรึงเส้นใยเซลลูโลสและเซลล์

ทำการศึกษาปริมาณใยบวบ (ที่เตรียมจากข้อ 3.5.1) ในปริมาณ (ร้อยละ) 0 0.10 0.2 0.3 0.4 และ 0.50 จากนั้นดำเนินการหมักเช่นเดียวกับข้อ 3.4

3.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบ

ทำการศึกษาในสภาพที่ใช้ปริมาณใยบวบที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.2 เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ในการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบจากหัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.4 ทำการติดตามปริมาณเซลลูโลส ปริมาณเซลล์และค่า DO ในทุกวันของการหมัก

3.7 การสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบในระบบการหมักแบบติดต่อกัน

เป้าหมายของการหมักเพื่อสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสแบบติดต่อกัน (Consecutive BC production) คือการพัฒนาระบบการหมักที่อาศัยการเตรียมหัวเชื้อเพียงครั้งเดียว โดยใช้หัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter ทำการหมักครั้งแรกโดยใช้ใยบวบในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 จากนั้นเมื่อทำการหมักจนครบเวลาที่กำหนด (7 วัน) จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ถูกสร้างขึ้นภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยเหลือเส้นใยที่อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยรอบใยบวบ ใยบวบในช่วงนี้จะเรียกว่า “LSM-CM (Loffa sponge matrices-cellulose microfibril)” ซึ่งจะใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักในรอบถัดไป ทำการหมักในลักษณะเช่นนี้จำนวน 9 รอบ ในอาหาร CW medium

3.8 การวางแผนการทดลอง

ทำการวางแผนการทดลองในแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้รอบของการหมักเป็นจำนวนซ้ำ ผลการทดลองจะนำมาวิเคราะห์หา ANOVA และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Tukey’s Test ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การตรวจสอบปริมาณอากาศในระบบการหมักต่อค่า Volumetric mass transfer coefficient (k_La) การเปลี่ยนแปลงของค่า Dissolved oxygen (DO)

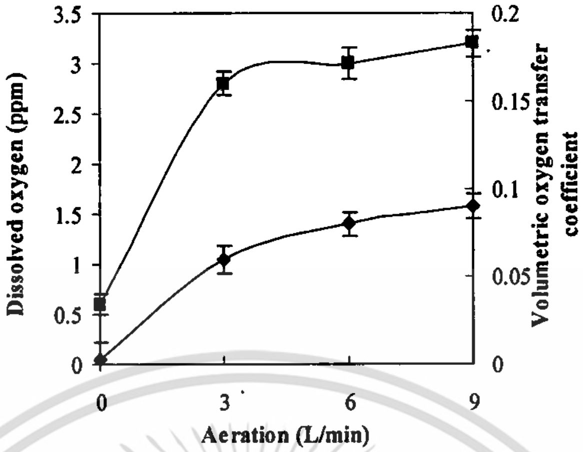
ในกระบวนการสร้าง BC ในสภาพที่มีการให้อากาศ (Submerged production process) นั้นมักพบปัญหาหลายประเด็นที่ทำให้ได้รับผลผลิตเซลลูโลสที่ต่ำหรืออาจไม่มีการสร้างเซลลูโลสเลย (Vandamme *et al.*, 1998) ทั้งนี้การเพิ่มค่า DO ในการเลี้ยงหัวเชื้อ *A. xylinum* ในสภาพที่มีการกวน (Agitated cultivation) หรือ สภาพที่มีการให้อากาศ (Aerobic cultivation) ก่อให้เกิดการลดปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการสร้างของหัวเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาพนิ่ง (Static cultivation) (Tantratian *et al.*, 2005; Chawla *et al.*, 2009) ดังนั้นในการศึกษานี้อัตราการให้อากาศจึงถูกออกแบบเพื่อให้ได้ DO ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการสร้าง BC ภายใต้สภาพการให้อากาศ เพื่อลดผลกระทบเชิงลบ (Negative effect) ของการให้อากาศที่มีต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส BC จากเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* ทั้งนี้จากการศึกษาของผู้เชี่ยวชาญต่างๆ รายงานว่าอัตราการให้อากาศ(Oxygen transfer rate) มักนิยมวัดในค่าของ Volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) ซึ่งจัดเป็นปัจจัยที่เป็นข้อจำกัด (Limiting factor) ของกระบวนการหมักในสภาพการให้อากาศ (Horiuchi *et al.*, 2000; Galacton *et al.*, 2010)

เนื่องจากผลลบ (Negative effect) ของการให้อากาศที่มีต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส (Bacterial cellulose; BC) จากเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาปริมาณอากาศที่เหมาะสมในน้ำหมักของระบบการหมักที่ใช้ในการศึกษาโดยคำนึงถึงค่า Volumetric mass transfer coefficient (k_La) และค่า Dissolved oxygen (DO) เป็นสำคัญ

ผลของการติดตามค่า DO ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium ในสภาพการให้อากาศเท่ากับ 3 6 และ 9 ลิตร/นาที ด้วยเครื่อง HI9146 Microprocessor Dissolved Oxygen Meter (HANNA Instrument inc., Romania) และหาค่า k_La ของระบบการให้อากาศทั้ง 3 สภาวะ ในขวดปิดสนิท (Duran) ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ด้วยวิธี Sodium sulfite oxidation method (Stenstrom, 2007) ผลของการศึกษาแสดงในภาพที่ 4.1

จากภาพที่ 4.1 พบว่า เมื่อให้อากาศเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ค่า k_La สูงขึ้น โดยค่า k_La สูงสุด (0.091 h^{-1}) เมื่อให้อากาศที่ 9 ลิตร/นาที แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) กับค่า k_La ที่ 6 ลิตร/นาที (0.083 h^{-1}) อย่างไรก็ตามค่า k_La ที่ 3 ลิตร/นาที (0.061 h^{-1}) ต่ำกว่าที่ 6 ลิตร/นาที อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า k_La ของระบบการให้อากาศที่ออกแบบใช้ในการศึกษานี้มีค่าค่อนข้างต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 แสดงผลของการให้อากาศต่อปริมาณค่า Dissolved oxygen และค่า Volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) เมื่อมีการให้อากาศในระดับ 3 6 และ 9 ลิตร/นาที เปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่มีการให้อากาศ

ซึ่งน่าจะเหมาะสมและเพียงพอต่อการสร้าง BC ในสภาพที่มีการให้อากาศโดยอาจสามารถลดผลกระทบเชิงลบของการให้อากาศต่อการสร้าง BC ได้ สำหรับการติดตามค่า DO พบว่า ค่า DO สูงสุดในน้ำ (3.2 ppm) เมื่อให้อากาศที่ระดับ 9 ลิตร/นาที และไม่แตกต่างจากที่ระดับ 6 ลิตร/นาที ($p \geq 0.05$) ซึ่งวัดค่า DO ได้เท่ากับ 3.0 ppm ค่า DO ที่วัดได้นี้จะเพิ่มขึ้นได้เมื่ออัตราการให้อากาศเพิ่มขึ้น

ผลของการให้อากาศโดยตรงต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส

ในการศึกษาในหัวข้อนี้ในข้อเสนอโครงการระบุว่าจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ HS medium (Hestrin and Schramm, 1954) อย่างไรก็ตามลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นมามีสีน้ำตาลเข้มหลังการฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงได้ตัดสินใจทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบกับอาหารน้ำมะพร้าว (Coconut water medium) ทั้งนี้เลือกใช้การให้อากาศที่ระดับ 6 ลิตร/นาที ในเปรียบเทียบผลของการสร้าง BC ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบว่า CW medium ให้ผลผลิตสูงกว่า HS medium (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.2) จึงใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบผลของการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Hestrin and Schramm (HS) medium และ Coconut water (CW) medium ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพที่ใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 6 ลิตร/นาที

Parameter	HS medium	CW medium
Cellulose content* (g/L)	0.92^{b}±0.3	1.41^{a}±0.7
Cell content* (g/L)	13.89^{b}±0.5	38.43^{a}±4.8

* Means with different letters within the same row are significantly different ($p \leq 0.05$) according to Tukey's test.

ภาพที่ **4.2** แสดงลักษณะของการหมักเพื่อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพที่ใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 6 ลิตร/นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อ : (ก) Hestrin and Schramm (HS) medium และ (ข) Coconut water (CW) medium

จากผลการศึกษาที่ได้สามารถสรุปเบื้องต้นว่า**อาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter** จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงโอกาสในการเกิดผลกระทบของการให้อากาศทั้ง 3 ระดับต่อการสร้างเซลลูโลสของหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter โดยทำการหมักจำนวน 9 รอบต่อระดับการให้อากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium ผลการศึกษาในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของการให้อากาศต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Coconut water medium ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพที่ใช้อัตราการให้อากาศ 3 ระดับ

Aeration (l/min)	Production cycles	BC^+ Production cycles	Average Cellulose content* (g/l)	BC^- Production cycles	Percentage of Cel^- cycles*	DO (ppm)
0	9	9	$3.93^a±0.7$	0	0^d	0.31
3	9	6	$1.86^b±0.5$	3	33.3^c	2.29
6	9	4	$1.41^c±0.7$	5	55.6^b	2.67
9	9	2	$0.94^d±0.8$	7	77.8^a	2.98

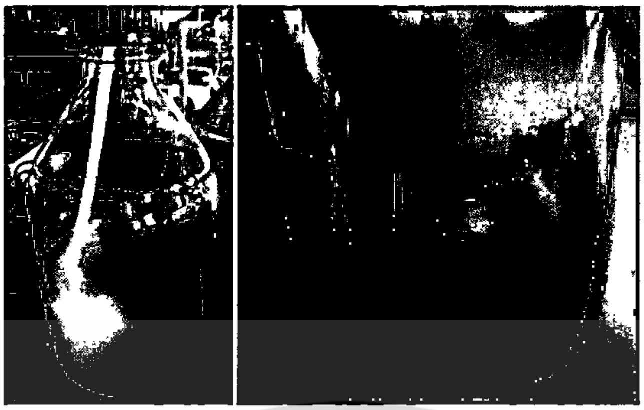
Aeration supply at 0 l min^{-1} is used for BC production in static culture as control. * Average cellulose content was calculated in all BC^+ production cycles of each level of aeration supply. DO was measured at 7 days of fermentation period. Abbreviation: BC^+, cellulose produced; BC^-, non-cellulose produced; DO, dissolved oxygen.

จากผลในตารางที่ 4.2 พบว่า เกิดผลกระทบเชิงลบของการให้อากาศต่อการสร้าง BC ของหัวเชื้อ *A. xylinum* DK โดยเปอร์เซนต์ของจำนวนรอบการผลิตที่ไม่สร้างเซลลูโลส (Non-cellulose (BC^-) production cycles) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจาก 33.3% ที่อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที เป็น 77.8% ที่อัตราการให้อากาศ 9 ลิตรต่อนาที ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ในจำนวนรอบที่มีการสร้างเซลลูโลส (Cellulose (BC^+) production cycles) นั้นมีการสร้างเซลลูโลสลดลงจาก 1.86±0.5 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการให้อากาศ 3 ลิตรต่อนาที เป็น 0.94±0.8 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการให้อากาศ 9 ลิตรต่อนาที และต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อผลิตในสภาพนิ่ง (ไม่มีการให้อากาศ; 3.93±0.7 กรัมต่อลิตร) ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบ ในทางตรงกันข้าม พบว่า ค่า DO ต่ำสุดพบในช่วงสิ้นสุดการหมักในสภาพนิ่ง (0.31 ppm) แต่ค่าสูงสุด (2.98 ppm) พบในอัตราการให้อากาศ 9 ลิตรต่อนาที

จากผลการทดลองที่พบนี้แสดงยืนยันให้เห็นว่าการให้อากาศส่งผลกระทบเชิงลบต่อการสร้าง BC ของหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter โดยระดับการให้อากาศยิ่งสูงจะก่อให้เกิดสภาพการไม่สร้างเซลลูโลส (BC^-) นอกจากนี้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปจะเลือกใช้การให้อากาศในอัตรา 3 ลิตรต่อนาที เนื่องจากสามารถที่ก่อให้เกิดการสร้าง BC ในปริมาณสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการให้อากาศที่สูงขึ้น (ทั้ง 6 และ 9 ลิตรต่อนาที)

สำหรับภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นถึงผลกระทบเชิงลบของการให้อากาศต่อการสร้าง BC จนก่อให้เกิดสภาพการไม่สร้างเซลลูโลส (BC^-) ดังที่กล่าวถึงข้างต้น

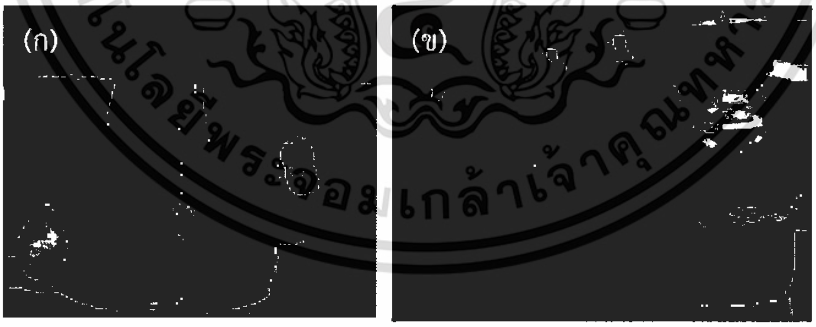
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะของการหมักจากผลกระทบเชิงลบของการให้อากาศต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium จนก่อให้เกิดสภาพการไม่สร้างเซลลูโลส (BC⁻) เมื่อให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

ปริมาณของใยบวบที่มีผลต่อการสร้างสภาพที่เหมาะสมของการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลส

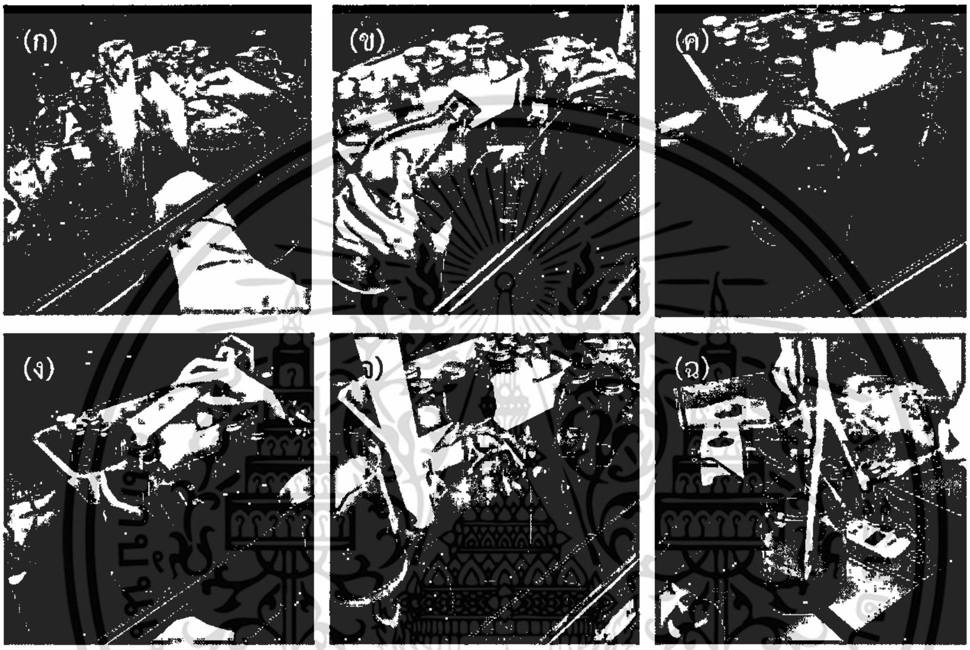
ในการประยุกต์ใช้ใยบวบในการตรึงหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium นั้น ในเบื้องต้นได้ทำการทดลองความเป็นไปได้ในการเติมใยบวบใน CW medium ที่บรรจุในฟลาสก์ (250 มล.) และขวดดูแรนขนาด 500 มล. ให้ผลของการสร้าง BC ดังแสดงในภาพที่ 4.4 ซึ่งแสดงว่าการประยุกต์ใช้ใยบวบสำหรับการสร้าง BC ในสภาพที่มีการให้อากาศมีความเป็นไปได้สูง



ภาพที่ 4.4 แสดงผลของการประยุกต์ใช้ใยบวบในการสร้างเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium เมื่อให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส : (ก) เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มล.; (ข) ขวดดูแรนขนาด 500 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาที่ใช้ใยบวบนี้ได้ทำการตัดใยบวบเป็นชิ้นๆและผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจนปราศจากเชื้อปนเปื้อนและสปอร์ของจุลินทรีย์ ลักษณะของใยบวบที่ใช้แสดงในภาพที่ 3.2 อนึ่งลักษณะของใยบวบที่ใช้งานนี้จะเรียกว่า **"Loffa sponge matrices"** หรือเรียกโดยย่อว่า **"LSM"** (ซึ่งต่อไปจะใช้เรียกตลอดผลการศึกษา) สำหรับภาพที่ 4.5 แสดงถึงขั้นตอนการเตรียม LSM-CM เพื่อพร้อมทำการหมักเพื่อสร้างเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium



ภาพที่ 4.5 แสดงขั้นตอนการเตรียม LSM-CM เพื่อสร้างเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium : (ก) - (ค) การถ่าย LSM (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ลงในขวดดูแลน (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว; ขนาด 2000 มล. ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ; (ง) ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดดูแลนที่บรรจุ LSM ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ; (จ) การถ่ายหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ; (ฉ) การติดตั้งระบบให้อากาศภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

ผลของปริมาณ LSM ที่เหมาะสมต่อการสร้าง BC ในสภาพให้อากาศแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งพบว่าปริมาณเซลลูโลสถูกสร้างเพิ่มมากขึ้นจากผลของ LSM **ที่ถูกหุ้มด้วยเส้นใยเซลลูโลส (Cellulose microfibril) จากหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter** ซึ่งรวมเรียกว่า **"LSM-CM"** อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาพที่ไม่ใช้ LSM (1.86±0.5 กรัม/ลิตร) โดยปริมาณเซลลูโลสสูงสุด (5.24±0.3 กรัม/ลิตร) ได้รับจาก 0.5% LSM-CM นอกจากนี้แล้วปริมาณเซลลูโลสที่ผลิตจาก 0.4% LSM-CM (4.73±0.7 กรัม/ลิตร) จะสูงกว่าที่ได้รับจาก 0.3% (3.84±0.9 กรัม/ลิตร) หรือ 0.2% LSM-CM (2.68±0.3 กรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ที่ 0.2% LSM-CM จะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ 0.1% LSM-CM (2.54±0.8 กรัม/ลิตร) ($p \geq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของปริมาณใยบวบที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสจากหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในสภาพที่ให้อากาศที่ 3 ลิตร/นาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

Parameter	0% LSM	0.1% LSM	0.2% LSM	0.3% LSM	0.4% LSM	0.5% LSM
Cellulose content* (g/l)	1.86[e]±0.5	2.54[d]±0.8	2.68[d]±0.3	3.84[c]±0.9	4.73[b]±0.7	5.24[a]±1.3
Cell content* (g/l)	54.11[e]±6.3	72.43[d]±1.8	78.17[d]±2.3	89.77[c]±2.1	96.98[b]±2.7	101.31[a]±4.2
DO in fermentation medium (ppm)	2.29	1.42	1.17	0.97	0.73	0.71
DO in cellulose formed (ppm)	1.37	0.85	0.82	0.49	0.21	0.21

The *Acetobacter xylinum* DK-cellulose microfibril adsorbed LSM plays as BC producer. * Means with different letters within the same row are significantly different ($p \le 0.05$) according to Tukey's test. Abbreviation: LSM, loffa sponge matrice; DO, dissolved oxygen.

ในสภาพที่มีการใช้ 0.5% LSM-CM จะก่อให้เกิดการลดการเคลื่อนที่ (Fluidity) ของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการให้อากาศ (ที่อัตรา 3 ลิตรต่อนาที) ซึ่งก่อให้เกิดการลดลงของ DO ทั้งในน้ำหมัก (Fermentation medium) และในวุ้นเซลลูโลสที่สร้างขึ้น (Cellulose gel produced) อย่างมีนัยสำคัญ

ส่วนในกรณีของ Total biomass หรือที่เรียกว่า “Cell content” นั้นจะเป็นการติดตามเซลล์อิสระที่อยู่ในน้ำหมักและเซลล์ที่จับอยู่ที่ผิวของ LSM จากผลที่ได้ในตารางที่ 4.3 พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ Cell content อย่างมีนัยสำคัญในสภาพที่ใช้ LSM-CM เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพที่ไม่ใช้ LSM (54.11±6.3 กรัม/ลิตร) โดยค่า Cell content สูงสุด (101.31±4.2 กรัม/ลิตร) ได้รับในสภาพ 0.5% LSM-CM

เมื่อพิจารณาถึงค่า DO ในน้ำหมักดังที่กล่าวถึง ทำให้ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบระบบเพื่อก่อให้เกิด**สภาพแวดล้อมที่มีอากาศน้อย** หรือเรียกว่า **“Microenvironments” ซึ่งมีระดับ DO ต่ำเพื่อเหมาะสมต่อการสร้าง BC ในสภาพการให้อากาศโดยอาศัยใยบวบ** (ซึ่งเป็นวัสดุธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม) นอกจากนี้แล้วใยบวบในลักษณะของ LSM ยังน่าสนใจ เนื่องจากโครงสร้างที่เกี่ยวโยงซับซ้อน (Complex interconnecting porous structure) (Chen *et al.*, 2014) ทำให้สามารถใช้หมุนเวียนได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงสมบัติในการดูดซับที่แข็งแรงอีกด้วย (Bal and Bal, 2004; Ghali *et al.*, 2009) ทั้งนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาของผู้วิจัย พบว่า LSM จัดเป็นวัสดุยึดเกาะ (Supporting material) ที่ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเชื้อแบคทีเรียอะซิติกในสภาพการเลี้ยงในถังหมักหลายประเภท เช่น Air-lift bioreactor (Krusong *et al.*, 2007), Stirred-tank bioreactor (Krusong *et al.*, 2010) และ Reciprocal shaking bioreactor (Krusong *et al.*, 2014)

ในระบบที่ศึกษานี้เลือกใช้ LSM สำหรับสร้าง BC ซึ่งพบว่าให้ผลที่ดีกว่าระบบที่ไม่ใช้ LSM ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยที่ 0.5% LSM-CM ให้ปริมาณเซลลูโลสและ Cell content สูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากสามารถสร้างสภาพ Microenvironment ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ของหัวเชื้อ *A. xylinum* DK ที่สามารถปล่อยเส้นใยเซลลูโลสและสานเป็น Biofilm บนผิวของ LSM จนเกิดเป็น LSM-CM โดยสภาพ LSM-CM นี้จะช่วยลดผลกระทบของการให้อากาศที่ทำให้ค่า DO ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น แต่ไม่กระทบต่อการสร้าง BC โดยไม่ทำให้ผลผลิตเซลลูโลสลดลง (Vandamme *et al.*, 1998) ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของผู้เชี่ยวชาญที่ชี้บ่งว่า Cel^{+} cells ของเชื้อ *A. xylinum* เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสร้าง BC และเมื่อเซลล์สามารถจับเข้ากับที่ผิวของตัวกลางจะช่วยสร้างสภาพแวดล้อม Microenvironment ที่เหมาะสมต่อการสร้าง BC ภายใต้สภาพการให้อากาศ (Joris *et al.*, 1993)

ดังนั้นจึงสามารถสรุปว่า ใยบวบหรือ LSM (0.5% w/v) สามารถช่วยลดความรุนแรงของการให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที ส่งผลให้ DO ลดลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ **0.5% (w/v) LSM** เพื่อก่อให้เกิด **LSM-CM** ที่เป็นแหล่งของเซลล์ของเชื้อ *A. xylinum* DK เนื่องจากสภาพแวดล้อม Microenvironment ที่เหมาะสมต่อการสร้าง BC ในสภาพที่มี**การให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที** สำหรับภาพที่ 4.6 แสดงให้เห็นลักษณะของการสร้างเซลลูโลสจาก LSM-CM ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium

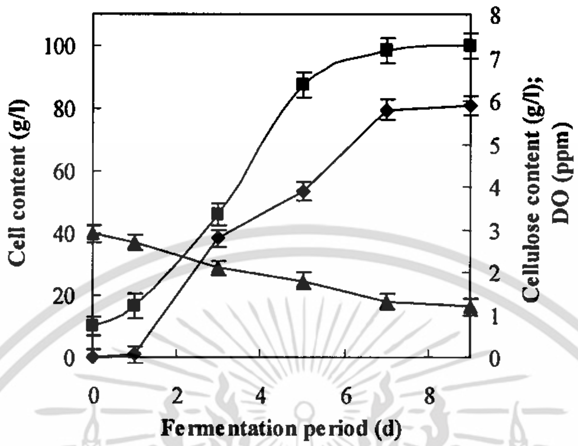
ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะการสร้างเซลลูโลสจาก 0.5% (w/v) LSM-CM ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CW medium ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา : (ก) 3 วัน และ (ข) 7 วัน

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบ

ทำการศึกษาในสภาพที่ใช้ปริมาณใยบวบ(ที่เหมาะสม) 0.5% (w/v) LSM เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ในการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบจากหัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter เกิดเป็น 0.5% (w/v) LSM-CM (Loffa sponge matrices-cellulose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

microfibril) ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ในสภาพที่ให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที ผลของการหมักแสดงในภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 แสดงผลของระยะเวลาต่อการสร้างเซลลูโลสด้วยหัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter โดยใช้ปริมาณใยบวบ (ที่เหมาะสม) 0.5% (w/v) LSM ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ในสภาพที่ให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที : (■) cell content, (♦) cellulose content; (▲) dissolved oxygen

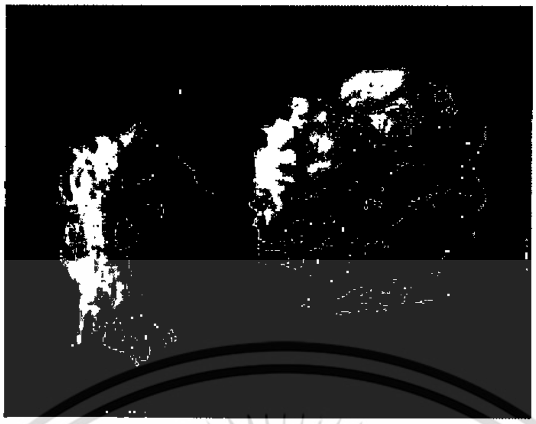
จากภาพที่ 4.7 พบว่า ปริมาณเซลลูโลสสูงสุดได้รับเมื่อการหมักเป็นเวลา 9 วัน (5.9±0.22 กรัม/ลิตร) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) กับผลการหมักที่ 7 วัน (5.8±0.24 กรัม/ลิตร) ขณะเดียวกันปริมาณ Cell content เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า DO พบว่า ลดลงอย่างต่อเนื่องซึ่งสนับสนุนแนวคิดที่ระบุว่าเกิดสภาพแวดล้อม Microenvironment สำหรับการสร้าง BC ในสภาพการให้อากาศที่อัตรา 3 ลิตร/นาที

จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกระยะเวลา 7 วัน สำหรับการสร้าง BC ในการศึกษาถัดไป

การสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการตรึงด้วยใยบวบในระบบการหมักแบบติดต่อกัน

เป้าหมายของการหมักเพื่อสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสแบบติดต่อกัน (Consecutive BC production) คือการพัฒนาระบบการหมักที่อาศัยการเตรียมหัวเชื้อเพียงครั้งเดียว โดยใช้หัวเชื้อ CM- *A. xylinum* DK starter ทำการหมักครั้งแรกโดยใช้ปริมาณใยบวบ(ที่เหมาะสม) 0.5% (w/v) LSM ทำให้เกิด LSM-CM เพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อ *A. xylinum* DK ที่ใช้ในการสร้าง BC ในสภาพที่ให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที จากนั้นเมื่อทำการหมักจนครบเวลาที่กำหนด (7 วัน) จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสที่ถูกสร้างขึ้นภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยเหลือเส้นใยที่อยู่โดยรอบใยบวบหรือเรียกสั้นๆว่า “Re-used LSM-CM” (ภาพที่ 4.8) จะใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักในรอบถัดไป ทำการหมักในลักษณะเช่นนี้จำนวนทั้งสิ้น 9 รอบ ในอาหาร CW medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะของใยบวบ Re-used LSM-CM ที่ได้จากการหมักครั้งที่ 1 แล้วนำมาใช้ในการเป็นหัวเชื้อเพื่อสร้าง BC ในสภาพการหมักแบบติดต่อกัน

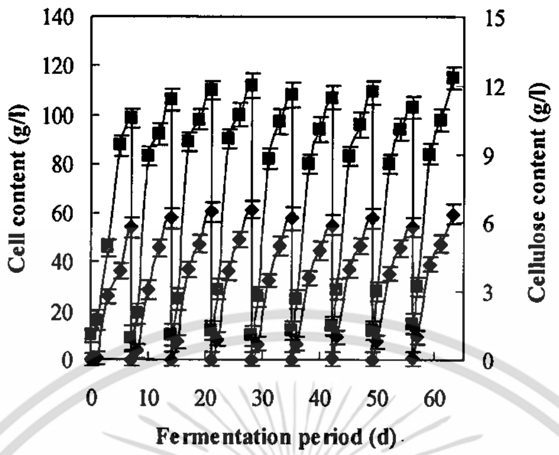
การศึกษาความเป็นไปได้ในการหมักแบบติดต่อกันเพื่อสร้าง BC (Consecutive BC production) นี้จะใช้ Reused LSM-MC (Re-used *A. xylinum* DK-cellulose microfibril enmeshed LSM) โดยต้องเริ่มจากการเตรียม Re-used LSM-CM จากการหมักในรอบที่ 1 ซึ่งทำการหมักใน CW medium ปริมาตร 1000 มล. ในขวดดูแรนขนาด 2000 มล. ที่ใช้ 0.5% LSM-CM (w/v) และให้อากาศที่อัตรา 3 ลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส โดยใช้หัวเชื้อ CM-*A. xylinum* starter ในปริมาณ 5% (v/v) ทั้งนี้ลักษณะของ Re-used LSM-CM ที่ได้เมื่อสิ้นสุดการหมักรอบที่ 1 แสดงในภาพที่ 4.8 ผลของการหมักทั้งรอบที่ 1 และอีก 8 รอบ (รวมทั้งหมด 9 รอบของการหมักแบบติดต่อกัน) แสดงในภาพที่ 4.9ก พบว่า มีการสร้าง BC ได้ในทุกรอบของการหมัก โดยในรอบแรกสร้างได้ 5.8±0.45 กรัม/ลิตร ในขณะที่รอบการหมักที่ติดต่อกัน (รอบที่ 2 ถึง 9) ที่หมักด้วย Re-used LSM-CM สามารถสร้างเซลลูโลสได้ระหว่าง 4.9±0.35 - 6.6±0.40 กรัม/ลิตร อนึ่งในการหมักแบบติดต่อกันทั้งรอบที่ 2 ถึง 9 นั้น ปริมาณเซลลูโลสในช่วงเริ่มต้นของแต่ละรอบจะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.01±0.002-0.04±0.001 กรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณที่สูงกว่าในรอบที่ 1 ที่ใช้ LSM-CM เริ่มแรก (0.005±0.0004 กรัม/ลิตร)

ในกรณีของ Cell content (ภาพที่ 4.9ก) พบว่า Cell content ในแต่ละรอบของของการหมักแบบติดต่อกันรอบที่ 2 ถึง 9 จะเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นระหว่าง 8.9±5.0 - 15±4.0 กรัม/ลิตร เป็น 92±4.5 - 115±4.5 กรัม/ลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักในแต่ละรอบ (วันที่ 7 ของการหมัก) นอกจากนี้ในสภาพที่ให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที นั้น DO เฉลี่ยจะลดลงอย่างรวดเร็วในแต่ละรอบโดยในช่วงเริ่มต้นของแต่ละรอบจะมีค่า DO อยู่ในช่วงระหว่าง 2.9-3.0 ppm ขณะที่เมื่อสิ้นสุดมีค่า DO อยู่ระหว่าง 0.6-1.3 ppm (ภาพที่ 4.9ข)

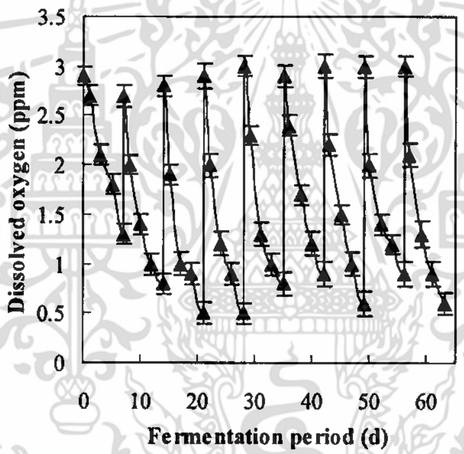
จากผลการศึกษาของการหมักเพื่อสร้าง BC ในการหมักแบบติดต่อกันนี้ สามารถสรุปได้ว่า **LSM และ CM ซึ่งก่อให้เกิด LSM-CM ช่วยสร้างสภาพแวดล้อมแบบ Microenvironment ที่ก่อให้เกิดสภาพที่มี DO ต่ำที่เหมาะต่อการสร้าง BC ของหัวเชื้อ *A. xylinum* DK**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



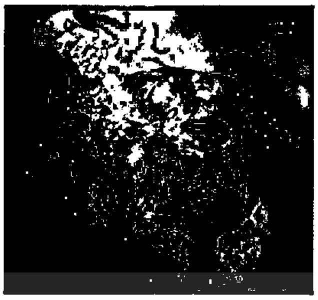
(ข)



ภาพที่ 4.9 แสดงการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสในการหมักแบบติดต่อกันด้วยหัวเชื้อ Reused LSM-CM (Reused loffa sponge matrice-cellulose microfibril ของ *Acetobacter xylinum* DK) ใน CW medium ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส : การเปลี่ยนแปลงของ (ก) (■) cell content, (♦) cellulose content และ (ข) (▲) dissolved oxygen
หมายเหตุ : การหมักแต่ละรอบใช้เวลา 7 วัน และค่าที่ระบุเป็น means ± standard deviation ของการหมัก 3 ซ้ำ

ในระหว่างการหมัก BC แบบติดต่อกัน (Consecutive BC fermentation) ด้วย LSM-CM ในช่วงรอบที่ 3 ของการหมักจะทำการสุ่มตัวอย่าง LSM-CM (ภาพที่ 4.10) เพื่อนำไปถ่ายภาพด้วย Scanning electron microscope ด้วย เครื่อง JEOL JSM-5410LV (JEOL, Tokyo, Japan) SEM (ภาพที่ 4.11ก-ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 แสดงลักษณะ LSM-CM (อบแห้ง) ที่ได้จากการหมักแบบติดต่อกัน

ภาพที่ 4.11 แสดง SEM images ของ Cellulose microfibril (CM)-*Acetobacter xylinum* DK ที่จับกับใยบวบ (Loffa sponge matrice; LSM) เพื่อก่อให้เกิด LSM-CM : (ก) BC ที่สร้างขึ้นจากเซลล์และ CM ที่หุ้มภายนอกของผิว LSM (ลูกศรชี้) (x302 magnification), (ข) CM ที่มีเซลล์ปริมาณมาก (ลูกศรชี้) ที่จับกับ CM (x20000 magnification), และ (ค) ปริมาณเซลล์ *A. xylinum* DK (ลูกศรชี้) ที่อยู่ที่ CM (x40000 Magnification)

ภาพที่ 4.11ก แสดงให้เห็นถึง BC ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ *A. xylinum* DK และเส้นใยเซลลูโลส (Cellulose microfibril; CM) ที่จับกับผิวด้านนอกของ LSM ในขณะที่ภาพที่ 4.11ข แสดงให้เห็น CM และเซลล์จำนวนมากของเชื้อ *A. xylinum* DK ที่จับกับ LSM ส่วนภาพที่ 4.11ค แสดงให้เห็นเซลล์ *A. xylinum* DK ปริมาณมากซึ่งจับอยู่กับ CM ที่หุ้มบน LSM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพ SEM images (ภาพที่ 4.11ก-4.11ค) จากขั้นตอนการหมักเพื่อสร้าง BC ด้วย Re-used LSM-CM แสดงให้เห็นว่า LSM-CM เป็นแหล่งของการเพิ่มจำนวนของหัวเชื้อ *A. xylinum* DK ในระหว่างสร้าง BC ผลการทดลองที่ได้นี้คล้ายคลึงกับที่ de Ory *et al.* (2004) ได้รายงานว่าการใช้ตัวกลาง (Carrier) ที่มีรูหรือโพรงขนาดใหญ่กว่าตัวเซลล์แบคทีเรียอะซิติกจะก่อให้เกิดโอกาสของเซลล์ที่จะยึดเกาะในรูหรือโพรงนั้น นอกจากนี้ SEM images (ภาพที่ 4.11ค) ยังช่วยยืนยันผลของตารางที่ 3 ซึ่งรายงานว่าพบปริมาณเซลล์สูง (ในรูปของ Cell content) ซึ่งส่งผลให้เพิ่มการสร้าง BC ขึ้นมา เนื่องจากปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียอะซิติกที่สูง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การออกแบบระบบการให้อากาศสำหรับการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสถือว่ามีความสำคัญและจำเป็นต่อปริมาณเซลลูโลสที่จะสร้าง ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ คือ การส่งถ่ายออกซิเจนที่เพียงพอแก่เซลล์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์เซลลูโลส แต่ในขณะเดียวกันถ้าให้อากาศในปริมาณที่มากเกินไปก็จะส่งผลเชิงลบ (Negative effect) ต่อประสิทธิภาพการสร้างเส้นใยเซลลูโลสของเซลล์แบคทีเรียเช่นกัน ทั้งนี้มีรายงานว่า **เซลล์ที่สามารถผลิตเซลลูโลส (Cellulose producing cells; Cel^{+})** สามารถเปลี่ยนเป็น**เซลล์ที่ไม่สามารถสร้างเซลลูโลส (Non-cellulose producing cells; Cel^{-})** ได้ในสภาพที่ให้อากาศโดยตรงในระหว่างการหมัก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ออกแบบระบบการหมักให้สามารถฟื้นคืนความสามารถในการสร้างเซลลูโลสของเซลล์เมื่อเปรียบกับการสร้างเซลลูโลสในสภาพการหมักแบบนิ่ง (Static cultivation) ซึ่งหมายความว่าระบบการหมักที่ทำการศึกษาสามารถที่จะต่อต้านผลเชิงลบของการให้อากาศที่มีต่อการสร้างเซลลูโลสของเซลล์ของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* DK ที่ใช้ได้ ดังนั้นในการศึกษาจึงเลือกระบบที่ให้อากาศโดยควบคุมปริมาณ Volumetric oxygen transfer rate (k_La) ที่เหมาะสมเพื่อสร้างสภาพแวดล้อมในการหมักให้เป็น **"Microenvironment surroundings"** ซึ่งมีค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (Dissolved oxygen; DO) ในระดับต่ำที่เพียงพอต่อการสร้างเซลลูโลสของเซลล์ นอกจากนี้เนื่องจากปริมาณการสร้างเซลลูโลสสัมพันธ์โดยตรงต่อปริมาณเซลล์ของเชื้อ *A. xylinum* ดังนั้นจึงได้พัฒนาระบบการหมักที่สามารถเพิ่มปริมาณของเซลล์ให้สูงได้โดยอาศัยการใช้เส้นใยเซลลูโลสที่ปล่อยจากเชื้อ *A. xylinum* มาจับกับใยบวบที่ผ่านการตัดแต่งซึ่งเรียกว่า **"Loffa sponge matric; LSM"** (ผ่านการฆ่าเชื้ออย่างสมบูรณ์) จนเกิดเป็น LSM-CM (Cellulose microfibril enmeshed LSM) ซึ่งทำหน้าที่เปรียบเสมือนแหล่งของการเพิ่มเซลล์ ผลที่ได้จากการใช้ LSM-CM นี้ทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตของเซลลูโลสที่สร้างจากเชื้อ *A. xylinum* DK ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังค้นพบอีกว่า ความเสถียรของ LSM-CM สามารถนำกลับมาใช้เป็นหัวเชื้อได้อีกครั้งหลังการเก็บเกี่ยวเซลลูโลสออกไป จึงทำให้ประสบความสำเร็จในการสร้างระบบการผลิตเซลลูโลสในระบบการหมักที่เรียกว่า **"กระบวนการสร้างแบคทีเรียเซลลูโลสด้วยการหมักแบบติดต่อกัน (Consecutive bacterial cellulose production process)"** โดยอาศัย **"Re-used LSM-CM"**

สำหรับผลการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้

5.1.1 การให้อากาศส่งผลกระทบเชิงลบ (Negative effect) ต่อการสร้างเซลลูโลสของแบคทีเรีย *A. xylinum* DK

5.1.2 การเตรียมหัวเชื้อในลักษณะเส้นใยเซลลูโลส (Cellulose microfibril) หรือ ที่เรียกว่า **"CM-*A. xylinum* DK"** มีความหมาะสมต่อการสร้างเซลลูโลสในสภาพการให้อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.3 ใยบวบ (loffa sponge) ในลักษณะของ **Loffa sponge matrice (LSM)** จัดเป็น Biodegradable supporting material สำหรับหัวเชื้อ CM-*A. xylinum* DK ได้อย่างมีประสิทธิภาพในลักษณะที่เรียกว่า **"LSM-CM (cellulose microfibril enmeshed loffa sponge matrices)"** เพื่อใช้เป็นแหล่งของเซลล์ *A. xylinum* DK ในการสร้างเซลลูโลส

5.1.4 สภาพที่เหมาะสมในการสร้างเซลลูโลสภายใต้สภาพที่ให้อากาศ ประกอบด้วย **อาหารน้ำมะพร้าว** (Coconut water medium; น้ำมะพร้าวเติมน้ำตาลซูโครส 5% ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) **ใยบวบ** (ขนาด 1.5 ซม. x 1.5 ซม. x 1.5 ซม. ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 2 รอบ) ปริมาณ 0.5% (w/v) **หัวเชื้อ CM-*A. xylinum* DK** ปริมาตร 5% (v/v) และ**ให้อากาศที่อัตรา 3 ลิตร/นาที** ระยะเวลาการหมักต่อรอบเท่ากับ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

5.1.5 **ขั้นตอนการหมักเพื่อสร้างเซลลูโลสด้วยการหมักแบบติดต่อกัน (Consecutive BC production process)** ด้วยการใช้ Re-used LSM-CM เป็นหัวเชื้อในการหมักจัดได้ว่าประสบความสำเร็จและสามารถผลิตเซลลูโลสได้อย่างต่อเนื่อง จัดได้ว่าเป็น**นวัตกรรมของการสร้างเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum***

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากกระบวนการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *A. xylinum* มีโอกาสในการปนเปื้อนสูงมาก ดังนั้นการปฏิบัติงานจะต้องควบคุมการทำงานในด้าน Aseptic technique ให้มีประสิทธิภาพ อีกทั้งใยบวบก็เป็นวัสดุชีวภาพที่มีโอกาสของการปนเปื้อนสูงเช่นกัน ประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในใยบวบก่อนใช้งานจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องพิจารณาและคำนึงถึงเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สิริกุล วะสี. 2548. สารพัดบวบ. นิทรรศการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ "เกษตรนำชาติ ศาสตร์ที่ยั่งยืน คืนทรัพยากรสู่ชุมชน" ในงานวันเกษตรแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2548. วันที่ 28 มกราคม – 5 กุมภาพันธ์ 2548. Available at http://www.rdi.ku.ac.th/exhibition/Year2548/01-KasetNational/Project/ index_84.htm. Accessed Date 18 January 2008.

วราวุฒิ ครูส่ง นฤมล ชูวัฒนะเดช เชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และ อินทิรา ปรุงเลิศบัวทอง. 2535. การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 10: 46-60.

วราวุฒิ ครูส่ง กรวิกา สุขศรีวงษ์ และ ปนัดดา พวงเกษม. 2536. การผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในน้ำหางนม. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 1 : 47-54.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. การผลิตเซลลูโลสเสริมสุขภาพจากน้ำกากส่า. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 34 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง สุเมธ ตันตระเธียร และ ศุภสร พัฒนอักษร. 2540. การผลิตคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสที่ได้จาก *Acetobacter xylinum*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไปประจำปี 2539-40. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 30 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง อพัชชา จินดาประเสริฐ และ Toshiomi Yoshida. 2546. การพัฒนากระบวนการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท โครงการความร่วมมือต่างประเทศ (ไทย – ญี่ปุ่น) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 144 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2551. การบริหารจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม. สถาบันอาหาร. 184หน้า.

Akhtar, N., Saeed, A. and Iqbal, M. 2003. Chlorella sorokiniana immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrical*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. *Bioresource Technology.* 88: 163-165.

Bae, S., Sugano, Y. and Shoda, M. 2004. Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 97: 33-38.

Bal, K.E. and Bal, Y. 2004. Gross morphology and absorption capacity of cell-fibers from the fibrous vascular system of loofah (*Luffa cylindrica*). *Textile Research Journal.* 74: 241-247.

Brodelius, P. and Vndamme, E.J. 1987. Immobilized Cell Systems. In. H.J. Rehm and G. Reed (Eds.). Biotechnology. Vol.7A. (pp. 405-464). Verlag Chemie: Germany.

Byrom, D. 1991. Microbial Cellulose. (pp. 263-283). In. D. Byrom (ed.). Biomaterials. Macmillan Publishers: New York.

Çakar, F., Özer, I., Aytekin, A.Ö. and Şahin, F. 2014. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate Polymers.* 106: 7-13.

Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. and Singhal, R.S. (2009) Microbial cellulose: fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology.* 47:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

107-124.

Chen, J.P., Yu, S.C., Hsu, B.R.S., Fu, S.H. and Liu, H.S. 2003. Loofa sponge as a scaffold for the culture of human hepatocyte cell line. *Biotechnology Progress.*19: 522-527.

Chen, Q., Shi, Q., Gorb, S.N. and Li, Z. 2014. A multiscale study on the structure and mechanical properties of the luffa sponge from *Luffa cylindrica* plant. *Journal of Biomechanics.* 47: 1332-1339.

Cook, K.E. and Colvin, J.R. 1980. Evidence for a beneficial influence of cellulose production on growth of *Acetobacter xylinum* in liquid medium. *Current Microbiology.* 3: 203-205.

de Ory, I., Romero, L.E. and Cantero, D. 2003. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood Chips and polyurethan foam as Carriers for *Acetobacter aceti. Process Biochemistry.* 39: 547-555.

de Ory, I., Romeo, L.E. and Cantero, D. 2004. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti. Process Biochemistry.* 39: 547-555.

European Patent EP0121981. 1981. Immobilized Cell Composite and Process Using Said Composite. Available at http://www.freepatentsonline.com/EP0121981A1.html. Accessed Date 14 September 2012.

Galacton, A.R., Cascaval, D. and Cămărut, S. 2010. Analysis of distribution of oxygen transfer rate in stirred bioreactors for yeast broths. *Romanian Biotechnological Letters.* 15: 5423-5435.

Ganguly, R., Dwivedi, P. and Singh, R.P. 2007. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. *Bioresource Technology.* 98: 1246-1251.

Ghali, L., Msahli, S., Zidi, M. and Sakli, F. 2009. Effect of pre-treatment of Luffa fibres on the structural properties. *Materials Letters.* 63: 61-63.

Hestrin, S. and Schramm, M. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freezed-dried all polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal.* 58: 345-352.

Horiuchi, J., Tabata, K., Kanno, T. and Kobayashi, M. 2000. Continuous acetic acid production by a packed bed bioreactor employing charcoal pellets derived from waste mushroom medium. *Journal of Bioscience and Biotechnology.* 89: 126-130.

http://www.luffa.info/. Luffa info. Accessed Date 18 January 2008.

http://www.wipo.int./pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2000%2F06210&WO=2000%2F06210&DISPLAY=DESC. Accessed Date 18 January 2008.

Joris, K.F., Wulfand, B.P. and Vandamme, E. 1993. Enhanced bacterial cellulose yield in aerated *Acetobacter xylinum* culture by adding micro-particles. pp. 239-245. In. Kennedy,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

J.F., Philips, G.O. and William, P.A. (Ed.) *Cellulosic Material for Selective Separation and Other Technology*. Ellis Horwood: London.

Jung, J.Y., Park, J.K. and Chang, H.N. 2005. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology.* 37: 347-354.

Kang, Y.H., Kim, B.R., Choi, H.J., Seo, J.G., Kim, B.H. and Han, M.S. 2007. Enhancement of algicidal activity by immobilization of algicidal bacteria antagonistic to *Stephanodiscus hantzschii* (Bacillariophyceae). *Journal of Applied Microbiology.* 103: 1983-1994.

Kocher, G.S., Kalra, K.L. and Phutela, R.P.. 2006. Comparative production of sugarcane vinegar by different immobilization techniques. *Journal of the Institute of Brewing.* 112: 264-266.

Kouda, T., Naritomi, T., Yano, H. and Yoshinaga, F. 1998. Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85: 318-321.

Krishnan, S., Gowthaman, M.K., Misra, M.C. and Karanth, N.G. 2001. Chitosan-treated polypropylene matrix as immobilization support for lactic acid production using *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 76: 461-468.

Krusong, W., Takagi, M., Nakajima, M. and Yoshida, T. 1996. Monitoring on dissolved oxygen content during cellulose gel formation in static and agitated cultures of *Acetobacter xylinum*. *Annual Report of ICBiotech.* 19: 707-712.

Krusong, W., Phapinyo, N., Takagi, M., Nakajima, M. and Yoshida, T. 1999. Multi-effect of aeration and agitation on bacterial cellulose gel formation by *Acetobacter xylinum* DK strain. International Conference on Asian Network on Microbial Researches, Chiangmai Plaza Hotel, 29 November - 1 December 1999, Thailand. pp 140-146.

Krusong, W., Jindaprasert, A. and Yoshida, T. 2001. *Acetobacter xylinum* DK : a cellulose gel producing strain with two distinctive types of colony for agitated cultivation. *King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Journal.* 62: 25-28.

Krusong, W., Vongchareonsathit, A., Farpinyo, N. and Yoshida, T. 2003. Static cellulose microfibril attachment matrix process for improvement bacterial cellulose gel production by *Acetobacter xylinum* DK in continuous stirred tank reactor. Proceedings of the 1st International Symposium on Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety. P-15, 8 pages.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krusong, W., Jindaprasert, A. and Yoshida, T. 2004. Accumulation of cellulose gel by *Acetobacter xylinum* DK on static cellulose microfibril attachment matrix in airlift cultivation. *Thai Journal of Biotechnology.* 5: 43-50.

Krusong, W., Vichitraka, A. and Pornpakdeewattana, S. 2007. Luffa Sponge as supporting material of *Acetobacter aceti* WK for corn vinegar production in semi-continuous process. *KMITL Science Journal.* 7: 63-68.

Krusong, W., Petch-nom, P. and Pinviset, P. 2010. Semi-continuous production process of corn vinegar in stirred tank reactor using fixation of *Acetobacter aceti* WK on surface of loffa sponge. *Kasetsart Journal (Natural Science).* 44: 201-207.

Krusong, W. and Vichitraka, A. 2011. An air-lift acetifier with mash recycling system for corn vinegar production by adsorbed cells of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science IPCBEE, vol.7, 86-90.

Krusong, W. and Tantratian, S. 2014. Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker. *Journal of Applied Microbiology.* 117: 1348-1357.

Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jezierska, A., Gonçaves-MiŚkiewicz, M., Turkiewicz, M. and Bielecki, S. 2002. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 29: 189-195.

Lin, D., Lopez-Sanchez, P., Li, R. and Li, Z.. 2014. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. *Bioresource Technology.* 151: 113-119.

Liu, K., Seki, M. and Furusaki, S. 1999. Plant cell immobilization in loofa sponge using two-way bubble circular system. *Journal of Chemical Engineering.* 32: 8-14.

Ogbonna, J.C., Tomiyama, S., Liu, Y. and Tanaka, H. 1997. Efficient production of ethanol by cells immobilized in Loofa (*Luffa cylindrical*) Sponge. *Journal of Fermentation and Biotechnology.* 84: 271-274.

Pekdemir, T., Keskinler, B., Yildiz, E. and Akay, G. 2003. Process intensification in wastewater treatment: ferrous iron removal by a sustainable membrane bioreactor system. *LinkedIn group to get updates on top.* 78: 773-780.

Sakurai, A., Nishida, Y., Saito, H. and Sakakibara, M. 2000. Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 90: 526-529.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schwartz, J.P., Souza Jr., J.A.D., Santos, E.B.D. and Kozlowski Jr., V.A. 2007. Biofilm Control in Total Dentures with Vegetable Sponge. Available at http://iadr.confex.com/iadr/2007 orleans/techprogram/abstract_90078.htm. Accessed Date 14 August 2008.

Somporn, M., Kawabata, K., Tanaka, S., Toyama, H., Adachi, O. and Matsushita, K. 2002. A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93: 192-200.

Stenstrom, M. 2007. Measurement of Oxygen Transfer in Clean Water. Standards ASCE/EWRI 2-06. 42pp. American Society of Civil Engineers, USA.

Tantratian, S., Tammarate, P., Krusong, W., Bhattarakosol, P. and Phunsri, A. 2005. Effect of dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter* sp. *The Journal of Scientific Research Chulalongkorn University*. 30: 179-186.

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

Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. and De Wulf, P. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its applicable potential. *Polymer Degradation and Stability*. 59: 93-99.

Vignoli, J.A., Celligoi, M.A.P.C. and Silva, R.S.F. 2006. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrical*. *Process Biochemistry*. 41: 240-243.

Williums, W.S. and Cannon, R.E. 1989. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 2448-2452.

WO/2000/006210. 2000. Method for the Manufacture of Antimicrobial Articles. Available at http://www.wipo.int./pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2000%2F06210&WO=2000% 2F06210 &DISPLAY=DESC. Accessed Date 18 January 2008.

WO/2002/068578. 2002. Fibrous inert support for fermentation of clear beer and wine. Available at http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=US2002005188&DISPLAY=DESC: Accessed Date 21 April 2012.

Wu, R.Q., Li, Z.X., Yang, J.P., Xing, X.H., Shao, D.Y. and Xing, K.I. 2010. Mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment: a useful method to improve the bacterial cellulose yield of a *Gluconaacetobacter xylinus* strain. *Cellulose*. 17: 399-405.

Yang, Y., Tada, C., Miah, M.S., Tsukahara, K., Yagishita, T. and Sawayama, S. 2004. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Materials Science and Engineering*. 24: 413-419.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y. and Uryu, M.. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*. 24 : 3141-3145.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

วิธีวิเคราะห์

1. ค่าน้ำหนักของวุ้นเซลลูโลส

นำวุ้นเซลลูโลสที่ได้จากการบ่มมาล้างด้วยน้ำสะอาดและคอยเปลี่ยนถ่ายน้ำจนกระทั่งวุ้นมีสีขาว ไม่มีกลิ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นการเอาน้ำตาลออกจากวุ้นเซลลูโลส นำวุ้นที่ได้มาชั่งน้ำหนักบนเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ BEC THAI รุ่น TP-1102 บริษัท BECTHAI Bangkok Equipment & Chemical ประเทศไทย

2. ค่าเซลลูโลสและปริมาณเซลล์ (Krusong *et al.*,2001)

นำเซลลูโลสได้จากการนำชิ้นวุ้นเซลลูโลสที่ได้มาล้างน้ำสะอาดจนหมดน้ำตาล แล้วนำมาแช่ในสารละลาย NaOH 2% ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างน้ำสะอาดอีกครั้งและอบวุ้นเซลลูโลสข้ามคืน โดยใช้อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ใช้น้ำหนักที่ได้หลังจากการทั้งไว้ให้เย็นหลังการอบที่อุณหภูมิห้อง มีหน่วยเป็นกรัมเซลลูโลส ของน้ำหนักแห้งต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค่า Cell content ได้จาก

Cell content = (น้ำหนักเซลลูโลสก่อนแช่ NaOH) – (น้ำหนักเซลลูโลสหลังแช่ NaOH)

3. ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Ranganna, 1986)

ใช้ Hand Refractometer วัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ โดยวิธีการวัดค่าทำได้โดยการหยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการวัดลงแผ่นปริซึมปิดด้วยแผ่นปิด โดยอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นต้องทั่วแผ่นปริซึมจากนั้นทำการส่องมองผ่านช่องในที่มีแสง อ่านสเกลที่ได้ผ่านทาง eyepiece โดยอ่านสเกลที่ได้ในสีที่ตัดกัน จากนั้นเช็ดทำความสะอาดแผ่นปริซึมด้วยกระดาษทิชชู่ชุบน้ำ

4. ค่าปริมาณออกซิเจนในน้ำ (Dissoved Oxygen, DO)

วิธีการใช้งาน DO Meter

1. คลายเกลียวเมมเบรน เติมน้ำยาอิเล็คโทรไลท์ในเมมเบรน แล้วปิดให้สนิท เปิดเครื่องวัด DO วางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เครื่องจะปิดเอง (สำหรับการใช้งานครั้งแรก)

2. เปิดเครื่อง กดปุ่ม “CAL” หลังจากนั้นค่าที่โชว์อุณหภูมิจะขึ้น “100” และกระพริบ วางเครื่องไว้นิ่งๆ ห้ามเขย่า รอประมาณ 3-5 นาที ค่าจะนิ่ง แล้วกดปุ่ม “YES” เพื่อยืนยัน

   (*การเติมน้ำยาในเมมเบรนไม่ควรทำในที่มีลม)

3. จุ่มหัววัดลงไปในน้ำหมัก (ควรใช้หัววัดกวนน้ำหมักเล็กน้อย) รอค่าให้นิ่ง อ่านค่าและจดบันทึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ในกรณีที่ไม่ได้ใช้เป็นเวลานาน ก่อนนำมาใช้ควรล้างหัววัดและเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษทิชชู่ให้แห้ง

(*ในกรณีที่ไม่ได้ใช้เป็นเวลานานควรถอดแบตเตอรี่ออก)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร.วราวุฒิ ครูส่ง............

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph.D	Food Science	University of the Philippines at Los Banos	2533
วท.ม	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2528
วท.บ	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2525

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)...

(1) การพัฒนากระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

(2) จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร

(3) การยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2558	รางวัลเชิดชูเกียรติผู้มีผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติสูงสุด ประจำปี 2558	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2557	รางวัลเชิดชูเกียรตินักวิจัยที่ได้รับเงินทุนวิจัยสนับสนุนจากแหล่งทุนภายนอกสูงสุด (พ.ศ. 2553-2555)	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2556	รางวัลนักวิจัยที่สร้างชื่อเสียงให้คณะ	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2556	รางวัลครูดีเด่น	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	รางวัลบุคคลที่ทำคุณประโยชน์และชื่อเสียงให้แก่สถาบัน	สภาคณาจารย์และพนักงาน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	รางวัลอาจารย์ดีเด่นประจำปี 2555	คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	รางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกลยอดเยี่ยม รางวัลที่ 1 สาขาเครื่องจักรกลการผลิต ในการประกวดรางวัลเทคโนโลยีเครื่องจักรกล	กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ยอดเยี่ยม ประจำปี 2554	
2551	Professional Award ชนะเลิศอันดับสาม โครงการ IRPUS ประจำปี 2551	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2550	Best iTAP Partnership Award	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย (iTAP) ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี (TMC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

ทุนวิจัยที่กำลังได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2556-59	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากข้าวไร่และการใช้ประโยชน์	กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2556-57	การเพิ่มประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2556	การพัฒนาและการให้คำปรึกษากระบวนการผลิตวุ้นเซลลูโลสจากน้ำสับปะรดที่เป็นผลพลอยได้	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2555-56	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากมะม่วง	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2555-56	การเลี้ยงเส้นใยเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont ในสภาพอาหารเหลวด้วยถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศเพื่อเป็นแหล่งเอนไซม์ย่อยสลายเปลือกข้าวโพดฝักอ่อน	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2555	การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผักกาดเขียวปลีที่เหลือใช้	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2554-55	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากสับปะรดนางแล-ภูแลในระบบกึ่งต่อเนื่อง	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		แห่งชาติ
2554-55	การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* สป๕ เพื่อผลิตกรดได้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2553-54	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำต้มแห้วที่เป็นผลพลอยได้	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2553-54	การปรับสภาพหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ให้ทนความเข้มข้นกรดสูงด้วยเทคนิค Repeated Fed Batch	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2553-54	การคงเสถียรภาพของหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* สป5 เ ผลิตกรดและทนกรด 10-12% และการใช้น้ำแครอทเพื่อช่ เพิ่มประสิทธิภาพการหมักน้ำส้มสายชู	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2552-53	การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติกของ *Acetobacter aceti* WK ที่ตรึงเซลล์ด้วยใยบวบในถังหมักแบบยกอากาศ	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2552-53	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเศษเหลือใช้จากกระบวนการผลิตมะเขือเทศเข้มข้น	บริษัท โรซ่าเกษตรอุตสาหกรรม จำกัด
2552-53	การพัฒนาหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* สป5 ให้มีประสิทธิภาพการสร้างกรด 10-12% ในถังหมักน้ำส้มสายชู High Speed Agitation ขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2551-52	การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยข้าวด้วยโคจิข้าวของเชื้อรา *Amylomyces* spp. DK	โครงงาน IRPUS สกว.
2551-52	การผลิตวุ้นเซลลูโลสสีแดงโดยอาศัยการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus purpureus* ในน้ำลวกข้าวโพดฝักอ่อน	โครงงาน IRPUS สกว.
2551-52	น้ำส้มสายชูหมักจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตน้ำผักและผลไม้: กากแครอท	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2551-52	การเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมักขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2551-52	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* บนผิวของสตรอเบอร์รี่สดด้วยน้ำส้มสายชูหมัก	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2551	การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เพื่อใช้ในการผลิตเทมเป้จากถั่วเหลืองอินทรีย์สำหรับเป็นวัตถุดิบอาหารสุขภาพ	โครงการ IRPUS สกว.
2551	ผลของออกซิเจนต่อการเพิ่มอัตราการสร้างกรดอะซิติกจากแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* WK ในระบบหมุน	โครงการ IRPUS สกว.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	วนน้ำหมัก	
2550-51	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเกษตรอินทรีย์	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2550-51	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักในถังหมัก High Speed Agitation ขนาด 600 ลิตร	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2550-51	การสร้างฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียอะซิติกบนซังข้าวโพดในระดับห้องปฏิบัติการ	งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2550	การหมักไซเลทจากเศษข้าวโพดฝักอ่อน เศษข้าวโพดหวานผสมกับยีสต์ที่เหลือจากการผลิตไวน์	โครงงาน IRPUS สกว.
2550	การใช้ประโยชน์จากยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์เพื่อทดแทนยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักไวน์และน้ำส้มสายชูจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน	โครงงาน IRPUS สกว.
2549-50	การลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* Anatum บนเนื้อสุกรสดด้วยกรดอะซิติก	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2549-50	น้ำส้มสายชูจากเปลือกและเนื้อมะม่วงเพื่อเอกลักษณ์ไทย	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2550	การปรับปรุงหัวเชื้อสำหรับหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์ข้าว	งบประมาณเงินรายได้ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2548-50	การพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชูหมักเพื่อรองรับเทคโนโลยีผลิตน้ำส้มสายชูจากต่างชาติ	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2548-49	ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูระบบ Single Stage	งบประมาณเงินรายได้ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.
2547-48	การปรับสภาพเชื้อ *Acetobacter sp.* สป5 ให้ปราศจากเจลสำหรับกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจาก น้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน	บริษัท แอกโกร – ออน (ประเทศไทย) จำกัด
2547-48	การออกแบบและสร้างเตาอบปลาด้วยอินฟราเรดแบบสายการผลิตต่อเนื่อง (ผู้ร่วมวิจัย)	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2547-48	การออกแบบและสร้างสายการผลิตแบบต่อเนื่องในภาคอุตสาหกรรม (ผู้ร่วมวิจัย)	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2547-48	การยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ขนมไทย	โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของ อุตสาหกรรมไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ
2547	การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลตติกจากกากถั่วเหลืองที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองและสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการหมักกากถั่วเหลืองเพื่อเป็นอาหารสัตว์	โครงงาน IRPUS สกว.
2547	โยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลืองจากเมล็ดถั่วเหลืองสกัดไขมัน	โครงงาน IRPUS สกว.
2546	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาข้างเหลืองกึ่งแห้งที่ใช้น้ำส้มสายชูในการยืดอายุการเก็บรักษา	โครงงาน IRPUS สกว.
2546	การผลิตจุลินทรีย์โปรตีนจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อนโดย *Saccharomyces cerevisiae* M30	โครงงาน IRPUS สกว.
2546	การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำต้มข้าวโพดฝักอ่อน	บริษัท แอกโกร – ออน (ประเทศไทย) จำกัด
2546	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ประเภทสุราแช่ชนิดสุราผลไม้	บริษัท ไทยสพิริทอินดัสตรี จำกัด
2544-45	การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำอ้อย	สกว.
2543-45	การพัฒนากระบวนการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*	สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ โครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น)
2539-42	Experimental and Threoretical Investigation of Packed Bed Solid-State Fermentation (ผู้ร่วมวิจัย)	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2539-42	High Vitamin B12 Vegetarian Diets by Mixed Fermentation (ผู้ร่วมวิจัย)	CDR USAID – ISRAEL Project
2541	การผลิตนมเปรี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วเหลืองในระดับกึ่งโรงงาน	สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประเภทพัฒนาสังคม
2540	การศึกษาสมบัติทางกายภาพของวุ้นเซลลูโลสของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2539-40	การผลิตคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากวุ้นเซลลูโลสที่ได้จาก *Acetobacter xylinum*	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2538	การผลิตเซลลูโลสเสริมสุขภาพจากน้ำกากส่า	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2537	Lactic Drink from High Vitamin B12 – Tempeh	UNU (United Nation University)
2536	เซลลูโลสเสริมสุขภาพจากน้ำหางนม	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2535	การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2530	ผลของการสารสกัดไม้เคี่ยมต่อการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล	งบประมาณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.
2529	Fermented Mungbean Residues by Laru, Traditional Inoculum	UNU (United Nation University)
2543	Research Activity at International Center for	Japan under the JSPS-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Biotechnology (ICBiotech), Osaka University, Osaka, Japan.	NRCT/DOST/LIPI/VCC Large Scale Cooperative Program in the Field of Biotechnology. Subgroup 4 : Process Development for the Production of Organic Acids and Biopolymers.
2542	Research Visit.	International Center for Biotechnology, Osaka University, Japan, under the RIKEN Project, Japan.
2541	Research Visit at Cornell University, United State.	USAID-Israel CDR Project.
2540	Research Activity at International Center for Biotechnology(ICBiotech), Osaka University, Osaka, Japan.	Japan under the JSPS-NRCT/DOST/ LIPI/VCC Large Scale Cooperative Program in the Field of Biotechnology. Subgroup 3 : Development of Manufacturing Bioprocess Technology in Tropics.
2538	Research Activity at International Center for Cooperative Research in Biotechnology(ICBiotech), Osaka University, Osaka, Japan.	JSPS-NRCT Core University Cooperative Program.
2538	Training in Soy Yogurt (Yogurt from soybean) at Department of Food Science and Technology, University of Reading, Reading, UK.	ทบวงมหาวิทยาลัยของรัฐ
2536	Training on Advances in Microbial Process for the Utilization of Tropical Raw Materials in the Production of Food Products at the University of the Philippines at Los Banos, Philippines.	UNESCO
2536	Research Activity at Kyoto University, Kyoto, Japan	JSPS-NRCT Core University Cooperative Program.
2531	SEARCA Scholarship (ปริญญาเอก)	SEAMEO Regional Centre for Graduate Study and Research in Agriculture
2531	Training on Bioenergy at Asian Institute of Technology at Asian Institute of Technology	UNESCO
2529	Training on Food Fermentation : Tempe at Nutrition Research and Development Center, Bogor, Indonesia.	United Nation University, Tokyo

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Internal Venturi Ejector System)"
เลขที่ LA 53/01 ลงวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2553
ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ไฮคิวผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)"
เลขที่ LA 54/01 ลงวันที่ 23 กันยายน พ.ศ. 2554
ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท วีนีก้าไทย จำกัด

การขอใช้สิทธิในเทคโนโลยี (Licensing Agreement) สิ่งประดิษฐ์ เรื่อง "กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศ (Internal Venturi Ejector System)"
เลขที่ LA 55/01 ลงวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2555
ระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ บริษัท ปริ๊นเซส ฟู้ดส์ จำกัด

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Krusong, W., Dansai, P. and Itharat, A. 2012. Combination impact of turmeric extract and fermented vinegar on reduction of inoculated *Salmonella* Typhimurium on fresh lettuce. KMITL Sci. Tech. J. 12: 77-84.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Krusong, W., Pornpukdeewatana, S. and Teerarak, M. 2016. Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* on coriander leaves to liquid- and vapor-phase ethanol. FEMS Microbiology Letters. 363. doi: 10.1093/femsle/fnw072.

Krusong, W., Kerdpiboon, S., Jindaprasert, A., Yaiyen, S., Pornpukdeewatana, S. and Tantratian, S. 2015. Influence of calcium chloride in the high temperature acetification by strain *Acetobacter aceti* WK for vinegar. Journal of Applied Microbiology. 119, 1291-1300.

Krusong, W., Jindaprasert, A., Laosinwattana, C, and Teerarak, M. 2015. Baby-corn fermented vinegar and its vapour, control postharvest decay in strawberries. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 43, 193-203.

Krusong, W., Teerarak, M., and Laosinwattana, C. 2015. Liquid and vapor-phase vinegar reduces *Klebsiella pneumoniae* on fresh coriander. Food Control 50, 502-508.

Krusong, W., Yaiyen, S., and Pornpukdeewatana, S. 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. Journal of Applied Microbiology 118, 629-640.

Krusong, W. and Tantratian, S. 2014. Acetification of rice wine by *Acetobacter aceti* using loofa sponge in a low-cost reciprocating shaker. Journal of Applied Microbiology 117, 1348-1357.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krusong, W., Pornpukdeewatana, S., Kerdpiboon, S., and Tantratian, S. 2014. Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semicontinuous process by artificial neural network. LWT - Food Science and Technology 56, 383-389.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Changsawake, K., **Krusong, W.**, Laosinwattana, J. and Teerarak, M. 2014. Antioxidant properties and DNA damage protective potential of RD6 glutinous rice. The 12th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. King Mongkut's Institute of Technpology Ladkrabang, Prince of Chumphon Campus, Chumphon, Thailand. 11-13 December 2014.

ผลงานวิชาการนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 3 ปี)

Changsawake, K., **Krusong, W.**, Laosinwattana, J. and Teerarak, M. 2015. Use of ambient upland rice fermented vinegar vapor to extend shelf life of sweet basil (*Ocimum basilicum* Linn.). The 4th ICIST, November 27-28, 2015, CWD Hotel, Hanot, Vietnam.

Changsawake, K., Krusong, W., Laosinwattana, C. and Teerarak, M. 2015. Evaluation of hydroxyl radical scavenging, anti-lipid peroxidation abilities and total phenolic content of RD6 glutinous rice grain. International Symposium on Engineering and Natural Sciences. Beijing, China. 12-14 August 2015.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Fermented Vinegar Production Process) **ด้วยระบบผสมน้ำหมักเข้ากับ** อากาศ (Internal Venturi Ejector System)
คำขอรับอนุสิทธิบัตรเลขที่ 1403002218 ยื่นเมื่อวันที่ 18 กันยายน 2557

กรรมวิธีการทำให้วุ้นเซลลูโลสใส
คำขอรับสิทธิบัตรเลขที่ 0901005777 ยื่นเมื่อวันที่ 22 ธันวาคม 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้